

## بررسی اثرات اسانس‌ها و عصاره‌های ۵۰ گیاه دارویی ایران روی سویه‌ای استاندارد کاندیدا

### آلیکس در شرایط آزمایشگاهی

علیرضا نائینی<sup>۱\*</sup>، محسن ناصری<sup>۲</sup>، محمد کمال‌نژاد<sup>۳</sup>، فریبا خوش‌زبان<sup>۴</sup>، طیبه رجیبیان<sup>۵</sup>، حسین اسماعیل‌زاده‌نامی<sup>۶</sup>، صادق منصوری<sup>۷</sup>، داوود زاویه<sup>۷</sup>

- ۱- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی و عضو مرکز تحقیقات طب سنتی ایران، دانشگاه شاهد، تهران
  - ۲- دانشیار، مرکز تحقیقات طب سنتی ایران، دانشگاه شاهد، تهران
  - ۳- پژوهشگر، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
  - ۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران
  - ۵- کارشناس گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
  - ۶- کارشناس، گروه طب سنتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
  - ۷- کارشناس، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران
- \* آدرس مکاتبه: تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدا... زاده، پلاک ۳۱، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، صندوق پستی: ۷۴۳۵ - ۱۴۱۵۵  
تلفن: ۸۸۹۶۷۹۲ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۹۶۶۳۱۰ (۰۲۱)  
پست الکترونیک: aemamh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۰

تاریخ تصویب: ۸۸/۶/۲۱

#### چکیده

مقدمه: در دهه‌های اخیر عفونت‌های ناشی از اثر قارچ فرصت‌طلب کاندیدا که توسط گونه‌های مختلف آن نظیر کاندیدا آلیکس ایجاد می‌شود سبب افزایش چشمگیری در میزان بروز بیماری بوده است.

هدف: وجود محدودیت‌هایی در درمان بیماری‌های قارچی از قبیل کمبود و گرانی داروهای ضدقارچی، عوارض جانبی آنها و نیز مقاومت داروها و یا کاهش حساسیت قارچ‌ها به این نوع داروها موجب شده تا توجه پژوهشگران به جستجوی داروهای ضدقارچی جدید خصوصاً داروهای گیاهی معطوف شود.

روش بررسی: ۱۷ اسانس و ۱۷۲ عصاره از ۵۰ گیاه دارویی مورد استفاده در طب سنتی ایران جهت بررسی اثرات ضدکاندیدایی مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس آزمایش روی سویه استاندارد PTCC5027 (ATCC10231) مخمر کاندیدا آلیکس با استفاده از روش دیسک‌گذاری و انتشار در آگار نشان داد که اسانس و عصاره ۱۶ گیاه دارای اثرات ضدکاندیدایی هستند. افزون بر این داروهای نیستاتین، آموتریسین B و کتوکونازول نیز به عنوان سه داروی موثر بر سویه استاندارد کاندیدا آلیکس به عنوان مقایسه و کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج: ۱۶ گیاه (۳۲ درصد) از ۵۰ گیاه مورد مطالعه دارای فعالیت ضدکاندیدایی بودند. نتایج نشان داد که اسانس گیاهان آویشن کوهی، آویشن شیرازی، اسطوخودوس، درمنه، زیره سبز، مرزه و نعناع دارای اثرات ضدکاندیدایی بسیار قوی و اسانس گیاهان اکلیل کوهی، سیاه دانه و مورد دارای اثرات قوی بودند. در حالی که اسانس گیاهان اکالیپتوس، انیسون، رازیانه، گلپر اثرات ضدکاندیدایی متوسطی از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به مشکلات روزافزون بیماری‌های قارچی یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که با تحقیقات بیشتر بر روی گیاهان مورد آزمایش که اثرات ضدکاندیدایی خوبی از خود نشان داده‌اند می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان به داروهای گیاهی و احتمالاً به ترکیباتی جدیدی جهت درمان عفونت‌های کاندیدایی دست یافت.

کل واژگان: گیاهان دارویی، اسانس و عصاره، اثرات ضدکاندیدایی، کاندیدا آلیکس



## مقدمه

شایان ذکر است که استفاده از داروهای گیاهی در درمان بیماری‌ها از گذشته دور در کشور ما متداول بوده و دارای سابقه چند هزار ساله می‌باشد و امروزه استفاده از داروهای گیاهی در درمان یک سری از بیماری‌های عفونی، افقی را پیش روی ما گشوده است و هم‌اکنون تحقیقات گسترده‌ای در جهان بر روی گیاهان دارویی در حال انجام می‌باشند. بر این اساس تحقیق حاضر انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### سوش استاندارد قارچ

قارچ مخمری کانیدیدا آلیکنس سویه ۵۰۲۷ PTCC (ATCC ۱۰۲۳۱) از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ‌های بیماری‌زا سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

### نحوه جمع‌آوری گیاهان

در تحقیق حاضر با استفاده از متون گیاهان دارویی و کتب طب سنتی نظیر مخزن‌الادویه، معارف گیاهی، قانون، راهنمای گیاه درمانی و ... به بررسی گیاهانی که احتمالاً دارای اثرات ضد میکروبی خوبی باشند، پرداخته شد. در ابتدا با مشورت اساتید فن، گیاهانی که احتمال داده می‌شد دارای اثرات ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، قاعده‌آور و التیام‌دهنده زخم‌ها باشند، از متون ذکر شده استخراج و لیستی از آنها تهیه شد.

از این تعداد ۵۰ گیاه بر اساس اثرات ضد میکروبی احتمالی، بومی بودن و در دسترس بودن انتخاب شدند. با استفاده از روش‌های عصاره‌گیری و اسانس‌گیری مبادرت به تهیه اسانس و عصاره‌های الکلی، آبی و استونی نموده و سپس با استفاده از آزمایش دیسک‌گذاری و انتشار در آگار بر روی گونه استاندارد کانیدیدا آلیکنس (سوش ۵۰۲۷ PTCC) که برای انسان بیماری‌زا می‌باشد) اثر ضد قارچی آن گیاهان تعیین شد.

همچنین سه داروی آمفوتریسین B و کتوکنازول و نیستائین جهت مقایسه کیفی و به عنوان شاهد مثبت در آزمایش انتخاب شدند.

عفونت‌های قارچی اگرچه در گذشته شیوع کمتری نسبت به عفونت‌های باکتریایی و ویروسی داشته‌اند، ولی در چند دهه اخیر مسئول افزایش چشمگیری در میزان بروز بیماری بوده‌اند. در بررسی انجام شده مابین سال‌های ۱۹۷۹ الی ۲۰۰۰ در آمریکا بروز عفونت‌های قارچی ۲۰۷ درصد افزایش داشته است [۱].

در یک بررسی دیگر انجام شده در آمریکا مابین سال‌های ۱۹۹۷ تا ۱۹۸۰ نشان داده شده که میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های قارچی افزایش یافته و به عنوان یکی از متداول‌ترین علل مرگ و میر<sup>۱</sup> از رتبه دهم به رتبه هفتم ارتقاء یافته است [۲].

عوامل مستعدکننده‌ای مانند استفاده وسیع و طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها، کورتون‌ها، داروهای سرکوب‌گر ایمنی و بیماری‌های زمینه‌ی همچون دیابت، ایذر و بدخیمی‌ها و ... سبب شده‌اند که بیماری‌های قارچی خصوصاً کانیدیدیازیس نسبت به گذشته رو به افزایش باشند. در طی یک تحقیق گونه‌های کانیدیدا به عنوان چهارمین عامل از عوامل مرگ و میر ناشی از عفونت‌های گردش خون<sup>۲</sup> به حساب آمده و ۳۵ درصد از موارد عفونت‌های خونی منجر به مرگ را، شامل شده‌اند [۲،۳].

عامل بیماری قارچی فرصت طلب از جنس کانیدیدا می‌باشد که به صورت همزیست در دستگاه گوارش، مخاطات، پوست انسان و سایر حیوانات بوده و حتی در محیط نیز یافته می‌شود. این عامل در شرایطی که مقاومت میزبان به صورت موضعی یا سیستمیک به صورت اولیه و یا ثانویه در اثر عوامل مستعدکننده بیماری کاهش یابد، قادر به ایجاد بیماری در هر ناحیه از بدن خواهد بود. وجود محدودیت‌هایی همچون تعداد کم داروهای ضد قارچی، سمی بودن آنها برای سلول‌های بدن یا کاهش حساسیت یک سری از گونه‌های کانیدیدا به این داروها، همواره به عنوان معضلات اساسی در درمان بیماری مطرح بوده‌اند [۴].

<sup>1</sup> Most common cause of death

<sup>2</sup> Most common cause of Blood stream infection



اسانس بود. پس از جمع‌آوری گیاهان (که عمدتاً در فصل بهار صورت پذیرفت) و خشک کردن آنها، شناسایی گیاهان زیر نظر کارشناس هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهیدبهشتی صورت پذیرفت.

جدول شماره ۱ لیست گیاهان انتخاب شده و نوع بافت مورد استفاده در آزمایش را نشان می‌دهد. جمع‌آوری گیاهان موردنظر از منطقه طالقان، منطقه الموت و مرکز پرورش گیاهان دارویی دانشگاه شاهد، عطاری‌های معتبر و شرکت باریج

جدول شماره ۱ - لیست گیاهان انتخاب شده جهت انجام آزمایش

نام گیاه	نام علمی	نوع بافت
ابوخلساء	<i>Arnebia euchroma</i>	ریشه
آنغوزه	<i>Ferula assa-foetida</i>	صمغ
اکلیل کوهی	<i>Rosmarinus officinalis</i>	اندام هوایی
اسفرزه	<i>Plantago ovata</i>	بذر
اکالیپتوس	<i>Eucalyptus globulus</i>	برگ
اسطوخودوس	<i>Lavandula angustifolia</i>	اندام هوایی
انیسون	<i>Pimpinella anisum</i>	بذر
آویشن شیرازی	<i>Zataria multiflora</i>	اندام هوایی
آویشن کوهی	<i>Thymus kotschanus</i>	اندام هوایی
بابا آدم	<i>Arctium lappa</i>	اندام هوایی
بارهنگ	<i>Plantago major</i>	اندام هوایی
بابونه	<i>Matricaria chamomilla</i>	اندام هوایی
بادرنجبویه	<i>Melissa officinalis</i>	اندام هوایی
بومادران	<i>Achillea millefolium</i>	اندام هوایی
پای خر	<i>Tussilago farfara</i>	اندام هوایی
پنیرک	<i>Malva sylvestris</i>	اندام هوایی
تمشک	<i>Rubus caesius</i>	میوه
ترتیزک وحشی	<i>Lepidum latifolium</i>	اندام هوایی
خارخاسک	<i>Tribulus terrestris</i>	اندام هوایی
خارمقدس	<i>Cnicus benedictus</i>	اندام هوایی
خاکشی	<i>Descurainia sophia</i>	اندام هوایی
خلر	<i>Lathyrus vernus</i>	بذر
ختمی	<i>Althaea officinalis</i>	گل
چای کوهی	<i>Stachy lavandulifolia</i>	اندام هوایی
رازیانه	<i>Foeniculum vulgare</i>	بذر
زرشک وحشی	<i>Berberis vulgaris</i>	گل و میوه
زیره سبز	<i>Cuminum cyminum</i>	بذر
سیاه‌دانه	<i>Nigella sativa</i>	بذر



ادامه جدول شماره ۱ - لیست گیاهان انتخاب شده جهت انجام آزمایش

نام گیاه	نام علمی	نوع بافت
سنجد	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	برگ
شیرین بیان	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	اندام هوایی
شنبلیله	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	اندام هوایی
شوید	<i>Anethum graveolens</i>	بذر
سداب	<i>Ruta graveolens</i>	اندام هوایی
درمنه	<i>Artemisia sieberi</i>	اندام هوایی
کاکوتی	<i>Ziziphora tenuir</i>	اندام هوایی
کنگر	<i>Gundelia tourneforti</i>	بذر
کیسه کشیش	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	اندام هوایی
کدو	<i>Cucurbita pepo</i>	بذر
کاسنی	<i>Cichorium intybus</i>	بذر
گلپر	<i>Heracleum Persicum</i>	بذر
گیلاس	<i>Cerasus avium</i>	صمغ
گلرنگ	<i>Carthamus Tinctorius</i>	اندام هوایی
گشنیز	<i>Coriandrum sativum</i>	بذر
گاوزبان	<i>Echium amoenum</i>	اندام هوایی
لیموترش	<i>Citrus aurantifolia</i>	میوه
مرزه	<i>Satureia hortensis</i>	اندام هوایی
ماری تیغال	<i>Silybum marianum</i>	اندام هوایی
مورد	<i>Myrtus communis</i>	اندام هوایی
نعناع	<i>Mentha spicata</i>	اندام هوایی
یونجه	<i>Medicago sativa</i>	اندام هوایی

## روش تهیه اسانس

تهیه اسانس به روش تقطیر با آب<sup>۱</sup> انجام گرفت [۶]. مقدار ۱۰۰ گرم از سرشاخه‌های خشک و پاک شده گیاهان جمع‌آوری شده را با استفاده از آسیاب برقی خرد و گیاه پودر شده را به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس‌گیری (کلونجر مدل دارونامه بریتانیا) ریخته و به آن ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جریان آب سرد مبرد را برقرار کرده و بالن ژوژه را درون هیتر برقی دستگاه جا داده و دستگاه را روشن نموده و اجازه داده شد تا مدت دو ساعت فرایند تقطیر انجام شود. بعد از دو ساعت، هیتر دستگاه خاموش شده و حجم اسانس جمع‌شده با کمک درجات روی بورت دستگاه، مشخص و یادداشت شد.

## جهت ذخیره‌سازی اسانس، یک شیشه رنگی کوچک را

توزین کرده و وزن با درپوش آن را یادداشت نموده و اسانس را در شیشه رنگی جمع‌آوری و تا زمان استفاده داخل یخچال قرار داده شد [۶]. لازم به ذکر است که عملیات اسانس‌گیری بر روی گیاهانی صورت پذیرفت که دارای میزان کافی اسانس در حد تجاری بودند.

## روش تهیه عصاره‌ها

## الف: روش تهیه عصاره اتانلی و استونی

عصاره‌گیری به روش خیساندن<sup>۱</sup> و با استفاده از حلال‌های اتانل و استون انجام گرفت [۵،۶]. مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه پس

<sup>۱</sup> Maceration<sup>۱</sup> Hydrodistillation

به کدورت معادل نیم مک فارلند ( $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6 \text{cfu/ml}$ ) با استفاده از سوآب پنبه‌ای استریل، سطح پلیت‌ها را به طور یکنواخت تلقیح نموده و از هر اسانس و عصاره مورد آزمایش مقدار ۳۰ میکرولیتر روی دیسک‌های بلانک که وسط پلیت گذاشته شده بود، ریخته شد. پلیت‌ها را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ سانتی‌گراد در داخل گرمخانه قرار داده شد و پس از گذشت زمان موردنظر، تشکیل منطقه عدم رشد در پیرامون دیسک‌ها مورد بررسی قرار گرفت و قطر منطقه عدم رشد قارچ با خط کش اندازه‌گیری شد [۴،۷]. نتایج حاصل نیز پس از مقایسه با جدول استاندارد (جدول شماره ۲) در جداول مربوطه ثبت شد.

جهت آزمایش کنترل مثبت نیز از دیسک‌های سه داروی آمفوتریسین B (۱۰ میکروگرم)، نیستاتین (۵۰ میکروگرم) و کتوکونازول (۱۵ میکروگرم)، خریداری شده از شرکت انگلیسی Master Group Ltd و بر اساس روش کار NCCLS و جدول ارائه شده از سوی شرکت مذکور (جدول شماره ۲) استفاده شد. در انتها کلیه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شده و میانگین نتایج در جداول مربوطه ثبت شد.

## نتایج

در طی آزمایش حساسیت کیفی داروهای ضدقارچ شیمیایی آمفوتریسین B، کتوکونازول و نیستاتین با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۶، ۳۳ و ۲۵ میلی‌متر علیه سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس به دست آمد.

بر اساس آنچه که در جدول شماره ۲ جهت تعیین حساسیت سوش‌های کاندیدا ارائه شده است (شرکت Master) و با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس ۵۰۲۷ (ATCC ۱۰۲۳۱ PTCC) نسبت به هر سه دارو حساس می‌باشد.

همچنین نتایج ذیل براساس آزمایش‌های انجام گرفته بر روی عصاره‌ها و اسانس گیاهان مورد آزمایش به دست آمد. جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که گیاهان: ابوخلساء، اسفرزه، بابا آدم، بارهنگ، بابونه، بادرنجبونه، بومادران، پای خر،

از آسیاب کردن درون ظروف عصاره‌گیری ریخته شده و به میزان ۴ برابر وزن گیاه حلال استون (۱۰۰ درصد) و یا اتانول (۸۰ درصد) اضافه شده و مدت ۳ الی ۴ روز بر روی شیکر در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس محلول به دست آمده توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شده و درون بن ماری ۶۵ - ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت تبخیر حلال قرار داده شد. عمل تغلیظ تا رسیدن به حدود ۵ درصد مقدار اولیه هر عصاره ادامه یافت [۶].

## ب: روش تهیه عصاره آبی

مقدار لازم از گیاه آسیاب شده (۱۰۰ گرم) را داخل ظرف عصاره‌گیری ریخته و ۴ برابر آن آب مقطر اضافه شد. ظرف موردنظر روی حرارت ملایم قرار گرفته و دائماً مخلوط شده تا اولین نشانه‌های جوشیدن دیده شود. پس از جوشاندن محلول به مدت ۱۵ دقیقه صاف شده (کاغذ صافی واتمن ۴۲) و با استفاده از دستگاه لیوفلیزاتور به مدت ۹۶ ساعت در دمای منهای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۰/۰۴ mbar لیوفلیزه شد [۶].

لازم به ذکر است که برای تهیه محلول کار از حلال‌های ۲ درصد Dimethyl Sulfoxide (شرکت مرک) جهت اسانس و از آب مقطر جهت عصاره اتانلی و آبی و از Tween 20 ۲ درصد (شرکت مرک) برای عصاره استونی استفاده شد. در پایان تمامی محلول‌های به دست آمده از صافی استریل کننده (۰/۰۲ میکرومتر) عبور داده شد.

ضمناً جهت جلوگیری از تاثیر عوامل مخدوش‌کننده در تحقیق، بی‌تاثیر بودن حلال‌ها در غلظت‌های به کار گرفته شده بر روی سویه قارچ مورد آزمایش قرار گرفت.

لازم به ذکر است که انواع عصاره‌گیری (اعم از آبی الکی و استونی) از گیاهان انتخاب شده بر اساس یک‌سری مشورت با اعضای تحقیق صورت گرفت.

## روش کار

### آزمایش دیسک‌گذاری

اصول کار در این آزمایش بر اساس روش استاندارد NCCLS انجام پذیرفت [۷].

ابتدا از سوسپانسیون تهیه شده از کشت تازه کاندیدا آلبیکنس ۴۸ - ۲۴ ساعته در سرم فیزیولوژی یا آب مقطر



شیمیایی در حیطه  $p < 0.05$  مشاهده نشد (قطر هاله توقف رشد بین ۳۰ - ۳۵ میلی‌متر). لذا چنین نتیجه‌گیری می‌شود که گیاهان موردنظر دارای مواد موثری می‌باشند که توانایی ممانعت از رشد کانیدیدا آلیکنس را در حد سه داروی ضدقارچی آمفوتریسین B، کتوکونازول و نیستاتین دارند.

همچنین اسانس گیاهان اکالیپتوس، انیسون، رازیانه و گلپر اثرات ضدکاندیدایی متوسطی (قطر هاله توقف رشد ۲۵ - ۲۰ میلی‌متر) از خود نشان دادند ( $p < 0.05$ ).

اسانس گیاه لیموترش اثرات ضدکاندیدایی ضعیفی داشته (قطر هاله توقف رشد زیر ۱۰ میلی‌متر) و اسانس گیاهان بابونه و بومادران فاقد هر گونه اثر ضدکاندیدایی ارزیابی شدند.

اما در رابطه با عصاره‌ها نتایج این تحقیق نشان داد که اثرات ضدکاندیدایی عصاره‌ها نسبت به اسانس‌ها در یک گیاه یا اصلاً دیده نشد و یا در حد ضعیف‌تری نسبت به اثر اسانس گیاه ارزیابی شد (جدول شماره ۳).

ترتیزک وحشی، تمشک، خارمقدس، خاکشی، خارخاسگ، ختمی، چای کوهی، زرشک وحشی، سنجد، سداب، شوید، شیرین‌بیان، شنبلیله، کاکوتی، کنگر، کیسه کشیش، کاسنی، کدو، گاوزبان، صمغ گیلاس، گشنیز، گلرنگ، ماری تیغال، یونجه، خلر، پنیرک فاقد هر گونه اثرات ضدقارچی قابل توجه بر علیه قارچ کانیدیدا آلیکنس بودند.

گیاهان آنغوزه و لیموترش نیز اثرات ضعیفی بر علیه قارچ کانیدیدا آلیکنس از خود نشان دادند.

اما نتایج حاصل از آنالیز آماری در آزمایش دیسک دیفیوژن نشان داد که گیاهان اسطوخودوس، آویشن شیرازی، آویشن کوهی، درمنه، زیره سبز، مرزه و نعناع دارای اثرات ضدکاندیدایی قوی‌تری (قطر هاله توقف رشد بیش از ۴۰ میلی‌متر) نسبت به داروهای ضدقارچ شیمیایی به کار رفته در این تحقیق می‌باشند ( $p < 0.05$ ).

از طرفی تفاوت معنی‌داری بین اثرات ضدکاندیدایی گیاهان اکلیل کوهی، سیاهدانه و مورد با داروهای ضدقارچ

جدول شماره ۲ - تعیین میزان حساسیت سویه استاندارد کانیدیدا آلیکنس به داروهای ضدقارچی در آزمایش دیسک دیفیوژن بر اساس روش NCCLS (شرکت Master Group Ltd)

مقاوم	وابسته به دوز	حساس	قطر هاله
دارو (میکروگرم / میلی‌لیتر)			
$\leq 10$	۱۰-۱۴	$\geq 15$	آمفوتریسین B
$\leq 20$	۲۱-۲۷	$\geq 28$	کتوکونازول
بدون هاله	۱۰-۱۴	$\geq 15$	نیستاتین

جدول شماره ۳ - نتایج حاصل از آزمایش دیسک‌گذاری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان مورد مطالعه بر علیه قارچ کانیدیدا آلیکنس (قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر)

نام گیاه	نام علمی	عصاره آبی (میلی‌متر)	عصاره اتانلی (میلی‌متر)	عصاره استونی (میلی‌متر)	اسانس (میلی‌متر)
آنغوزه	<i>Ferula assa-foetida</i>	-	۱۵	۲۰	*
آویشن شیرازی	<i>Zataria multiflora</i>	-	۳۰	۳۵	۵۵
آویشن کوهی	<i>Thymus kotschyanus</i>	-	۱۰	-	۵۵
اسطوخودوس	<i>Lavandula angustifolia</i>	-	*	*	۴۵
اکالیپتوس	<i>Eucalyptus globulus</i>	-	*	*	۲۳



ادامه جدول شماره ۳ - نتایج حاصل از آزمایش دیسک‌گذاری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان مورد مطالعه بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس

(قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر)

نام گیاه	ماده	نام علمی	عصاره آبی (میلی‌متر)	عصاره اتانلی (میلی‌متر)	عصاره استونی (میلی‌متر)	اسانس (میلی‌متر)
اکلیل کوهی		<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	*	*	۳۰
انیسون		<i>Pimpinella anisum</i>	-	-	-	۲۵
درمنه		<i>Artemisia sieberi</i>	-	-	-	۴۰
رازیانه		<i>Foeniculum vulgare</i>	-	-	-	۲۵
زیره‌ی سبز		<i>Cuminum cyminum</i>	-	-	*	۴۵
سیاه دانه		<i>Nigella sativa</i>	*	*	*	۳۵
گلپر		<i>Heracleum Persicum</i>	-	۱۸	*	۲۲
لیمو ترش		<i>Citrus aurantifolia</i>	-	*	*	۸
مرزه		<i>Satureia hortensis</i>	-	-	-	۵۵
مورد		<i>Myrtus communis</i>	-	*	*	۳۲
نعناع		<i>Mentha spicata</i>	-	*	*	۴۰

(-) بدون اثر و فاقد هاله رشد.

\* براساس یک سری اطلاعات اولیه آزمایش انجام داده نشد.

مثبت ارزیابی شده است. به عنوان مثال اثرات ضدباکتریایی و ضدویروسی و ضدقارچی گیاهانی نظیر اسطوخودوس، آویشن شیرازی، آویشن کوهی، اکلیل کوهی، سیاه دانه، درمنه مورد بررسی قرار گرفته شده است [۸ - ۱۴].

در تحقیق حاضر نیز در طی یک مطالعه میدانی دو ساله بر روی کتب طب سنتی و گیاهان دارویی، تعداد ۵۰ گیاه انتخاب شده و اثرات ضدکاندیدیایی اسانس و عصاره آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. هر چند که تا به حال چندین مطالعه در مورد اثرات ضدقارچی و ضد میکروبی گیاهان دارویی انجام شده است ولی مطالعه‌ای با این وسعت و به طور مقایسه‌ای با یکدیگر و نیز با داروهای شیمیایی بر روی کاندیدا آلبیکنس مشاهده نشده است.

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق که در جدول شماره ۳ آورده شده است، اثرات ضدکاندیدیایی یک سری از این گیاهان مثبت ارزیابی شد. نتایج این بررسی نشان داد که یک سری از گیاهان مورد آزمایش می‌توانند دارای مواد ضد میکروبی و ضدقارچی در شرایط *In Vitro* باشند. در طی مقایسه کیفی بین اثرات ضدکاندیدیایی این گیاهان با سه دارویی شیمیایی آمفوتریسین B، کتوکونازول و نیستاتین (بر اساس

به عنوان مثال اثرات ضدکاندیدیایی عصاره اتانلی و استونی آویشن شیرازی نسبت به اسانس آن ضعیف‌تر بود. هر چند که نسبت به اسانس سایر گیاهان در حد قوی‌تری ارزیابی شد. همچنین اثرات ضدکاندیدیایی عصاره اتانلی و استونی گیاه آنغوزه و عصاره اتانلی گیاه گلپر در حد ضعیفی دیده شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

در دهه‌های اخیر عفونت‌های ناشی از قارچ‌های فرصت‌طلبی نظیر مخمر کاندیدا (توسط گونه‌های مختلف آن و به طور عمده کاندیدا آلبیکنس) افزایش چشمگیری یافته‌اند. وجود محدودیت‌هایی همچون تعداد کم داروهای ضدقارچی مؤثر بر گونه‌های کاندیدا، سمی بودن آنها برای سلول‌های بدن انسان و کاهش حساسیت یکسری از گونه‌های کاندیدیایی به این داروها، همواره به عنوان معضلات اساسی در درمان بیماری کاندیدیازیس مطرح بوده و هستند. لذا چنین عواملی سبب شده تا توجه پژوهش‌گران به جستجو درارتباط با داروهای ضدقارچی جدید، خصوصاً گیاهان دارویی معطوف شود.

در مطالعات انجام شده در داخل و خارج کشور اثرات ضد میکروبی و بعضاً ضدقارچی یک سری از گیاهان دارویی



جدول شماره ۲ تعیین حساسیت (NCCLS) مشخص نمود که گیاهان اسطوخودوس، آویشن شیرازی، آویشن کوهی، درمنه، زیره سبز، مرزه و نعنای دارای اثرات ضدکاندیدایی بسیار قوی می‌باشند. لذا شایسته است تا با صرف وقت و هزینه مناسب به بررسی و تأمل بیشتر بر روی گیاهان مورد نظر پرداخته تا بتوانیم به کشف مواد موثره و نحوه مکانیسم عمل آنها نایل شویم.

همچنین اسانس گیاهان اکلیل کوهی، سیاه‌دانه، مورد و عصاره اتانولی و استونی آویشن شیرازی اثرات ضدکاندیدایی قوی از خود نشان دادند که با انجام تحقیقات بیشتر می‌توان به نتایج مطلوبی در زمینه داروهای ضدقارچی با منشای گیاهی دست یافت (قطر هاله عدم رشد ۳۰ تا ۳۵ میلی‌متر).

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد که اسانس گیاهان اکالیپتوس، گلپر، انیسون و رازیانه در مقایسه با داروهای ضدقارچ شیمیایی دارای اثرات ضدکاندیدایی متوسطی باشند.

از طرفی نیز اثرات ضدکاندیدایی اسانس لیموترش و عصاره اتانولی و استونی آغوزه و عصاره اتانولی آویشن کوهی در حد ضعیف ارزیابی شد.

این تحقیق نشان داد که در گیاهان دارای اسانس، اثرات ضدکاندیدایی عصاره‌ها نسبت به اسانس یا اصلاً وجود ندارد و یا در حد ضعیف‌تری می‌باشد. البته برخلاف سایر گیاهان مورد آزمایش، اثرات ضدکاندیدایی اسانس، عصاره‌های اتانولی و استونی آویشن شیرازی در خور توجه بود.

نکته قابل توجه اینکه، تعداد قابل توجه از گیاهان دارای اثرات بسیار قوی و قوی علیه قارچ کاندیدا آلیکنس متعلق به گیاهان تیره نعناعیان<sup>۱</sup> می‌باشند.

لازم به ذکر است تیره نعناعیان از تنوع بسیاری برخوردار بوده و بسیاری از گونه‌های آن بومی کشور ما بوده و با توجه به شرایط اقلیمی کشور در اکثر نقاط به خوبی قابل کشت می‌باشند. نکته در خور توجه اینکه اکثر مردم ما با گیاهان این تیره آشنا بوده و به میزان زیادی در طب سنتی و گیاه‌درمانی به اشکال مختلف اعم از خوراکی، پماد، لوسیون و ... مصرف می‌کنند.

لذا چنین به نظر می‌رسد که تحقیق بر روی این تیره از گیاهان و مواد موثره آنها جهت به دست آوردن ترکیبات جدید ضد میکروبی و ضدقارچی، خصوصاً گونه‌های کاندیدا ضروری باشد. در تحقیق حاضر گیاهان اسطوخودوس، آویشن شیرازی، آویشن کوهی، نعنای، اکلیل کوهی که اثرات خوبی از خود نشان دادند، متعلق به این خانواده می‌باشند.

در تحقیقات به عمل آمده توسط یک سری از محققان اثرات ضدافسردگی، ضد میکروب، ضد عفونی‌کننده و قاعدگی‌آوری گیاه اسطوخودوس به عنوان مهم‌ترین اثرات آن گزارش شده است [۱۵]. در تحقیق حاضر نیز اثرات ضدکاندیدایی گیاه اسطوخودوس نسبت به داروهای شیمیایی به کار رفته بسیار خوب و قوی ارزیابی شد (قطر هاله عدم رشد ۴۵ میلی‌متر). این اختلاف در مقایسه با آمفوتریسین B،  $p < 0/005$ ، کتوکونازول  $p < 0/02$  و نیستاتین  $p < 0/02$  به نفع اسانس به دست آمد.

در دو تحقیق جداگانه توسط حقیقی و زارعی، اثرات ضد میکروبی عصاره متانلی و اتانلی آویشن شیرازی به طور موثری مشاهده شده است [۹، ۱۰].

در تحقیق ما نیز اسانس آویشن شیرازی و عصاره‌های آن به ترتیب دارای اثرات ضدکاندیدایی بسیار قوی (قطر هاله عدم رشد ۵۵ میلی‌متر) و قوی (اتانلی ۳۰ میلی‌متر و استونی ۳۵ میلی‌متر) بودند. از نظر آماری اثرات اسانس به مراتب بیشتر از عصاره‌ها ارزیابی شد. به طوری که اثرات اسانس در مقایسه با آمفوتریسین B  $p < 0/001$ ، کتوکونازول  $p < 0/003$  و نیستاتین  $p < 0/002$  بود.

همچنین اسانس آویشن کوهی<sup>۱</sup> نیز اثرات ضدکاندیدایی قوی در حد آویشن شیرازی از خود نشان داد. آویشن کوهی گیاهی است که در نقاط مختلف کشور به فراوانی یافت می‌شود. لذا با استفاده توأم آن با آویشن شیرازی می‌توان از اثرات سینرژیستی آن بهره جست (قطر هاله عدم رشد ۵۵ میلی‌متر).

از سوی دیگر مصرف بیش از اندازه یک گونه گیاه دارویی توسط مردم در طبیعت می‌تواند منجر به کمبود و یا حتی انقراض آن گونه گیاهی شود لذا جستجو در رابطه با

<sup>1</sup> *Thymus kotschyanus*

<sup>1</sup> Labiatae



بیماری کاندیدیازیس مصرف دارند، به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. نظر به اینکه به طور کلی استفاده از گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی ارزان تر تمام شده و عوارض جانبی کمتری دارند، لذا ضروری است تا با بررسی بیشتر بر روی این گیاهان و خالص سازی و بهبود روش های استخراج و تعیین ماده مؤثره آنها و انجام آزمایش های تکمیلی نظیر MIC و MFC بتوانیم در آینده به نتایج خوبی دست یابیم.

شایان توجه است که در طی چند سال اخیر گزارش های زیادی مبنی بر مقاومت یک سری از گونه های کاندیدا به داروهای ضدقارچی شیمیایی، خصوصاً گونه های غیرآلبیکنس شده که می بایست جهت مقابله با آن تدابیری اندیشیده شود. لذا انجام تحقیقات تکمیلی بر روی گیاهان بررسی شده در این تحقیق و نیز مواد مؤثره آنها می تواند در این زمینه راه گشا باشد.

### پیشنهادات

امروزه بیماری های قارچی و در رأس آنها کاندیدیازیس نسبت به گذشته شایع تر شده اند. افزون بر این کمبود داروهای مناسب جهت درمان و پیشگیری از این بیماری ما را ملزم به تحقیقات گسترده در زمینه کشف و یافتن راه های جدید درمانی می نماید. در این راستا استفاده از داروهای گیاهی می تواند به عنوان یک آلترناتیو در کنار داروهای شیمیایی و یا حتی به تنهایی مطرح باشد. لذا پیشنهاد می شود:

- ۱- با توجه به نتایج خوب به دست آمده از این تحقیق مطالعات تکمیلی نظیر تعیین MIC و MFC هر گیاه صورت گیرد.
- ۲- اثرات ضدکاندیدیایی هر یک از گیاهان مورد مطالعه بر روی تعدادی از نمونه های بالینی (خصوصاً گونه های مقاوم به داروی فلوکونازول) بررسی شود.
- ۳- اثرات ضدکاندیدیایی هر یک از گیاهان مورد مطالعه بر روی گونه های استاندارد سایر کاندیداها بررسی شود.
- ۴- اثرات ضدقارچی هر یک از گیاهانی که دارای اثرات قوی بودند علیه سایر گونه های قارچی بررسی شود.

گیاهان با اثرات مشابه می تواند از بروز چنین مشکلاتی جلوگیری نماید. نکته آخر اینکه با توجه روند ایجاد مقاومت دارویی که در طی زمان در سوش های کاندیدیایی (نظیر کاندیدا گلابراتا) به وجود می آید، نیاز به داروهای متنوع و جانشین شونده همیشه احساس می شود.

تونس<sup>۱</sup> و همکاران اثرات ضدحشرات اسانس زیره را قوی ارزیابی کردند [۱۶]. در مطالعه ما نیز اثرات ضدکاندیدیایی این گیاه بعد از آویشن شیرازی و آویشن کوهی، بسیار قوی ارزیابی شد (قطر هاله عدم رشد ۴۵ میلی متر).

در طی مطالعات جداگانه فرزانه و نگهبان بر روی اسانس درمنه اثرات ضدقارچی و ضدحشرات آن بر روی قارچ فوزاریوم و حشرات قوی گزارش شده است [۱۷،۱۸].

بر طبق مطالعات انجام شده بر روی گیاه مرزه اثرات مختلفی اعم از اثرات ضددردی، ضدسرطانی، ضدویروس تبخال، ضدباکتری و آنتی اکسیدان برای این گیاه قائل شده اند [۱۵]. در مطالعه ما نیز اثرات ضدکاندیدیایی این گیاه بسیار قوی دیده شد. به طوری که اثرات آن در حد آویشن شیرازی و آویشن کوهی بود (قطر هاله عدم رشد ۵۵ میلی متر). از نظر آماری نیز این اختلاف معنی دار بوده و در مقام مقایسه با آمفوتریسین B، کتوکونازول و نیستاتین به ترتیب  $p < 0/001$ ،  $p < 0/002$ ،  $p < 0/003$  به نفع اسانس به دست آمد.

صالحی سورمقی برای نعنای اثراتی همچون خاصیت ضدعفونی کنندگی، ضد میکروب، ضدنفخ و ضداسپاسم را گزارش داده است [۱۵]. در تحقیق حاضر نیز اثرات ضدکاندیدیایی اسانس این گیاه بسیار قابل توجه بوده که می تواند ناشی از ماده کارون که ۸۷ درصد اسانس آن را تشکیل می دهد باشد (قطر هاله عدم رشد ۴۰ میلی متر).

همچنین اسانس گیاهان اکلیل کوهی، سیاه دانه و مورد دارای اثرات ضدکاندیدیایی قوی بر علیه سوش استاندارد ۵۰۲۷ بودند که قابل تامل بوده و نیازمند تحقیقات بیشتر می باشد (قطر هاله توقف رشد بین ۳۵ - ۳۰ میلی متر).

در این تحقیق همچنین از سه داروی شیمیایی ضدقارچی کتوکونازول، نیستاتین و آمفوتریسین B که جهت درمان

<sup>1</sup> Tunc



## تشکر و قدردانی

تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تامین اعتبار شده است بدین‌وسیله از تمامی دست‌اندرکاران تشکر و قدردانی می‌شود.

از آنجایی‌که بودجه‌بندی این تحقیق از سوی مرکز

## منابع

- Maryin GS, Mannino DM. The epidemiology of sepsis in the united states from 1979-2000, *New Engl J Med.* 2003; 348: 1547 - 54.
- Anaissie E, McGinnis M, Pfdla M. Clinical Mycology: 1<sup>st</sup> Ed. The Curtis Center, Independence Square West Philadelphia, USA.; 2003, 443 - 448, 195 - 225.
- Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal, *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 1692 - 6.
- Calderone RA. Candida and Candidiasis. A. S. M Press, 1752N St. NW, Washington, DC20036-2904, USA, 2002: 349 - 73.
- Sayyah M. Moaied S. Kamalinejad M. Anticonvulsant activity of Heracleum persicum seed, *J. Ethnopharmacol.* 2005, Apr 8; 98 (1 - 2): 209 - 11.
- Shareyat SH. Qualative and Quantitive Evaluation of the active Constituents and Control Methods for Medicinal Plants. 1 edition, Mani Pub. Esfahan, 1376, pp: 10 - 27.
- Espinel-Ingroff, AV, Pfaller, MA. Susceptibility test methods; yeasts and filamentous fungi. In: Manual of clinical microbiology, 9th ed, Murray, PR, et al (Eds), ASM Press, Washington, DC 2007, pp: 1972.
- Rasooli I, Mirmostafa SA. Bacterial susceptibility to and chemical composition of Essential oils from thymus kostschanus and thymus persicus. *J. Agric Food Chem.* 2003; 51: 2200 - 5.
- Shahidi Bonjar GH. Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine, *Fitoterapia* 2004; 75: 231 - 5.
- Zarei A, Dabbagh M, Fouladi Z. In-vitro anti-candida activity of *Zataria multiflora* Boiss. *eCAM* 2006; 1 - 3.
- Costentino S, Tuberoso C.; Pisano B.; Satta, M. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Applied Microbiol.* 1999; 29: 130 - 5.
- Nariman F. Eftekhari F., Habibi Z.; Falsafi T. Anti-Helicobacter pylori activities of six Iranian plants. *Helicobacter* 2004; 9 (2): 146 - 51.
- Letessier M.P, Walters D.R. Antifungal activity of the Essential oil of Hyssop. *J. of Phytopathol.* 2001; 149 (11 - 12): 673 - 8.
- Negahban M; Moharrampour, S; Sefidkon, Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *J. Stored Product R.* 2007; 43: 123 - 8.
- Salehi Surmaghi H. Medicinal plants and phytotherapy. Donyaee Taghazie, Tehran, Iran, 2006, pp: 59 - 63, 359 - 366.
- Tunc I. et al. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *J. Stored Product R.* 2000; 36: 161 - 8.
- Farzaneh M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens – commun *Agric. Apple Biol Sci.* 2006; 71 (3 pt B): 1327 - 33.
- Negahban M; Moharrampour, S; Sefidkon, Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *J. Stored Product R.* 2007; 43: 123 - 8.

