فعالیت ضدقارچی اسانس *Cinnamomum zeylanicum* علیه جدایه‌های بالینی آسپرژیلوس

رسول محمدی[1]*، محمدرضا شکوه امیری[2]، سیدمهدی موسوی[2]، اصغر سپه‌وند[2]، معصومه شمس‌قهفرخی[3]، محمدحسین یادگاری[3]، شهلا رودبارمحمدی[3]، شهلا شادزی[4]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، مدرس دانشگاه فلاورجان

۲- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۳- استادیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران

٤- استاد، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

*آدرس مکاتبه: اصفهان، خیابان رودکی، کوچه ارغوان، بن‌بست شریفی، ساختمان دریا، پلاک ۱۸۱، واحد ۸

تلفن: ۷۸٦۲٦۰٤ (۰۳۱۱)، نمابر: ٥٥۱۲۹٤٤ (۰۳۱۱)

پست الکترونیک: Dr.Rasoul_mohammadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۲۳ **تاریخ تصویب:** ۸۸/۷/۱۹

چکیده

مقدمه: آسپرژیلوزیس عفونت قارچی فرصت‌طلبی است که به وسیله گونه‌های مختلف آسپرژیلوس ایجاد می‌شود. تظاهرات بالینی و شدت بیماری بستگی به شرایط فیزیولوژیک بدن میزبان، اندام‌های گرفتار شده و گونه‌های مختلف این قارچ دارد. *Cinnamomum zeylanicum* یک گیاه همیشه سبز ۱۵ - ۱۰ متری است که به خانواده *Lauraceae* تعلق دارد و بومی سریلانکا است. اسانس این گیاه دارای خواص ضدمیکروبی است.

هدف: بررسی خواص ضدقارچی اسانس این گیاه علیه جدایه‌های بالینی آسپرژیلوس و تعیین MIC اسانس می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه از روش Broth microdilution استفاده شد، به این ترتیب که اسانس گیاه با استفاده از دستگاه Clevengerاستخراج و در گوده‌های میکرو پلیت بر جدایه‌ها اثر داده شد و سپس با توجه به کدورت ایجاد شده در گوده‌ها و انتقال به محیط آگار، MIC آنها محاسبه شد.

نتایج: تعداد جدایه‌ها بیست و هفت عدد بود که مقادیر MIC به این شرح محاسبه شد: هشت جدایه µg/ml ۱/۱۸، شش جدایه: µg/ml ۰/۵۹، چهار جدایه: µg/ml ۰/۲۹، پنج جدایه: µg/ml ۰/۱٤ و چهار جدایه: µg/ml ۰/۰۷.

نتیجه‌گیری: از آنجا که اسانس این گیاه بر تمامی جدایه‌های به کار رفته در این تحقیق موثر بود، لذا می‌توان آن را به عنوان اسانسی موثر با خاصیت ضدقارچی معرفی نموده و بررسی خواص ضدقارچی آن را در شرایط Invivo توصیه نمود.

گل‌واژگان: *Cinnamomum zeylanicum*، آسپرژیلوس، فعالیت ضدقارچی، اسانس

[Downloaded from jmp.ir on 2024-10-13]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.36.7.9]

مقدمه

آسپرژیلوزیس طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی است که توسط اعضای جنس آسپرژیلوس ایجاد می‌شود. بیماری ممکن است در اثر مسمومیت غذایی، آلرژی به علت استنشاق کونیدی‌های قارچ رخ داده یا به صورت آسپرژیلوما، بیماری مهاجم التهابی گرانولوماتوز و نکروز دهنده ریه و سایر اعضا و به ندرت بیماری کشنده منتشر احشایی مشاهده شود [۱].

نوع و شدت بیماری به شرایط موضعی و حالت عمومی بدن بیما ربستگی دارد زیرا عوامل ایجادکننده بیماری در همه جا موجود بوده و می‌توانند به صورت فرصت‌طلب میزبان را درگیر سازند.

این عوامل قارچی در حیوانات نیز بیماری‌هایی چون سقط جنین، عفونت ریوی و مسمومیت غذایی به وجود می‌آورند. آسپرژیلوزیس اولیه نادر و در مردان بالغ شایع‌تر می‌باشد. در حالی‌که آسپرژیلوزیس ثانویه در بیماران ضعیف و ناتوان مشاهده شده، به سن یا جنس بستگی نداشته و همراه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، استروئیدها، سایتوتوکسین‌ها و نیز به دنبال سرطان‌ها، بیماری‌های خونی مانند لوسمی، پیوند کلیه، انتروکولیت، پنومونی، الکلیسم، سل، دیالیز و ....مشاهده می‌شود [۱،۲].

این قارچ‌ها در بیماران با ضعف سیستم ایمنی، پنومونی نکروز دهنده ایجاد کرده به عروق خونی تهاجم نموده و منجر به آمبولی، ایسکمی و نکروز پارانشیم ریه می‌شوند.

جنس آسپرژیلوس تقریباً شامل ۹۰۰ گونه بوده که آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس در رأس عوامل جداشده از بیماران قرار دارند [۲].

درمان این عفونت قارچی بستگی به نوع بیماری و حال عمومی بیمار دارد به عنوان مثال آسپرژیلوزیس آلرژیک در اکثر موارد خوش‌خیم بوده وباداروهایی چون پردنیزولون قابل درمان است درحالیکه آسپرژیلوزیس مهاجم بیماری شدیدی است و احتیاج به درمان سریع دارد که بدین منظور از داروهایی چون آمفوتریسین B و فلوسیتوزین استفاده می‌شود. از آنجا که این داروها به طور نسبی دارای اثرات جانبی فراوان بر سلول‌های بدن انسان هستند و مصرف آن‌ها نیازمند رعایت ملاحظات متعددی می‌باشد [۳،٤] از اینرو تحقیق حاضر برای یافتن ترکیبات ضدقارچی با منشای طبیعی و اثرات جانبی کمتر جهت‌گیری شده است. *Cinnamomum zeylanicum* یک گیاه همیشه سبز کوچک حدود ۱۵ – ۱۰ متری است که به خانواده *Lauraceae* تعلق دارد و بومی سریلانکا است. این گیاه دارای گل‌هایی به رنگ سفید بابویی معطر و مطبوع بوده و خاصیت ضدآلرژی دارد [۵]. همچنین خواص آنتی‌دیابتیک [٦] و ضدمیکروبی آن نیز به اثبات رسیده است [۷]. هدف از این پژوهش، شناخت تأثیر اسانس *C. zeylanicum* بر ایزوله‌های بالینی قارچ آسپرژیلوس و بررسی یافته‌های آن است.

مواد و روش‌ها

گیاه *C. zeylanicum* از شرکت داروسازی گل‌داروی اصفهان تهیه و اسانس آن با استفاده از دستگاه Clevenger در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران استخراج شد. بدین‌صورت که ۱۰۰ گرم برگ پودر شده گیاه را که از Sieve شماره ١٦ رد شده بود با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و چند عدد پرل شیشه‌ای در فلاسک دستگاه ریخته و بر روی Hot plate به مدت ٤ – ۳ ساعت قرار دادیم. پس از این مدت اسانس استخراج شده در لوله‌های جمع‌آوری کننده اسانس دستگاه و بر روی سدیم کلراید اشباع جمع‌آوری شد [۸].

جدایه‌های بالینی از بیمارستان امام خمینی تهران و آزمایشگاه تشخیص طبی قارچ شناسی شفای اصفهان جمع‌آوری شدند. سپس جدایه‌ها شناسایی شدند که برای شناسایی آنها از دو روش آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت به طور همزمان استفاده کردیم، زیرا گونه‌های آسپرژیلوس به صورت ساپروفیت در محیط وجود داشته و می‌توانند محیط‌های کشت را آلوده نموده و جواب مثبت کاذب دهند. نمونه‌ها را در محیط سابور دکستروز آگار[1] حاوی آنتی‌بیوتیک آنتی‌باکتریال و فاقد سیکلو هگزامايد (چون این گروه از قارچ‌ها، به این آنتی‌بیوتیک حساس‌اند) با pH معادل ٦.۲ کشت داده و در حرارت‌های ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ – ۳ روز انکوبه نمودیم [۹] و پس از این مدت انکوباسیون، جدایه‌ها با توجه به خصوصیات رشد شناسایی شدند (جدول شماره ۱).

[1] SDA

[Downloaded from jmp.ir on 2024-10-13]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.36.7.9]

جدول شماره ۱- مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی جدایه‌های به دست آمده از بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس

نمونه بالینی	ناخن	ریه	سینوس	پوست
گونه قارچ	آ.نیدولانس و فومیگاتوس	آ.فومیگاتوس وفلاووس	آ. فومیگاتوس	آ. نیجر
تعداد جدایه (عدد)	۲۱	۲	۳	۱
MIC μ g/ml	۰/۰۷ (چهار جدایه) ۰/۱٤ (سه جدایه) ۰/۲۹ (یک جدایه) ۰/۵۹ (شش جدایه) ۱/۱۸ (هفت جدایه)	فلاووس(۰/۲۹) فومیگاتوس(۰/۱٤)	۰/۲۹ (دو جدایه) ۰/۱٤ (یک جدایه)	۱/۱۸

در مرحله آخر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد[1] اسانس محاسبه شد. برای انجام این از میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای استفاده شد، بدین‌شکل که در همه گوده‌های ردیف‌های افقی میکروپلیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط سابور و دکستروز براث[2] ریختیم و سپس به گروه اول هر ردیف افقی ۱۰۰ میکرولیتر اسانس محلول در حلال دی‌متیل سولفوکساید[3] اضافه نمودیم و با انتقال به گوده‌های بعدی سریال دایلوشن اسانس را تهیه کردیم. غلظت اسانس در گوده‌های میکرو پلیت به ترتیب ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰٦۲۵ بود.

حال به هر گوده تعداد ۱۰۰۰ اسپور از قارچ موردنظر که با لام نئوبار شمارش شده بود تلقیح و ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مدت، با توجه به کدورت ایجاد شده در اثر رشد میکروارگانیزم در گوده‌های میکرو پلیت و انتقال ۵۰ میکرولیتر از محتوای گوده‌های موردنظر به محیط SDA، مقدار MIC اسانس محاسبه شد به نحوی که گوده پیش از اولین گوده‌ای که کدورت رشد در آن مشاهده شد به عنوان گوده MIC در نظر گرفته می‌شود و با انتقال به محیط جامد، نتایج تایید می‌شود [۱۰،۱۱،۱۲].

لازم به یادآوری است که دو ردیف آخر میکرو پلیت مربوط به گروه‌های شاهد منفی و مثبت بود. شاهد مثبت حاوی محیط کشت و حلال DMSO و اسپور قارچ و شاهد منفی حاوی محیط کشت و حلال DMSO بدون اسپور قارچ بودند.

[1] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[2] SDB [3] DMSO

نتایج

تعداد جدایه‌ها بیست و هفت عدد بود. یک جدایه آسپرژیلوس نیجر مربوط به یک بیمار مبتلا به اتومیکوزیس، سه جدایه آسپرژیلوس فومیگاتوس مربوط به سه بیمار مبتلا به سینوزیت آلرژیک، دو جدایه آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس مربوط به دو بیمار مبتلا به عفونت ریه و نوزده جدایه آسپرژیلوس فومیگاتوس و دو جدایه آسپرژیلوس نیدولانس مربوط به اونیکومیکوز بودند.

مقادیر MIC به شرح ذیل محاسبه شد:

هشت جدایه: ۱/۱۸ μg/ml، شش جدایه: ۰/۵۹ μg/ml، چهار جدایه: ۰/۲۹ μg/ml، پنج جدایه: ۰/۱٤ μg/ml، چهارجدایه: ۰/۰۷ μg/ml

حساس‌ترین جدایه‌ها چهار جدایه آسپرژیلوس فومیگاتوس بود که چهار جدایه مربوط به اونیکومیکوز بود. مقاوم‌ترین جدایه‌ها یک جدایه آسپرژیلوس نیجر مربوط به یک بیمار مبتلا به اتومیکوزیس، یک جدایه آسپرژیلوس نیدولانس مربوط به اونیکومیکوز و شش جدایه آسپرژیلوس فومیگاتوس مربوط به اونیکومیکوز بودند (جدول شماره ۱).

بحث

با توجه به اثرات جانبی زیادی که داروهای ضدقارچی شیمیایی بر سلول‌های بدن دارند و همچنین گران بودن این داروها، چندی است که پژوهشگران مجدداً به فکر استفاده از

[Downloaded from jmp.ir on 2024-10-13]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.36.7.9]

ترکیبات ضدقارچی با منشای طبیعی با اثرات جانبی کمتر افتاده‌اند. در این زمینه اثرات ضدقارچی گیاهان متعددی چون سیر، پیاز، کندر و ... به اثبات رسیده است [۱۳،۱٤،۱۵].

در این زمینه گند[1] و همکاران در سال ۲۰۰۸، اسانس این گیاه را اسانسی موثر علیه *Paenibacillus larva* که عامل بیماری American foul brood است، معرفی نمودند [۱٦].

گیوردانی[2] و همکاران در سال ۲۰۰٦ در تحقیقی که به روش Broth macrodilution انجام دادند، به اثرات ضدقارچی این اسانس علیه قارچ کاندیدا آلبکینس پی بردند [۱۷].

در سال ۲۰۰۷، مورینا[3] و همکاران در مطالعه‌ای اثرات مهاری این اسانس را بر روی برخی قارچ‌های گروه دیماتیاسئوس از جمله آلترناریا، کلادوسپوریوم، کورولاریا و پیدراهورتای، نشان دادند [۱۸].

سنهاجی[4] و همکاران در سال ۲۰۰۷، اثرات آنتی‌باکتریال این اسانس را علیه اشرشیا کولی نشان دادند [۱۹].

در سال ۲۰۰٦، شاهوردی[5] و همکاران نشان دادند که حضور ۲۰ μg/ml این اسانس، MIC کلیندامایسین را تا ۱٦ برابر کاهش می‌دهد [۲۰].

در این راستا، مسعود[6] و همکاران در سال ۲۰۰٦ از عصاره آبی این گیاه علیه ۱۷۸ گونه باکتریایی متعلق به ۱۲ جنس استفاده کردند که اثر ضدباکتریایی آن حدود ۹۹/٤ درصد بود و به جز سالمونلا پاراتیفی B از رشد مابقی باکتری‌ها جلوگیری کرد [۲۱].

همچنین مُنتس[7] و کارواجال[8] در تحقیقی که انجام دادند به این نتیجه رسیدند که این اسانس دارای اثر مهاری در برابر قارچ آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد [۲۲].

در سال ۲۰۰۱، چانگ[9] و همکاران با استخراج اسانس برگ این گیاه و اثر آن بر باکتری‌های اشرشیاکولی، سدوموناس، انتروکوکوس، استافیلوکوکوس آرئوس، سالمونلا و کلبسیلا مشاهده نمودند که رشد همه آنها توسط این اسانس مهار شد [۲۳].

[1] Gende
[2] Giordani
[3] Moreina
[4] Senhaji
[5] Shahverdi
[6] Masood
[7] Montes
[8] Carvajal
[9] Chang

در پژوهشی دیگر، کیوال[1] و همکاران، اسانس این گیاه را برای درمان کاندیدیازیس دهانی در افراد ایدزی به مدت یک هفته به کار برده و آنها را درمان کردند [۲٤].

این مطالعه در راستای حل مشکلاتی چون اثرات جانبی داروهای ضدقارچی شیمیایی وجایگزینی آن‌ها با داروهای ضدقارچی گیاهی جهت‌گیری شد. از آنجا که اسانس مورد آزمایش بر همه ایزوله‌های به کار رفته در این مطالعه اثر مهاری داشت، لذا می‌توان از آن به عنوان اسانسی موثر بر علیه این گروه از قارچ‌ها یاد کرد، اما بررسی خاصیت ضدقارچی این اسانس در شرایط Invivo، اثرات دما، pH و مواد داخل بدن موجود زنده بر روی آن و همچنین ایجاد مقاومت دارویی در برابر این اسانس، نیازمند بررسی‌ها و مطالعات بیشتری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

در خاتمه از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، آزمایشگاه تشخیص طبی قارچ‌شناسی شفای اصفهان، شرکت داروسازی گلدا روی اصفهان و بیمارستان امام خمینی تهران، کمال تشکر و قدردانی را می‌نمائیم.

[1] Quale

[Downloaded from jmp.ir on 2024-10-13]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.36.7.9]

منابع

1. Kwon – Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. 2nd ed. L ea & Febrger. Philadelphia 1992, pp: 201 - 10.

2. Zeini F, Basiri Jahromi S H. Study of fungal infections in patients withLeukemia. *Iran. J. Pub heal*. 1994; 1 (4): 89 - 103.

3. Arroyo J, Medoff G, Kobayashi G S. Therapy of murine *Aspergillosis* With amphotericin B in combination With rifampin of 5-fluorocy tosine. *Antimicrob. Age. chemother*. 1977; 11 (1): 21 - 5.

4. Denning DW, Stevens D A. Antifungal and surgical treatment of invasive *Aspergillosis*: review of 121. Published cases. *Rev. Infec. Dis*. 1990; 12 (6): 1147 - 51.

5. Corren J, Lemay M, Lin Y, Rosa L, Rudolph R K. Clinical and biochemical effects of a combination botanical product for allergy. *Natu J.* 2008; 7 (20): 2891 - 5.

6. Subash P, Prabuseenivasan S, Ignacimuthu S, Cinnamaldehyde A. Potential antidiabetic agent. *Phytomed.* 2007; 14 (1): 15 - 22.

7. Quattara B, Simard RE, Holley RA, Pitte GJP, Begin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils six meat spoilage organisms. *Inter. J. Food Microbe*. 1997; 37: 155 - 62.

8. British pharmacopoeia. Her majesty stationary office. London. 2003, pp: A243 - A249.

9. Zeini F, Mehbod A, Emami M. General Medical mycology. 2nd ed. Tehran University. Tehran. 2004, pp: 406 - 7.

10. Pfaller MA, Messer SA,Coffman S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole DO870. *J. Clin. Microbrol*. 1995; 35 (5): 1094 -7.

11. Galgiani JN, Rinadi MG, Polka AM. Standardization of antifungal Susceptibility testing. *J. Med & Vet myco*. 1992; 30 (1): 213 - 7.

12. Romingthon BA, Motley M, Warnock DW, Morrison CJ. Comparative evaluation of PASCO and national committee for clinical laboratory standards M27 – A broth micro dilution methods for antifungal drug susceptibility testing of yeasts. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38 (6): 2254 - 60.

13. Adetumbi MA, Lau BH. *Allium sativum* (garlic) – a natural antibiotic. *Med. Hypo*. 1983; 12 (3): 227 - 37.

14. Shams M, Razafsha M, Allameh A, Razzaghi M. Inhibitory effects of Aqueous onion and garlic extracts on growth and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes*. *J. biom*. 2003; 73 (3): 113 - 8.

15. Adelakun EA, Finbar EA, Angina SE, Makinde AA. Antimicrobial activity of *Boswellia dalziellii* stems bark. *Fito*. 2001; 72 (7): 822 - 4.

16. Gende LB, Floris I, Fruit R, Eguaras MJ. Antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil and its main components against paenibacillus larvae from Argentina. *Bulle. of insect*. 2008; 61 (1): 1 - 4.

17. Giordani R, Regli P, kaloustation J. Protentiation of antifungal activity of amphotericin B, by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phyto. resea*. 2006; 20 (1): 58 - 61.

18. Moreina ACP, Lima EDO, Souza ELD, Van Din gene A, Trajano VN. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum Blume* (Lauraceae) essential oil and Beta-piene on the growth of dimatiaceous moulds. *Braz. J Clin. Microbiol*. 2007; 38 (2): 111 - 5.

19. Senhaji O, Faid M, Kalalou I. Inactivation of *E. coli (O157: H7)* by essential oil from *Cinnamomum zeylanicum. Brazil. J. infect. Dis*. 2007; 234 - 6.

20. Shahverdi AR, Monsef HR, Tavasoli F, Zaheri A, Mirjani R. Cinnamaldehy from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the Tran's clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. *J. Food Sci*. 2006; 72: 155 - 8.

21. Masood N, Chaudhry A, Tarig P. Antimicrobial activity of *C. Cassia* against diverse

[Downloaded from jmp.ir on 2024-10-13]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.36.7.9]

microbial flora whit its nutritional and medicinal impacts. *Park. J. Bot*. 2006; 38 (1): 169 - 74.

22. Montes R, Carvajal M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oil and their components. *J. Food Prot*. 1998; 61 (5): 616 - 9.

23. Chang ST, Chun PF, Chung SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. of ethno*. 2001; 77: 123 - 7.

24. Quale JM, Landman D, Zaman MM, Burney S, Sathe SS. Invitro activity of *Cinnamomum zeylanicum* against azol resistance and sensitive candida species and pilot study of cinnamon for oral Candidiasis.1996; *AM. J. Chin. Med*. 24 (2): 103 - 9.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-10-13]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.36.7.9]