بررسی اثر عصاره بذر گیاه خار مریم (Silybum marianum) بر قارچ های درماتوفیت و ساپروفیت در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با کلوتریمازول

میترا صالحی*[۱]، طاهره حسنلو[۲]، صدیقه مهرابیان[۳]، سمیه فرهمند[٤]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران. [۲]بخش تحقیقات فیزیولوژی مولکولی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران. [۳]گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم، تهران، ایران. [٤]گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، قم، ایران

تاریخ دریافت : ۸۹/۱/۳ ، تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۲۰

Effects of Silybum marianum (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi In vitro compare to clotrimazol

Salehi M.*[1], Hasanloo T.[2], Mehrabian S.[3], Farahmand S.[4]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran. [2] Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran. [3]Department of Biology, Faculty of Science, Teacher Training University, Tehran, Iran. [4]Instructor department of Biology, Payamnur University, Ghom, Iran.

Received: 23 Mar. 2010, Accepted: 12 Oct. 2010

Objectives: During recent years, increasing side effects for syntactic drugs have been motivated by more researchers for finding new compounds of the plant with antifungal activity. Dried fruits extract of Silybum marianum contain flavonoid compounds and until now, no studies have been conducted on the antifungal activates of methanolic extract of this plant. In this study, inhibitory potential of S. marianum methanolic extract on dermatophytes and saprophytes fungi was investigated in vitro compare to clotrimazol. **Method:** Antifungal activities of S. marianum seeds extract were evaluated against pathogens (Trichophyton mentagrophytes, Epidermaphyton folocosom, Microsporum canis) and saprophytes (Aspergillus niger, Candida albicans) fungi with different methods such as, disc diffusion (60, 30, 15, 7.5, 3.2 and 1.6 mg extract per disc), pour plate and broth (50, 25,12.5, 6.2, 3.1, 1.5 mg ml-1 extract in medium). Concentration of cloterimazol as a control was 10 µg ml-1. **Results:** Our results showed that, S. marianum seeds extract prevents the growth of dermatophytes more than saprophytes fungi. The best inhibitory effects of extract (6.2 mg ml-1) in Microsporum canis and Epidermaphyton folocosom cultures were achieved by porplate and broth methods that were similar to our results with 10 µg ml-1 cloterimazol. No inhibitory effects were observed in Aspergillus niger and Candida albicans cultures. **Conclusion:** With attention to our finding, components of the Silybum marianum extract have antifungal effects on the growth of dermatophytes.

Keywords: *Silybum marianum, Saprophytes, Dermatophyte, Antifungal activities.*

زمینه و هدف: در سال های اخیر به علت عوارض ناشی از مصرف دارو های شیمیایی، مطالعات برای یافتن داروهای ضد قارچی از ترکیبات گیاهی انجام گرفته است. فلاونوئیدهای گیاهی موجب مهار رشد قارچ ها می شوند. دانـه های گیاه خار مریم حاوی ترکیبات فلاونوئیـدی می باشند. تاکنون اثرات ضد قارچی عصاره این گیاه مطالعه نشده است. ارزیابی پتانسیل مهاری عصاره متانولی دانه های گیاه خار مریم بر روی قارچ های درماتوفیت و ساپروفیت در مقایسه با کلوتریمازولانجام شد. **روش ها:** اثرات عصاره استخراج شده بر روی قارچ های درماتوفیت (اپیدرموفایتون فلوکوزوم، میکروسپوروم کانیس، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس)، سویه های ساپروفیت (آسپرژیلوس نایجرو کاندیدا آلبیکنس) توسط روش های دیسک گذاری (۱/٦، ۳/۲، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ٦۰ میلی گرم)، کشت آمیخته و کشت مایع (غلظت های ۱/۵، ۳/۱، ٦/۲، ۱۲/۵، ۲۵ و۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. از کلوتریمازول به عنوان نمونـه شاهد بـا غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر استفاده شد. **یافته ها:** اثر عصاره در توقف رشد درماتو فیت ها بیشتر از قارچ های ساپروفیت بود. بهترین اثر ضد قارچی عصاره در مورد میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم با حداقل غلظت عصاره متانولی (٦/۲ میلی گرم در میلی لیتر) مشاهده شد. این کاهش رشد قابل مقایسه با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر کلوتریمازول بود. در حالیکه عصاره فاقد اثر باز دارندگی بر روی آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس بود. **نتیجه گیری:** مواد موجود درعصاره دانه های گیاه خار مریم دارای اثرات ضد قارچی بر روی درماتوفیت ها می باشد.

واژه های کلیدی: *خارمریم، درماتوفیت، ساپروفیت، ضد قارچی*

*نویسنده مسئول: میترا صالحی، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، خیابان ولیعصر، کوچه سالار، مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی– واحد تهران شمال، تلفن: ۲۲٦٦٦۰۱٦-۰۲۱ ، فکس: ۲۲٦٦٦۰۱٦-۰۲۱ پست الکترونیکی: mitra_salehi_microbiology@yahoo.com

Corresponding author: Mitra Salehi, Assistant Professor, Department of Microbiology ,Tehran Islamic Azad University, Valiasr St., Laboratory of Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tel:+98-21- 22666016, Email: mitra_ salehi_ microbiology@yahoo.com

۱- مقدمه

از گذشته های دور تاکنون به عصاره ها و ترکیبات گیاهی با خواص بیولوژیکی مختلف توجه زیادی شده است. دستیابی به کاربرد های نوین به عنوان داروهای کمکی، پی بردن به ارزش های بهداشتی گیاهان و بالاخره کشف مواد موثره با خاصیت ضد میکروبی و مواد ضد توموری از گیاهان در پیشرفت طب گیاهی کمک شایانی کرده است. ترکیبات ضد میکروبی گیاهی نه تنها در درمان بیماری های عفونی موثرند، بلکه به طور همزمان فاقد بعضی از اثرات جانبی سایر ترکیبات ضد میکروبی هستند (۱). امروزه یک سوم از فرآورده های داروهای مورد استفاده در جوامع انسانی دارای منشاء گیاهی می باشند (۲).

درماتوفیت ها متعلق بـه خانواده مونیلیاسه ، گروهـی از قارچ های رشته ای کراتین دوست هستند که پوست، مو و ناخن را در انسان و حیوانات مورد حمله قرار داده و باعث کچلی می شوند (۳). درماتوفیت ها در حقیقت گروهی بسیار مشابه و نزدیک بـه هم از قارچ هـا هستند که تولید فرم های کلینیکی بسیار متنوعی را می کنند. این قارچ ها از شایع ترین عوامل عفونت در دوران کودکی در بیشتر مناطق جهان می باشند. این گروه از بیماری ها را تحت عنوان درماتوفیتوزیس می نامند (٤،٥). درماتوفیتوزیس در ایران نسبتا از شیوع بالایی برخوردار است (٦،٧).

آسپرژیلوس باعث بیماری هـــای قارچـی فـرصت طلب می شود که در اثر مسمومیت غذایی و یا به صورت بیماری مهاجم التهابـی در ریه و هم چنین سایـر اعضاء مشاهـده می شود. کاندیدیازیس از شایع ترین عفونت های سطحی است که اغلب در افراد دارای اختلال در سیستم ایمنی به خصوص بیماران مبتلا به ایدز دیده می شود (۸).

در حالی که امروزه پیشرفت های وسیعی در امور درمان و پیشگیری از عفونتهای قارچی صورت گرفته و از موارد بروز آنها کم و بیش کاسته شده است ولی هم چنان شیوع آن در مناطقی با سطح بهداشت پایین مشاهده می شود (۹).

گیاه خار مریم (Silybum marianum) از تیره کاسنی است و در بیشتر نواحـی غربـی ایـران بـــه صـورت خودرو رویش می یابد (۱۰).

سیلی مارین مجموعه ترکیبات مستعد از جمله فلاونوئیدها است که شامل سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و تاکسی فولین بـه عنوان پیش ساز مـی باشـد و از دانه هـای گیاه خارمریم استخراج می‌شود (بـه میزان ٤ تا ٦ درصد) (۱۵-۱۱). عصاره دانه این گیاه در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان، ایدز، هپاتیت و مسمومیتهای کبدی موثر تشخیص داده شده است (۱۸-۱٦). نتایج پژوهش ها در سال های اخیر نشان داده است که ترکیبات گیاهـی از جمله فلاونوئیدهـا، موجب مهـار رشد درماتوفیت ها شده اند (۲۲-۱۹). به این منظور، اثرات ضد قارچـی عصاره متانولـی دانه هـای گیاه خار مریم بر روی دو دسته از قارچ های ساپروفیت و درماتوفیت بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: تهیه عصاره گیاهی

عصاره متانولی به منظور استخراج سیلی‌مارین از دانه‌های گیاه خارمریم تهیه شد (۲۳،۲٤). برای این منظور مقدار ۳ گرم از دانه‌های خشک شده در داخل یک هاون چینی ساییده شدند، سپس جهت روغن‌گیری به مدت ۱۰ ساعت در حلال پترولئوم اتر در سوکسله قرار گرفتند. پس از جداسازی روغن، نمونه‌ها کاملاً خشک شده و به مدت ۱٦ ساعت با استفاده از متانول جهت استخراج فلاونولیگنان‌ها در دستگاه سوکسله قرار گرفتند. محلول متانولی زرد رنگ حاصل به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از تبخیر متانول پودر زردرنگی به دست آمد. پودر حاصل در متانول حل و جهت بررسی کیفی و کمی فلاونولیگنان‌ها در شرایط تاریکی و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بـه منظور تهیه حجم هـای یکسان از عصاره که حاوی غلظت های متفاوتی باشند، غلظت های متوالی ٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره متانولـی آماده شد. بـا استفاده از غلظت هـای متوالی، دیسک های حاوی ۱/٦، ۳/۲، ۷/۵، ۱۵، ۳۰، ٦۰ میلی گرمی از عصاره و هم چنین محیط هـای کشت دارای غلظت عصـاره بـه میزان ۱/۵، ۳/۱، ٦/۲، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد.

۲-۲: اندازه گیری فلاونولیگنان های عصاره به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

اندازه گیری فلاونولیگنان های عصاره استخراج شده به روش حسنلو و همکاران (۲۰۰٤) با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره که به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده بود به دستگاه (Knauer، آلمان) تزریق شد و با فاز متحرک متانول، استونیتریل و آب با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون Nucleosil C_{18} به قطر ذرات ۵ µ و ابعاد ۱۵۰×٤/٦ mm عبور کرده و در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و شناسایـی شدند. کـل زمان هـر تجـزیه ۳۰ دقیقه بـود.

منحنی های مربوط به ترکیبات فلاونولیگنان عصاره متانولی خار مریم با سیلی‌مارین استاندارد (سیگما) مقایسه و محاسبه شد (۲۵).

۳-۲: تهیه سویه های قارچی

قارچ های مورد مطالعه از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا شدند. نمونه ها پس از بررسی مستقیم میکروسکوپی توسط پتاس ۱۵٪ و خالص سازی کلنی ها در محیط های سابورد دکستروز آگار و کرمیل آگار شناسایی و خالص شدند.

٤-۲: محیط های کشت مصرفی

به منظور کشت قارچ ها ازمحیط های Dermatophytes , Dextros Broth (SDB) Selective Agar (DTM) Sabouraud و Sabouraud Dextros Agar (SDA) استفاده شد. محیط ها طبق دستور شرکت تولید کننده آماده و توسط اتوکلاو سترون شدند (مرک، آلمان).

۵-۲: روش های بررسی اثرات ضد قارچی

در روش دیسک گذاری سوسپانسیون قارچی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۵۸۰ نانومتر با ۹۰ در صد عبور آماده شد. غلظت مورد استفاده ^{٦} ۱۰×۱ بود (۲٦) که به ارلن حاوی محیط کشت آماده و سترون شده با دمای ٤۵ درجه سانتی گراد افزوده گردید. محیط حاوی قارچ رشته ای در پلیت ریخته شد. لازم به ذکر است که قارچ مخمری کاندیدا آلبیکنس با کدورت ۰/۵ مک فارلند آماده گردید و به صورت سطحی کشت داده شد.

جهت بررسی اثر ضد قارچی در روش دیسک گذاری، از هر غلظت عصاره متانولی (٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰و۲۰۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) به میزان ۳۰ میکرولیتر بر روی دیسک های خام کاغذی (پادتن طب) قرار داده شد. دیسک ها بعد از خشک شدن و تبخیر کامل حلال با رعایت فاصله مناسب بر روی محیط کشت حاوی قارچ قرار گرفتند. در هر آزمون دیسک شاهد حاوی متانول و فاقد عصاره خالص بود.

برای بررسی اثر عصاره در روش کشت آمیخته (پورپلیت) میزان معینی از غلظت های متوالی عصاره به محیط کشت افزوده شد. به این منظور ۰/۵ میلی لیتر از هر محلول عصاره در کنار شعله به درون پلیت ریخته و سپس ۲۰ میلی لیتر از محیط (DTM و SDA) استریل، قبل از سرد شدن کامل به آن اضافه گردید. ظروف پتری به آرامی در جهت های متفاوت حرکت داده شدند تا عصاره به طور یکنواخت و به خوبی در محیط کشت پخش شد. پس از سرد شدن محیط کشت، ابتدا در شرایط کاملا" سترون بر روی آن بصورت ستاره برش داده سپس قارچ های رشته ای به صورت نشاء کاری توسط آنس استریل در داخل خراش ها و روی سطح محیط قرار گرفتند. قارچ مخمری کاندیدا آلبیکنس به صورت سطحی در محیط (SDA) کشت داده شد. برای هر قارچ به عنوان شاهد، یک پلیت فاقد عصاره و حاوی متانول و هم چنین یک پلیت دارای کلوتریمازول با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر نیز کشت داده شد.

پلیت های حاوی قارچ های رشته ای به مدت ۷ الی ١٤ روز و پلیت کاندیدا آلبیکنس برای ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و از نظر رشد قارچ ها یا عدم رشد بررسی شدند. لازم به ذکر است که هر کدام از آزمایشات حداقل ۳ بار به طور جداگانه تکرار شد.

بررسی غلظت های عصاره بر رشد قارچ های رشته ای با استفاده از محیط مایع RPMI 1640 مطابق روش NCCLS انجام شد (۲۷). تغییرات درصد عبور نور در لوله ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۸۰ نانومتر پس از اضافه کردن عصاره و همچنین بعد از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ^{oC}۳۵ خوانده و مقایسه شدند (۲۸).

برای انجام آزمونهای آماری از نرم افزار SAS استفاده شد و اختلاف آماری در طرح بلوک های کامل تصادفی با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد محاسبه شد.

۳- نتایج

شناسایی و اندازه گیری فلاونولیگنان‌های عصاره متانولی به روش HPLC حاکی از حضور سیلی مارین به میزان ۰/۰۱ ±۲۲/۷۲۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک در دانه‌های گیاه خار مریم بود. در این روش مقادیر سیلیبین A (۰۰۸± ۱/۲٤۲۰)، سیلیبین B (۰۰۸± ٤/٤۹٤۰)، ایزوسیلیبین A (۰/۰۵±۳/۸۹۲)، ایزوسیلیبین B (۰/۰۲±۲/۷۵۹)، سیلی‌دیانین (۰/۰۱± ٤/٦۷۳)، سیلی‌کریستین (۰۰٤± ۳/۱٦٦) و تاکسی‌فولین (۰/۰۰٤±۲/۵۱۷) تعیین شد (شکل ۱).

جهت بررسی اثر ضد قارچی عصاره متانولی دانه گیاه خار مریم مقادیر مختلف عصاره در روش های دیسک گذاری و پورپلیت مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از این تحقیق در روش دیسک گذاری در مورد هر پنج قارچ مورد بررسی بیانگر این مطلب بود که بیشترین هاله مهار رشد به قطر ۱۲ میلی متر مربوط به قارچ های میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم در اطراف دیسک ٦۰ میلی گرمی بود. میزان هاله مهار رشد در دیسک های حاوی ۳۰ و ۱۵ میلی گرم از عصاره در کشت قارچ میکروسپوروم

کانیس به ترتیب ۱۰ و ۸ میلی متر و در کشت قارچ اپیدرموفایتون فلوکوزوم به ترتیب ۹ و ۷ میلی متر بود. میزان هالـه مهار رشد در دیسک هـای حاوی ٦۰ و ۳۰ میلی گرم از عصاره در کشت قارچ ترایکوفایتـون منتاگروفایتیس بـه ترتیب ۷ و ۵ میلی متر بود. در سایر غلظت های استفاده شده از عصاره در تمام کشت های قارچ های فوق الذکر هاله مهار رشد مشاهده نشد. همچنین در مورد قارچ های آسپرژیلوس نایجر و کاندیداآلبیکنس نیز هاله مهار رشد مشاهده نشد (شکل۲). میزان هاله عدم رشد در کشت قارچ های میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم در غلظت های ۱۵، ۳۰ و ٦۰ میلی گرم تفاوت معنی دار نداشت. در حالیکه میزان هاله عدم رشد در کشت قارچ ترایکوفایتون منتاگروفایتیس در غلظت های ۳۰ و ٦۰ میلی گرم از عصاره اختلاف معنی دار داشت و همواره کمتر از هاله عدم رشد در کشت قارچ های میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم بود (شکل۲).

در روش کشت آمیخته محیط های حاوی عصاره تاثیر مثبت قابل ملاحظه ای بر ممانعت از رشد قارچ های رشته ای که به صورت نشا کاری کشت داده شده بودند داشتند. عصاره موجود در محیط حتی در غلظت ۱/۵٦ ($mg\ ml^{-1}$)، در جلوگیری از رشد قارچ های میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم تاثیر داشته است.

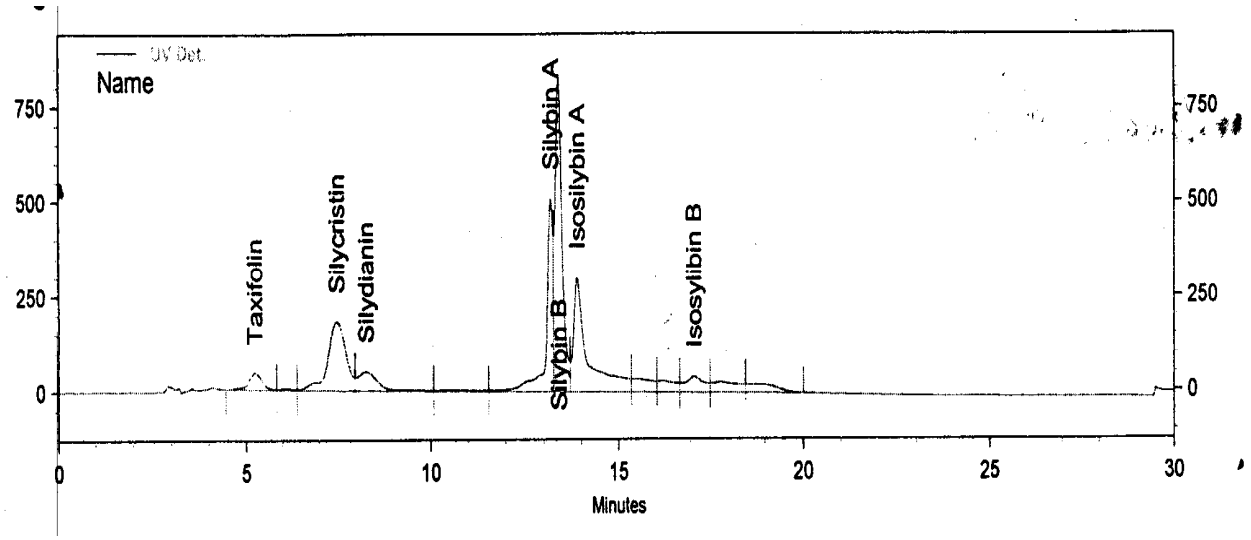
نتایج نشان داد که حضور عصاره مانع از رشد قارچ ترایکوفایتون منتاگروفایتیس شده در حالیکه در محیط کنترل (بدون عصاره) از رشد کافی برخوردار بود. در این روش اثر ضد قارچی قابل توجه ای از عصاره متانولی دانه های خار مریم بر رشد قارچ های ساپروفیت به خصوص آسپرژیلوس نایجر مشاهده نشد (جدول ۱). در محیط های حاوی کلوتریمازول، حضور این ماده موجب جلوگیری از رشد قارچ های میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفایتون فلوکوزوم و ترایکوفایتون منتاگروفایتیس شد (جدول ۱).

نتایج مطالعات انجام شده بر روی درماتوفیت ها نشان داد که حداقل غلظت مهار کننده (MIC) در مورد میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم ٦/۲ میلی گرم در میلی لیتر و برای ترایکوفایتون منتاگروفایتیس ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بود.

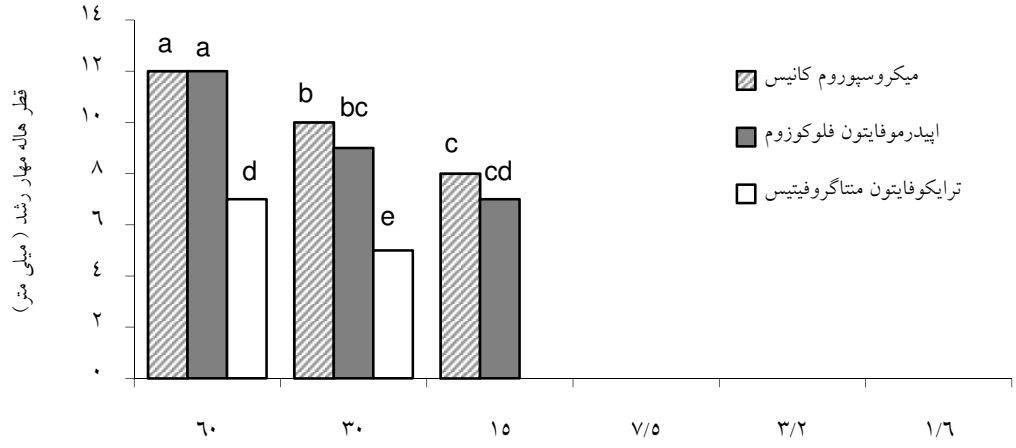
جدول ۱. تاثیر غلظتهای عصاره متانولی دانه گیاه خار مریم و کلوتریمازول بر رشد قارچ های رشته ای در روش کشت آمیخته

نام قارچ	کلوتریمازول (۱۰ µg ml-1)	شاهد (فاقد عصاره)	غلظت (mg ml -1) ۵۰	۲۵	۱۲/۵	٦/۲۵	۳/۱۲	۱/۵٦
میکروسپوروم کانیس	+++	–	+++	+++	+++	+++	++	++
اپیدرموفایتون فلوکوزوم	+++	–	+++	+++	+++	+++	++	++
ترایکوفایتون منتاگروفیتیس	+++	–	+	+	+	+	+	+
آسپرژیلوس نایجر	–	–	–	–	–	–	–	–

+++ عدم رشد قارچ ++ مهار نسبی رشد قارچ در مقایسه با نمونه شاهد (بیش از ۷۰٪) + رشد کم قارچ – رشد کامل میسلیوم قارچ در محیط



شکل ۱. کروماتوگرام Hplc عصاره متانولی از دانه گیاه خارمریم



شکل ۲. میانگین قطر هاله های مهار رشد درماتوفیت ها (میلی متر) در حضور عصاره گیاه خار مریم در روش دیسک گذاری. حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار (سطح۰/۰۵) می باشد.

٤- بحث

هدف اصلی در انجام این تحقیق بررسی تاثیر عصاره متانولی دانه گیاه خار مریم بر روی عوامل قارچی درماتوفیت و ساپروفیت در ایزوله های بالینی در مقایسه با داروی کلوتریمازول بـود.

بـرای ایـن منظور علاوه بـر ایزوله های بالینی، از داروی کلوتریمازول نیز که معمولا در درمان عفونت های قارچـی پوست و ضمایـم آن مصرف می شود، استفاده شد. به طور کلی تاثیر غلظت های مختلف عصاره گیاهی بر قارچ ها و

مقایسه آن با نمونه شاهد و کلوتریمازول، بیانگر این مطلب است که حضور عصاره مانع از رشد قارچ های آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس نمی شود اما غلظت های اندک عصاره در جلوگیری از رشد و گسترش قارچ های درماتوفیت موثر بوده است.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که حساس ترین درماتوفیت های مورد مطالعه نسبت به عصاره، میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم بودند. بررسی اثر عصاره متانولی دانه گیاه خار مریم بر رشد قارچ های مورد آزمون نشان داد که در روش دیسک گذاری اثر بازدارندگی فقط در غلظت های بالا قابل مشاهده بود، اما در روش کشت آمیخته عصاره در غلظت های اندک نیز دارای اثر ضد قارچی علیه درماتوفیت ها بود.

نتایج حاصله از تاثیر بیشتر عصاره متانولی در روش کشت آمیخته نسبت به روش دیسک گذاری بیانگر این مطلب است که مواد موثره موجود در عصاره به علت عدم حلالیت کامل در محلول های آبی، از قابلیت پخش و انتشار کمتری برخوردار می باشند. به همین جهت در روش دیسک گذاری این ماده شیمیایی به علت تبخیر حلال، توانایی انتشار کامل از دیسک های کاغذی به محیط کشت را ندارد. بنابراین عدم رشد نسبت به روش دیگر کمتر می باشد. به نظر می رسد در روش کشت آمیخته که عصاره بصورت مایع و محلول در متانول به محیط کشت اضافه و رقیق می شود از قابلیت انتشار بالایی بر خوردار است. در نهایت حتی مقادیر کم عصاره به علت پخش شدن کامل در محیط کشت به صورت قابل توجه ای از رشد و گسترش میسلیوم های قارچی جلوگیری می کند.

در مقایسه عصاره متانولی گیاه خار مریم با داروی کلوتریمازول مشخص شد که حضور ٦/٢ میلی گرم در میلی لیتر عصاره برای جلوگیری از رشد قارچ های میکروسپوروم و اپیدرموفایتون اثری معادل با ۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر کلوتریمازول داشت. البته باید توجه داشت که داروی شیمیایی نسبت به عصاره گیاهی دارای خلوص بالاتری می باشد.

ترکیبات اصلی موجود در عصاره گیاه خار مریم شامل پلی فنل های پانزده کربنه متشکل از سیلی بین، سیلی دیانین، سیلی کریستین، ایزوسیلی بین و یک پیش ساز به نام تاکسی فولین می باشند (۱۱).

بنابراین احتمال می رود که اثر ضد قارچی مشاهده شده مربوط به یکی از این ترکیبات باشد. جهت اطمینان از اینکه اثر ضد قارچی مربوط به کدام ترکیب موجود در عصاره می باشد به بررسی بیشتری نیاز خواهد بود. برای این منظور لازم است تاثیر اجزاء تشکیل دهنده عصاره گیاهی، بر روی سویه های مختلف قارچ ها در مقایسه با داروهای رایج بررسی شود تا با جدا سازی ترکیبات ضد قارچی خالص بتوان به نتایج بهتری دست یافت.

مطالعه سانگوئینتی و همکاران (۲۰۰۷) در مورد تاثیر اسانس گیاه Citrus bergamia بر درماتوفیت های جدا شده از عفونت های بالینی، نشان داد که داروی شیمیایی نسبت به اسانس گیاهی اثر بیشتری داشت، اما تاثیر ضد قارچی یکی از ترکیبات موجود در عصاره تقریبا برابر با اثر داروی استاندارد بود (۲۹).

مقیمی پور و همکاران (۲۰۰۷) اثر عصارهٔ گیاه Zataria multiflora (دارای ترکیبات فنلی) بر قارچ های میکروسپوروم و ترایکوفایتون را ۰/۵ گرم بر صد میلی لیتر گزارش کردند (۳۰). مانوهار و همکارانش اثر مهار کنندگی اسانس مرزنجوش را بر روی برخی از قارچ ها نشان دادند (۳۱). این در حالی است که وجود ترکیبات فنلی با خواص آنتی اکسیدانی و ارتباط آن با اثرات مذکور گزارش شده است (۳۲). اثر ضد قارچی عصاره گیاه خار مریم (Silybum marianum) بر درماتوفیت ها در مقایسه با گیاهان دیگر مانند: Allium sativum, Juglans regia, Piper betle, Azadirachta indica به مراتب بیشتر می باشد (۳۳،۳٤).

نتایج لی و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که اثرات بازدارندگی سیلی بین مربوط به سنتز RNA و پروتئین برخی از پروکاریوت ها می باشد (۳۵). داروهای خانواده ترکیبات آزولی از جمله کلوتریمازول دارای فعالیت بیولوژیکی وسیعی علیه درماتوفیت ها می باشند.

امروزه کرم موضعی حاصل از این ترکیبات با غلظت یک درصد که معادل ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر می باشد مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش استفاده از غلظت ٦/٢ میلی گرم در لیتر برای کنترل رشد قارچ های درماتوفیت (میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم) موثر می باشد.

۵- نتیجه گیری

با توجه به تاثیر مثبت عصاره متانولی گیاه خار مریم (غلظت ٦/٢ میلی گرم در میلی لیتر) در مهار رشد قارچ های رشته ای به خصوص اپیدرموفایتون فلوکوزوم و میکروسپوروم کانیس پیشنهاد می شود که DNA و RNA و پروتئین قارچ های مورد مطالعه استخراج و در حضور و عدم حضور سیلی مارین یا اجزاء فلاونولیگنان تشکیل

دهنده آن بررسی شونـد. هم چنین بـرای بهره گرفتن در مصارف درمانـی، اثـر بخشی عصاره دانـه گیاه فـوق در پایه کـرم یـا پماد در محیط in vivo نیز بایـد مـورد ارزیابی قرار گیرد.

٦- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کـه در تامین امکانات لازم جهت انجام پروژه (۸٦۰۰۷-۰۵-۰۵-۲) ما را یاری نمودند سپاسگزاری می نماییم.

Refrences:

1. Kokoska L., Polesny Z., Rada V., Nepovim A., Vanek T., Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity, *J Ethanopharmacol*., 2002, 82: 51-3.
2. Eisenberg D.M., Davids R.B., Ernst S.l., Apple S., Wilkey S., Van Rompay M., et al., Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997, Results of a follow – up national survey., *JAMA*., 1998, 280: 1569-75.
3. Mahon R., Manuselis G., Textbook of diagnosis microbiology. 2 nd edition. Philadelphia: WB Saunders, 2000.
4. Elewski BE, Tinea capitis: a current perspective., *J. Am. Acad. Dermatol*., 2000, 42: 1-20.
5. Rastegar Lari A., Akhlaghi L., Falahati M., Alaghehbandan R., Characteristics of dermatophytoses among children in an area south of Tehran, Iran**.,** *Mycoses*., 2005, 48: 32-37.
6. Pakshir K., Hashemi J., Dermatophytosis in Karaj, Iran. *Indian J. Dermato*., 2006, 51: 262-264.
7. Aghamirian M. R., Ghiasian S. A., Dermatophytoses in outpatients attending the Dermatology Center of Avicenna Hospital in Qazvin, Iran., *Mycoses*., 2007, 51: 155-160.
8. Hay R.J., Moor M.K., Mycology. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. Rook,s textbook of dermatology. Vol. 2, 7 th ed. USA: Black Well Science 2004, 3160-3175.
9. Zaini A., Mehbod A., Emami M., Comprehensive medical mycology, Tehran University Press. Iran. 2004.
10. Hasanloo T., Khavari Nejad R.A. and Majidi E., Evaluation of phenotypic coefficient and flavonolignan content in dried fruits of cultivated and endemic *Silybum marianum* (L.) Gaertn., Journal of Medicinal Plants., 2007, 22: 77-90.
11. Samuelsson G., Drugs of natural origin. 4th revised edition. Swedish pharmaceutical press, Stockholm, Sweden. 1999, 226-233.
12. Narayana K.R., Sripal R., Chaluvadi M.R., and Krishan D.R., Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol*., 2001, 33: 2-6.
13. Kren V., Ulrichova J., Kosina P., Stevenson D., Sedmera P., Prikrylova V., et al., Chemoenzymatic preparation of silybin β- glucoronides and their biological evaluation., *Drag Metab Dispos*., 2000, 28: 1513-1517.
14. Katiyar S.K., Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light- induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin, *Int. J. Oncol*. 2002, 21: 1213-1222.
15. Ding T.M., Tian S.J., Zhang Z.X., Gu D.Z., Chen Y.F., Shi Y.H., et al., Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J. Pham. Biochem. Anal*., 2001, 26: 155-161.
16. Schonfeld J.V., Weisbrod B., and Muller M.K., silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties, protects exocrine panceas from cycloporin A toxicity, CMLS cellular and Molecular life sciences, 1997, 53: 917– 920.
17. Schuppan D., Jia J.D., Brinkhaus B ,. and Ahn EG., Herbal products for liver disease , *Hepatology* , 1999, 4: 1099 – 1104 .
18. Sonnenbichler J., Scaleram F., sonnenbichler I., and Weyhenmeyer R, Stimulatory effects of silibinin and silichristin from the Milk thistle silybum marianum on Kidney cells, The J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1999, 290: 1375 – 1383.
19. Rajendra Prasad N., Anandi C., Balascubramanian S., Pugalendi KV., Antidermatophytic activity of extracts from Psoralea corylifolia (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound, J. Ethnopharmacol., 2004, 91: 21-24.
20. Kosalec I., Pepeljnjak S., Kustrak D., Antifungal activity of fluid extract and essential oil fromanise fruits (Pimpinella anisum L., Apiaceae), Acta Pharm., 2005, 55: 377–385.
21. Sharma B., Kumar P., In vitro antifungal potency of some plant extracts against Fusarium oxysporum., Int. J. Green Pharm., 2009, 3: 63-65.
22. Fardos M., Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia. Mycopath, 2009, 7(1): 51-57.
23. Briskin D.P., Medicinal plants and phytomedicines. linking plant biochemistry and physiology to human health, Plant Physiol., 2000, 124: 507-514.
24. Hasanloo T., Khavari – Nejad RA , majidi E ., Shams – Ardakani M.R., Analysis of flavonolignans in dried fruits of *Silybum marianum* (L) , Gaerth from Iran, *Pak. J. Biol. Sci.*, 2005, 8 : 1778 – 1782 .
25. Hasanloo T., Khavari-Nejad A., majidi E., Ziai SA., Shams- Ardakani MR,. Determination of flavonolignan of dried fruits of *Silybum marianum* L. Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC, *J. Med. Plants*, 2004, 4: 25-32.

26. Koneman E.W., Roberts G.D., Pictorial Laboratory Mycology, 3rd ed, William & Wilkins, 1985; 44-45.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.
28. Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmstrom A., *In vitro* Susceptibility testing of filamentous funji: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining iraconazole MICs, *J. Clin. Microbiol*., 2000, 38: 3359-61.
29. Sanguinetti M., Posteraro B., Romano L., Battaglia F., Lopizzo T., et al In vitro activity of *Citrus bergamia* bergamot oil against clinical isolates of dermatophytes**,** *J. Antimicrob. Chemother.,* 2007, 59: 305-308.
30. Moghimipour E., Aghel N., Ameri A., Saadatzadeh A., Formulation of anti- dermatophyte cream from hydro-alcoholic extract of *Zataria multiflora*. *Iranian J. Basic Med. Sci*., 2007, 10: 8-14.
31. Manohar V., Ingram C., Antifungal activities of origanum oil against candida albicans , *J. Physiol. Biol.,* 2001, 228 : 111 – 117.
32. Zeng W., Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agri. food chem.,* 2001, 49: 5165-5170.
33. Trakranrungsie N., Chatchawanchonteera A., Khunkitti W., Ethnoveterinary study for antidermatophytic activity of piper betle, Alpinia galangal and Allium ascalonicum extracts in vitro, *Res. Vet. Sci. doi*., 2007, 10.1016/ j.rvsc.03.006.
34. Natarajan V., Venugopal PV., Menon T., Effect of Azadirachta indica on the growth pattern of dermatophytes, *Indian J. Med. Microbiol*., 2003, 21: 98-101.
35. Lee D.G., Kim H.K., Park Y., Park S., Woo E.R., Jeong H.G., et al., Gram-Positive Bacteria Specific Properties of Silybin Derived from *Silybum marianum*. *Arch Pharm. Res.,* 2003, 26: 597-600.