

فعالیت ضدقارچی اسانس زنجبیل (*Zingiber officinale* Rosc.) علیه ایزوله‌های بالینی واژینال کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول

رسول محمدی^{۱*}، فربرز معطر^۲

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
۲- استاد، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
*آدرس مکاتبه: اصفهان، خیابان رودکی، کوچه ارغوان، بن‌بست شریفی، ساختمان دریا
کدپستی ۶۸۶۱۱-۸۱۷۶۷، تلفن: ۷۸۶۲۶۰۴ (۰۳۱۱)، نمابر: ۶۵۴۰۷۲۲ (۰۳۱۱)
پست الکترونیک: rasoulm58@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲۵

تاریخ تصویب: ۸۶/۱/۲۵

چکیده

مقدمه: کاندیدا آلبیکنس قارچ فرصت‌طلبی است که در صورت ضعف سیستم ایمنی می‌تواند در انسان ایجاد بیماری کند و اندام‌های مختلف انسان را درگیر سازد. زنجبیل گیاهی دارویی است که دارای اثرات تقویت‌کنندگی حافظه، کاهش‌دهنده قند و فشارخون و خواص ضد میکروبی است.

هدف: هدف از این تحقیق، بررسی اثر اسانس گیاه زنجبیل بر ۲۵ ایزوله مقاوم کاندیدا آلبیکنس به فلوکونازول و بررسی نتایج به دست آمده است.

روش بررسی: روش‌های متفاوتی برای ارزیابی حساسیت دارویی در قارچ‌ها وجود دارد که در این تحقیق از روش میکرودايلوشن براث استفاده شد. برای این منظور با استفاده از دستگاه کلونجر و با استفاده از روش تقطیر با بخار آب، اسانس زنجبیل استخراج شد و سپس این اسانس بر سلول‌های کاندیدا آلبیکنس در گوده‌های میکروپلیت اثر داده شد و نتایج بررسی گردید.

نتایج: تعداد نمونه‌ها در این تحقیق ۲۵ ایزوله قارچ کاندیدا آلبیکنس بود که به فلوکونازول مقاوم بودند. در این تحقیق سه ایزوله تا رقت ۱/۳۲، چهار ایزوله تا رقت ۱/۶۴، یازده ایزوله تا رقت ۱/۱۲۸ و هفت ایزوله تا رقت ۱/۲۵۶ اسانس رشد نکردند.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که اسانس زنجبیل بر روی همه ایزوله‌های به کاررفته در این تحقیق اثر مهاری داشته می‌توان آن را اسانسی موثر بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی معرفی و بررسی‌های بالینی اثرات ضدقارچی آنرا توصیه کرد.

کل واژگان: کاندیدا آلبیکنس، فلوکونازول، فعالیت ضدقارچی، زنجبیل



مقدمه

کاندیدیازیس یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین عفونت‌های قارچی فرصت طلب در انسان است که به وسیله برخی گونه‌های مخمری کاندیدا به ویژه کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌شود. اشکال مختلف بیماری به فرم‌های حاد، تحت حاد و مزمن در نواحی مختلف بدن از جمله پوست، ناخن، مخاط واژن، برونش، ریه و دستگاه گوارش مشاهده می‌گردد. این عفونت‌ها معمولاً در ارتباط با اختلال سیستم ایمنی و سایر عوامل مستعدکننده منتشر می‌شود و اندام‌های داخلی نظیر کلیه، کبد و نظایر آن را درگیر می‌سازد. واکنش در برابر بیماری از یک خارش و التهاب مختصر تا فرم مزمن، حاد چرکی یا گرانولوماتوز در تغییر است. مهم‌ترین عامل این بیماری کاندیدا آلبیکنس است که ساکن طبیعی دستگاه گوارش، مخاط دهان و واژن است. انسان اغلب در بدو تولد در هنگام عبور از فلور طبیعی جلد و مخاط محسوب شده برخی نیز در طبیعت در خاک و مواد مختلف موجودند که مجموعاً قدرت بیماری‌زایی محدودتری دارند و از طریق منابع خارجی به بدن راه می‌یابند. کاندیدا آلبیکنس گاهی در آب استخرها و حمام‌ها موجود است (نسبت به کلر حساس است) اما در آب دریا به سرعت از بین می‌رود. سایر گونه‌ها نیز گاه از پوست سالم (به خصوص بین انگشتان پا، زیر ناخن‌های پا و از ناف) جدا شده‌اند. در نوزادان قبل از اینکه فلور طبیعی مخاط دهان تثبیت شود حتی تعدادی اندک از سلول‌های کاندیدا آلبیکنس در دهان قادر به ایجاد برفک هستند. عقیده بر این است که کاندیدیاز واژن در خلال حاملگی به خصوص در سه ماهه آخر بارداری موجب بروز برفک در نوزادان می‌شود.

تعدادی از میکروارگانیسم‌های فلور طبیعی روده در کنترل جمعیت مخمرها دخالت دارند. لاکتوباسیل‌ها و سایر ارگانیسم‌های مولد اسید لاکتیک جمعیت کاندیدا را تحت کنترل قرار می‌دهند. بدیهی است که تغییرات فلور طبیعی روده به دنبال درمان با آنتی‌بیوتیک از راه دهان در تعداد کلنی کاندیدا آلبیکنس در روده تغییراتی وارد سازد (با از بین رفتن لاکتوبا سیل‌ها در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک و کم شدن اسید

لاکتیک در محیط افزایش رشد و تکثیر در کاندیدا مشهود است). افزایش تعداد ارگانیسم در روده گاهی تنها موجب خارش در ناحیه مقعد شده و گاه موجب کاندیدیاز سیستمیک کشنده در افراد ناتوان می‌گردد.

رژیم غذایی نیز در جمعیت کاندیدا آلبیکنس موثر است چنانچه رژیم غذایی پرمیوه، تعداد ارگانیسم روده را اندکی افزایش دهد تغییرات فیزیولوژیک در زنان حامله و تغییر در کربوهیدرات واژن آن‌ها، اختلالات غدد اندوکراین (به خصوص دیابتیک‌ها)، استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌های باکتریایی، استروئیدها، اختلالات ژنتیکی و نقایص ایمنی همگی موجب افزایش تعداد قارچ در بدن از جمله واژن شده و باعث واژینیت کاندیدیایی می‌گردند [۱،۲]. در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی از شکست در درمان مبتلایان به اشکال بالینی متفاوت کاندیدیازیس ارائه شده است. داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون‌های متفاوت جهت درمان وجود دارد که در بسیاری از موارد به دلیل عدم پاسخ مناسب به درمان، بیماری به شکل مزمن در آمده و گاهی عودهای مکرر مشاهده می‌شود. در میان داروهای ضدقارچی، داروی فلوکونازول به دلیل انتشار مناسب در اکثر بافت‌های بدن میزبان، استفاده گسترده تری در درمان اشکال موضعی و منتشره بیماری دارد. در سال‌های اخیر بررسی‌های انجام گرفته در مورد حساسیت گونه‌های کاندیدا نسبت به داروهای ضدقارچی و به خصوص فلوکونازول، مکانیسم‌های مولکولی مختلفی را در جهت بیان دلایل مقاومت دارویی گونه‌های کاندیدا نشان داده است [۳]. هم‌چنین نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضدقارچی که خود منجر به بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آن‌ها می‌گردد و شناسایی بعضی از فاکتورهای ژنتیکی در ارتباط با مقاومت دارویی نسبت به فلوکونازول محدودیت‌هایی را در استفاده از این قبیل ترکیبات ضدقارچی به وجود آورده است [۴،۵]. بنابراین تحقیقات مختلفی در زمینه یافتن ترکیبات ضدقارچی موثر با منشأ طبیعی و اثرات جانبی کمتر انجام پذیرفته است. در این راستا محققین مختلف اثرات ضدقارچی عصاره‌های گیاهی مختلف نظیر سیر، چریش، پیاز، آویشن و کندر را بر روی گروه متنوعی از قارچ‌ها نشان داده‌اند



[۶،۷،۸،۹،۱۰]. در بین اسانس‌های گیاهی، اثرات مهاری اسانس زنجبیل بر روی میکروب‌ها، نرم‌تنان و حشرات توسط محققان بررسی شده [۱۱،۱۲،۱۳] ولی اثرات ضدکاندیدی آن کمتر بررسی شده است. بنابراین هدف تحقیق حاضر تعیین اثرات ضدقارچی اسانس زنجبیل بر روی ایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول کاندیداآلبیکنس‌های به دست آمده از نمونه‌ها بوده است.

زنجبیل گیاهی است چند ساله به ارتفاع حداکثر ۱/۳ متر، دارای ریزوم خزننده غده‌ای شکل و برگ‌های بدون دم‌برگ در اندازه‌های ۲×۲۰ سانتی‌متر، سر نیزه‌ای یا خطی که واجد نوک درفشی باریک و فاقد کرک است. ریزوم‌های ضخیم و کلفت گیاه، بخش دارویی آن را تشکیل می‌دهند. زنجبیل به شکل تازه (سبز)، خشک (پرورده) و پودر شده وجود دارد. انواع تجارتي زنجبیل عبارتند از: زنجبیل جاماییکایی، چینی، آفریقایی، استرالیایی و هندی که مرغوب‌ترین نوع آن جهت مصارف دارویی، زنجبیل جاماییکایی است که به صورت کاملاً تراشیده و تمیز شده به بازار مصرف عرضه می‌گردد. ریزوم خشک زنجبیل واجد ۶۰ - ۴۰ درصد نشاسته، ۱۰ درصد پروتئین، ۱۰ درصد چربی، ۵ درصد فیبر، ۶ درصد مواد معدنی، ۱۰ درصد رطوبت، ۱ تا ۴ درصد روغن فرار، ۸ - ۵ درصد ماده رزینی و موسیلاژ است. از موارد مصرف آن، درمان ناتوانی‌های حرکتی و سوء هاضمه است. همچنین به عنوان ادویه مطبوع و اشتهاآور در صنایع غذایی استفاده می‌شود. از عوارض جانبی آن می‌توان به ایجاد درماتیت در افراد بسیار حساس اشاره نمود [۱۴،۱۵].

مواد و روش‌ها

با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری انجام شد [۱۴]. بدین طریق که ۱۰۰ گرم از گیاه پودر شده زنجبیل (شناسایی شده در شرکت داروسازی گل دارو) را به همراه ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر و چند عدد پرل شیشه‌ای درون فلاسک دستگاه ریخته و به مدت ۴ - ۳ ساعت با حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد روی گرم‌کن قرار دادیم تا مواد داخل فلاسک به جوش آید. پس از این مدت اسانس استخراج شده در لوله

جمع‌آوری کننده اسانس دستگاه کلونجر جمع‌آوری گردید. حال نوبت به جداسازی و شناسایی قارچ کاندیداآلبیکنس از نمونه‌های بالینی بیماران بیمارستان امام خمینی تهران بود. بدین منظور از دو آزمون تشکیل جرم تیوب و تولید کلامیدوکوبیدی در محیط کورن میل آگار حاوی تواین ۸۰ استفاده شد [۱،۲]. سپس با استفاده از روش انتشار دارو در محیط کشت جامد و اندازه‌گیری قطر هاله جلوگیری از رشد اطراف دیسک‌های فلوکونازول (تهیه شده از دانشگاه تربیت مدرس تهران)، ایزوله‌های مقاوم و حساس به فلوکونازول شناسایی شدند.

بدین ترتیب که سوسپانسیونی از هریک از ایزوله‌ها با دانسیته‌ای برابر ۰/۵ مک فارلند تهیه و با استفاده از سوآپ استریل بر سطح پلیت حاوی مولر هیتتون آگار حاوی ۲ درصد گلوکز تلقیح گردید. ۱۰ - ۵ دقیقه بعد دیسک‌های فلوکونازول (۲۵ میکروگرم در لیتر) در مرکز پلیت‌ها قرار داده شد و به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ - ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، قطر نواحی جلوگیری از رشد اطراف دیسک‌ها درمقایسه با ایزوله کاندیداآلبیکنس حساس به فلوکونازول (دارای قطر ناحیه ممانعت از رشد قابل قبول حدود ۴۳ - ۳۴ میلی‌متر) و کاندیداآلبیکنس PTCC ۵۰۲۷ به عنوان کنترل مقاوم به فلوکونازول (دارای قطر ناحیه ممانعت از رشد حدود ۱۶ - ۸ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد [۱۷،۱۸]. سپس با استفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به هر گوده پلیت ۱۰۰ میکرولیتر محیط سابوردکستروزبراث اضافه شد. پس از آن میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسانس به گوده اول اضافه شد و با انتقال به گوده‌های بعدی رقت‌های متوالی از اسانس تهیه گردید. سپس به هر گوده تعداد ۱۰۰۰ سلول کاندیدا آلبیکنس که با استفاده از لام نیوبار شمارش شدند اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ - ۳۰ درجه سانتی‌گراد، نتایج از نظر کدورت ایجاد شده در گوده‌ها بررسی گردید. گوده قبل از اولین گوده‌ای که در آن کدورت مشاهده شده به عنوان «حداقل غلظت جلوگیری‌کننده»^۱ در نظر گرفته شد [۱۹،۲۰،۲۱].

^۱ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



جدول شماره ۱- نتایج MIC ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول

تعداد ایزوله‌ها	۳	۴	۱۱	۷
MIC ($\mu\text{g/ml}$)	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵
رقت اسانس	۱/۱۶	۱/۳۲	۱/۶۴	۱/۱۲۸

نتایج

نتایج تاثیر اسانس زنجبیل بر ۲۵ ایزوله کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول به این ترتیب بود: سه ایزوله تا رقت ۱/۳۲، چهار ایزوله تا رقت ۱/۶۴، یازده ایزوله تا رقت ۱/۱۲۸ و هفت ایزوله تا رقت ۱/۲۵۶ اسانس از خود رشدی نشان ندادند.

یک میلی‌لیتر اسانس زنجبیل برابر ۰/۸ گرم دارد [۲۰]. در رقت ۱/۲ از آنجایی که ما در حجم ۲ میکرولیتر ۰/۸ میکروگرم اسانس داریم حال در ۱۰۰۰ میکروگرم که برابر با ۱ میلی‌لیتر است مقدار $400 \mu\text{g/ml}$ اسانس داریم.

به همین ترتیب در رقت‌های:

$1/4 = 200 \mu\text{g/ml}$ ، $1/8 = 100 \mu\text{g/ml}$ ، $1/16 = 50 \mu\text{g/ml}$ ،
 $1/32 = 25 \mu\text{g/ml}$ ، $1/64 = 12/5 \mu\text{g/ml}$ ،
 $1/128 = 6/25 \mu\text{g/ml}$ ، $1/256 = 3/125 \mu\text{g/ml}$ اسانس زنجبیل موجود است.

بحث

در تحقیقات پیشین اثرات ضدقارچی پروتیین موجود در ریزوم زنجبیل نشان داده شده به گونه‌ای که این پروتیین بر روی پاره‌ای قارچ‌ها از جمله فوزاریوم اکسیسپاروم اثری کاملاً مهاری داشته است [۱۱].

Taechowisan و همکاران قادر به جداسازی ماده‌ای به نام CMUAc 130 از ریشه زنجبیل شدند که این ماده دارای خاصیت مهاری بر رشد بسیاری از قارچ‌های فیتوپاتوزن از جمله فوزاریوم بود [۲۳].

Nquefack و همکاران نشان دادند که اسانس این گیاه قادر به جلوگیری از تکثیر کونیدیال سه قارچ فوزاریوم مونیلی فورم، آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس بوده و

قادر است رشد این سه قارچ را در محیط کورن میل آگار متوقف نماید [۲۴].

فیکر^۱ و همکاران در تحقیقی اثر ضدقارچی ۳۶ اسانس گیاهی از جمله زنجبیل را بر روی ۱۳ قارچ بیماری‌زای انسانی بررسی کردند که در این بین اسانس زنجبیل و گردوی سفید بر روی طیف وسیعی از این قارچ‌ها اثر مهارکنندگی داشتند. هم‌چنین در این تحقیق نشان داده شد که اسانس زنجبیل اسانسی موثر در مهار رشد قارچ‌هایی بود که به آمفوتریسین B و کتوکونازول مقاوم بودند [۲۵].

آکاروال^۲ و همکاران در پژوهشی اثرات مهاری این اسانس را بر حشرات گونه Spilosoma نشان دادند [۱۲].

Singh و همکاران نیز اثرات کشندگی این اسانس را بر جنس لیمنه آ که از خانواده نرم‌تنان است تایید کردند [۱۳]. بیست^۳ نیز به اثرات ضدانگلی این گیاه اشاره کرده است [۱۵]. اندو^۴، کانو^۵ و اشیم^۶ در تحقیقی به خواص ضدقارچی ریزوم این گیاه اشاره کرده و آنرا اسانسی موثر علیه آسپرژیلوس و فیتوپاتوزن‌ها معرفی کردند [۲۶].

از آنجایی که تحقیقی در مورد اثرات ضدکاندیدیایی این اسانس یافت نشد بنابراین در این تحقیق سعی بر آن شد که این کاستی جبران شده و اثرات ضدقارچی این اسانس بر قارچ فرصت طلب کاندیدا آلبیکنس بررسی شود.

از آنجایی که این اسانس بر ۲۵ ایزوله به کار رفته در این تحقیق اثر مهارکنندگی داشت بنابراین می‌توان این اسانس را اسانس موثر در جلوگیری از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس (در شرایط آزمایشگاهی) معرفی کرد و جهت به کارگیری این اسانس در درمان کاندیدیازیس، پژوهش‌های بالینی تکمیلی نیاز است.

¹ Ficker
³ Bisset
⁵ Kanno

² Aqarwal
⁴ Endo
⁶ Oshima



تشکر و قدردانی

و هم‌چنین شرکت داروسازی گل دارو که ما را در این تحقیق یاری نمودند.

با نهایت سپاس و قدردانی از آقایان دکتر معطر، دکتر صفاریه، استاد خسروپور و خانم‌ها طاهریان و قدیری یزدی‌نژاد

منابع

1. Rippon J. The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes. 2nd ed. Saunders. Philadelphia. 1982, pp: 433 – 434.
2. Bennett J. Medical Mycology .2nd ed. Lea & Febi ger. Philadelphia. 1992, pp: 280-289.
3. White T, Holleman S, Mirels L, Stevens A. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Anti agents and chemo*. 2002; 46 (6): 1704- 1713.
4. Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002; 1587: 240- 248.
5. Dassanayake R, Ellepola A, Samaranayake L. Molecular hetrogenity of fluconazole – resistant and susceptible oral *Candida albicans* isolates within a single geographic local. *APMIS*. 2002; 110: 315- 324.
6. Adetumbi M, Lau B. *Allium sativum* a natural antibiotic. *Med. Hypo*. 1983; 12: 227 – 237.
7. Shams M, Razafsha M, Allameh A, Razzaghi M. Inhibitory effects of aqueous onion and garlic extracts on growth and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes*. *Iran Biomed*. 2003; 7 (3): 113-118.
8. Wang H, Nigour T. Isolation of allicepin anovel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs. *Pet. Sci*. 2004; 10 (3): 173-177.
9. Motsei M, Lindsey K, Van staden J, Jager A. Screening of traditionally used south African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J. Ethno*. 2003; 86 (2-3): 235-241.
10. Adelakun E, Finbar E, Agina S, Makinele A. Antimicrobial activity of *Boswellia dalzielii* stem bark. *Fito*. 2001; 72 (2): 822- 824.
11. Wang H, Nq T. An antifungal protein from ginger rhizomes. *Biochem. Res. commun*. 2005; 336 (1): 100 - 104.
12. Aqarwal M, walia S, Dhinqra S, Khambay Bp. Insect growth inhibithon, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes. *Pest. Manq. Sci*. 2001; 57 (3): 289-300.
13. Singh Vk, Singh S. Effect of active molluscicidal component of species on different enzyme activities and biogenic amine levels in the nervous tissue of *Lymnaea acuminata*. *Phytother. Res*. 1999; 13 (8): 649-654.
14. Trease GE, Evans Wc. Pharmacognosy. 14th ed. Saunders. London. 1996, 281-4.
15. Bisset NG. Herbal drugs & phytopharmaceuticals. Medpharm scientific Publishers. *Stuttgart*. 1994; 537 - 9.
16. Jaimand K, Rezaee MB. Essential oils, Distillations Apparatuses, Test Methods of Essential oils and Retention Indices in Essential oil Analysis. 1st ed. Herbal plant Community. Tehran. 2006. 106 – 110.
17. Scheven M. Susceptibility testing of yeasts to fluconazole by Etest and agar-diffusions disk test using the synthetic agar medium Mycoplete. *Myco*. 2002; 45: 156-159.
18. Sandven P. Detection of fluconazole-resistant candida strains by a disk diffusion screening test. *J. of Cli. Micro*. 1999; 37 (12): 3856 – 3859.
19. Pfaller M, Messer S. Comparison of visual and spectrophotometris methods of MIC and point determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents including

the new triazole. *J. Clin. Micro.* 1995; 33: 1094-1097.

20. Galgiani J, Rinadi M. Standardization of antifungal susceptibility testing. *J. Med. & Vet. Mycol.* 1990; 30 (1): 213- 227.

21. Beth A, Arthington S, Milwood M. Comparative evaluation of PASCO national committee for clinical laboratory standards M27-A broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of yeast. *J. Clin. Micro.* 2003; 8: 2254- 2260.

22. Brithish Pharmacopeia. Her majesty stationary office. London. 2004. vol III. p: 2454.

23. Taechowisan T, lu C, shen Y, Lumyong S. Secondary metabolites from endophytic streptomyces aureofaciens CMUAc 130 and their antifungal

activity. *Microbio.* 2005; 151 (5): 1691-1695.

24. Nquefack J, leth V, Amvam Z, Mathur SB. Evalvation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int J. food microbial.* 2004; 94 (3): 329-334.

25. Ficker CE, Arnason JT, vindas PS, Alvarez L, Adpaqana d, Gbeassor M, De souza C, Smith ML. Inhibition of human pathogenic Fungi by ethnobotanically selected plant extracts. *Mycoses.* 2003; 46 (1-2): 29-37.

26. Endo K, kanno E, oshima Y. Structures of antifungal diaryheptenones, gingerenones A, B, G and isogingerenone B, isolated from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phyto chem.* 1990; 29 (3): 797 – 9.

