بررسی مقایسه اثرات ضدقارچی عصاره‌های مختلف گیاه *Onosma Chlorotricum* بر قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا با دو آنتی‌بیوتیک فلوکونازول و نیستاتین

فاطمه نبی‌پور*[1]، بهروز دوستی[2]

۱- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۱ / بهار ۹۷ / مسلسل ۷۵

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۱۷ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۱/۲۸

مقدمه: با توجه به عود عفونت‌های کاندیدایی و مقاومت آن‌ها به داروهای ضدقارچی در طی درمان و نیز عوارض شناخته شده داروهای شیمیایی و وجود بعضی تحقیقات مبنی بر اینکه جنس *Onosma* حاوی مشتقات آلکانین و شیکونین بوده که دارای خواص ضدقارچی می‌باشند، برای اولین بار خواص ضدقارچی گیاه *Onosma Chlorotricum* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: گیاه مذکور در اواسط تیرماه از شهرستان کوهدشت جمع‌آوری و پس از شناسایی و خشک کردن، عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی به روش خیساندن تهیه شد. اثرات ضدقارچی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک و MIC (حداقل غلظت ممانعت از رشد)، MFC (حداقل غلظت قارچ‌کشی) به روش میکرودایلوشن بررسی شد. آنتی‌بیوتیک فلوکونازول و نیستاتین به عنوان کنترل مثبت، DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. داده‌ها توسط آزمون t و واریانس یک‌طرفه ANOVA آنالیز شدند.

یافته‌ها: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره ان-هگزانی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نیستاتین برای کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا می‌باشد ($P<0/05$). کمترین میزان MIC مربوط به عصاره ان-هگزانی برای کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا به ترتیب برابر با ۱۵/۶۲ µg/µl و ۳۱/۲۵ µg/µl، کمترین میزان MFC مربوط به عصاره ان-هگزانی برای کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا به ترتیب برابر با ۳۱/۲۵ µg/µl و ۶۲/۵ µg/µl می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره‌های این گیاه اثر ضدقارچی مناسبی بر کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا نشان داد. بررسی احتمال کاربرد این عصاره در درمان عفونت کاندیدایی نیاز به اتمام مطالعات تکمیلی دارد.

واژه‌های کلیدی: فلوکونازول، نیستاتین، ضدقارچی، عصاره، *Onosma Chlorotricum*.

*آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

پست الکترونیک: nabipor.f@gmail.com

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

مقدمه

افزایش عفونت‌های قارچی ناشی از قارچ‌های بیماری‌زا و فرصت‌طلب، به ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی از اوایل دهه ۹۰، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر بخصوص در بیماران بستری در بیمارستان مطرح شده است. پاتوژن‌های فرصت‌طلب مهم مانند کاندیدا آلبیکنس و سایر گونه‌های کاندیدا در این میان نقش بسزایی دارند (۱). کاندیدا به عنوان یک قارچ فرصت‌طلب، عامل اصلی عفونت‌هایی از قبیل کاندیدیازیس واژینال است که حدود ۷۵ درصد از زنان در طول دوره زندگی به آن مبتلا می‌شوند (۲). هم‌چنین احتمال ابتلاء به عفونت‌های پوستی، واژینیت، عفونت‌های روده‌ای و سیستمیک را به دلیل درمان‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی و استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌دهد (۳). سویه‌های کاندیدا هم‌چنین به عنوان چهارمین عامل عفونت‌های خونی بیماران بستری شده در بیمارستان‌ها مطرح شده و موجب مرگ‌ومیر ۴۰ درصد از بیماران شده است (۴). از گونه‌های شایع عامل واژینیت کاندیدایی می‌توان به کاندیدا آلبیکنس و گونه‌های کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزی اشاره نمود (۵). جهت درمان واژینیت کاندیدایی از داروهای ضدقارچی گروه آزول استفاده می‌شود که عمدتاً با مهار آنزیم وابسته به سیتوکروم P_{450} در سطح غشاء سلول عمل می‌کنند. رایج‌ترین این داروها کلوتریمازول و پس از آن میکونازول، کتوکونازول و فلوکونازول (۶) و داروهای پلی‌ان (نیستاتین) نیز استفاده می‌شود، ولی بررسی‌های مختلف مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا را نسبت به داروهای ضد قارچی نشان می‌دهد (۷). داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون‌های متفاوت برای درمان در دسترس است اما به دلیل بی‌پاسخی نسبت به درمان، بیماری به اشکال مزمن یا حاد تبدیل شده و گاهی عودهای مکرر دیده می‌شود (۸،۹). گستردگی بیماری‌های قارچی فرصت‌طلب در افراد مستعد، افزایش دوز مصرفی داروهای متداول و به دنبال آن افزایش عوارض جانبی اثر داروها، هم‌چنین افزایش روزافزون مقاومت دارویی، موجب شده است تا استفاده از منابع جدید به‌خصوص گیاهان دارویی حائز اهمیت باشد (۱۰). گیاهان دارویی با طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه مانند تانن‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و غیره خواص ضد میکروبی را در محیط آزمایشگاهی نشان می‌دهند (۱۱).

جنس *Onosma* متعلق به خانواده گل گاوزبان دارای ۱۵۰ گونه عمدتاً در غرب، مرکز آسیا و در ناحیه مدیترانه‌ای رشد می‌کند که ۴۷ گونه آن در ایران انتشار دارد (۱۲)، اما مطالعات جدید تعداد گونه‌های این جنس را به ۲۳۰ گونه افزایش داد (۱۳).

گونه *Onosma Chlorotricum* گیاهانی چند ساله، پوشیده از کرک‌های سفید با قاعده برجسته و با کرک‌های ریز روی قاعده برجسته، ساقه‌های متعدد، افراشته، به طول ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر، جام گل استوانه‌ای استکانی، سفید می‌باشد که محل رویش آن در شمال غرب، غرب و مرکز گزارش شده است (۱۴).

ریشه این جنس دارای شیکونین و آلکانین (۱۵)، خواص ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی (۱۶)، ضد توموری (۱۷) و اثرات ضد سرطانی (۱۸)، بهبود زخم (۱۹)، ضد ویروسی (۲۰،۲۱) ضد میکروبی و خواص ضدقارچی می‌باشند (۲۲،۲۳). از طرفی دیگر، بخش هوایی آن‌ها دارای آلکالوئید پیرولیزیدین (۲۴،۲۵) و ترکیبات فنولی می‌باشند (۲۶). گونه‌های این جنس حاوی متابولیت‌های ثانویه از قبیل آلکالوئیدها، نفتوکوئینون‌ها، پلی‌فنل‌ها، فیتواسترول‌ها، ترپنوئیدها و اسیدهای چرب هستند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهند (۲۷)؛ که نسبت انانتیومرها و مشتقات استریفیه شده آنها در گونه‌های مختلف با هم متفاوت است (۲۸). گونه *Onosma Chlorotricum* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی،

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

ضد التهابی و ترکیبات فنولی، ترپنوئیدی، فنیل پروپانوئیدی و ساختار نفتاکینونی و مشتقات آلکانین و شیکونین می‌باشد (۲۹).

با توجه به اینکه در استان لرستان به صورت سنتی و بومی از جوشانده و دم‌کرده گیاه *Onosma Chlorotricum* با نام محلی تشنه‌داری برای درمان عفونت‌های سطحی و عمقی و هم‌چنین عفونت‌های واژینال استفاده می‌شود، اما تاکنون تحقیقی بر روی خواص ضد میکروبی این گیاه انجام نشده است.

هدف از انجام این پژوهش که برای اولین بار انجام شده، بررسی اثر ضد کاندیدایی عصاره‌های مختلف ان-هگزانی، متانولی و آبی *Onosma Chlorotricum* در مقایسه با داروهای فلوکونازول و نیستاتین بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا به منظور دستیابی به ترکیب ضدقارچی جدید با عوارض جانبی کمتر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در اواسط تیرماه سال ۱۳۹۵ گیاه تشنه‌داری از شهرستان کوهدشت جمع‌آوری شده و پس از تأیید گیاه‌شناسی به عنوان گونه *Onosma Chlorotricum* از جنس *Onosma* و خانواده گل گاوزبان شناسایی شد. پس از تمیز کردن، قسمت‌های برگ، ساقه و ریشه گیاه در سایه خشک شده، سپس با آسیاب برقی آسیاب و پودر حاصله برای عصاره‌گیری استفاده شد.

عصاره‌گیری، از روش خیساندن و در سه مرحله مجزا و با سه حلال ان-هگزانی، متانولی و آبی انجام شد. در این روش ۵۰ گرم پودر گیاه به طور جداگانه داخل سه ظرف شیشه‌ای تیره ریخته و به هرکدام از آن‌ها ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال ان-هگزان، متانول و آب افزوده شد، بعد از ۷۲ ساعت محتویات ظرف با عبور دادن از کاغذ صافی واتمن جدا گردید. با کمک دستگاه حذف حلال در خلاء (روتاری) عصاره‌ها تغلیظ شده و برای خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خشک شدن، عصاره‌ها تا زمان انجام آزمایش در ظروف دربسته، دور از نور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

سوش استاندارد میکروبی جهت انجام مطالعات فوق کاندیدا آلبیکنس (ATCC ۱۰۲۳۱) و کاندیدا گلابراتا (PTCC ۵۲۹۷) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. برای کشت قارچ‌ها از محیط کشت سابرو دکستروز آگار استفاده شد و جهت بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی گیاه از روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن استفاده گردید.

بررسی فعالیت ضدقارچی به روش انتشار دیسک (Disk Diffusion)

به منظور تعیین خاصیت ضدقارچی، ۶ غلظت ۱۰ تا ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های ان- هگزانی، متانولی و آبی در حلال دی متیل سولفوکساید ۵٪ تهیه و با استفاده از فیلترهای به قطر ۰/۴۵ میکرون استریل گردید.

سویه‌های قارچ روی سابرودکستروز آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند، ۲-۳ کلنی از کشت شبانه هر سویه میکروبی به سرم فیزیولوژی استریل افزوده شد و کدورت آن با ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید.

سوسپانسیون قارچی بر روی سابرو دکستروز آگار تلقیح گردیده، سپس دیسک‌های کاغذی استریل ۶ میلی‌متری حاوی ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره که در حلال دی متیل سولفوکساید ۵٪ حل شده، روی محیط کشت قرار داده شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک فلوکونازول، نیستاتین به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی‌متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس پلیت‌های قارچی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر با استفاده از

Arhive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

کولیس با دقت ۰/۰۰۱ برحسب دهم میلی‌متر اندازه‌گیری شد و هر سنجش سه بار تکرار گردید.

تعیین MFC،MIC

به منظور تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) یا حداقل غلظت ممانعت از رشد و MFC (Minimum fungicidal concentration) یا حداقل غلظت قارچ‌کشی عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی گیاه از روش میکرودایلوشن استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا در میکروپلیت ۹۶ خانه به مقدار مساوی ۹۵ میکرولیتر محیط سابرو دکستروز ریخته شد (۳۰،۳۱). به چاهک اول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره‌های مورد نظر اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه نموده به این ترتیب تا لوله آخر سری رقتی تهیه شد که رقت عصاره‌ها در هر لوله نصف لوله ماقبل است این کار را تا چاهک شماره ۱۲ ادامه داده و بعد از چاهک شماره ۱۱، ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد، به طوری‌که غلظت نهائی عصاره‌ها در چاهک‌ها از ۱۰۰۰ تا ۱/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. سپس به تمام چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره ۱۲، ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون قارچی $1/5\times10^{8}$ Cfu/ml تلقیح شد به طوری‌که چاهک شماره ۱۱ هر میکروپلیت حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار حاوی قارچ‌ها بدون عصاره به عنوان کنترل مثبت و چاهک شماره ۱۲ هر میکروپلیت حاوی محیط سابرو دکستروز و عصاره بدون قارچ‌ها به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از بسته شدن درب، میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت برای قارچ‌ها انکوبه گردیدند. آنگاه کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی خوانده و رشد یا عدم رشد قارچ‌ها در آنها مورد بررسی قرار گرفت. کمترین رقتی از عصاره‌ها که هیچ کدورتی در آن ایجاد نشده بود معادل MIC قرار داده شد.

جهت تعیین حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی، از چاهک‌های فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده بود و چاهک‌های دارای کدورت به کمک لوپ استریل بر روی محیط سابرو دکستروز آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. کمترین غلظتی از عصاره‌ها که قارچ در آن رشد نکرده بود به عنوان MFC در نظر گرفته شد. در این مطالعه تأثیر عصاره‌های مورد آزمایش روی نمونه استاندارد ۳ مرتبه تکرار شد.

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way-ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تی در سطح احتمال ($P<0/05$) صورت گرفت. از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ برای آنالیز آماری و Excel برای رسم نمودار استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، دو سویه قارچی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا انتخاب و فعالیت ضدقارچی عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی در ۶ غلظت از ۱۰ تا ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از دو روش کیفی (انتشار دیسک) و کمی (میکرودایلوشن) بررسی شد.

نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی *O.chlorotricum* و آنتی‌بیوتیک فلوکونازول و نیستاتین به عنوان شاهد مثبت و دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی در جدول ۱ و ۲ آمده است که هیچ هاله عدم رشدی اطراف دیسک دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی دیده نشد. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره ان-هگزانی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با دارا بودن مقادیر بالایی از میانگین قطر هاله

Arhive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

عدم رشد، فعالیت ضدقارچی بالایی را بر قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا نشان داد.

جدول ۱ نشان می‌دهد که میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره ان-هگزانی گیاه *O.chlorotricum* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس برابر ۰/۳±۱۸/۷ است که بیشتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نیستاتین ۰/۴±۱۸ می‌باشد که در سطح P<۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار است. البته قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک فلوکونازول ۰/۸۱±۲۵ میلی‌متر می‌باشد و قدرت مهار بیشتر آن را در قیاس با عصاره‌های مختلف گیاه مذکور نشان می‌دهد.

جدول ۱. مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه *Onosma Chlorotricum* بر کاندیدا آلبیکنس (بر حسب میلی‌متر)

غلظت mg/ml	ان-هگزانی	متانولی	آبی
۱۰	۱۸/۷ ±۰/۳	۱۷/۵ ±۰/۵	۱۵/۳۳ ±۰/۲۸
۵	۱۷/۳ ±۰/۵	۱۶ ±۰/۴	۱۴ ±۰/۲۸
۲/۵	۱۶ ±۰/ ۶۵	۱۵ ±۰/۷	۱۲/۷ ±۰/۴۷
۱/۲۵	۱۵ ±۰/۸	۱۴ ±۰/۴	۱۱/۳ ±۰/۵
۰/۶۲۵	۱۳/۵±۰/۵۷	۱۲/۶±۰/۵۴	۱۰ ±۰/۷
۰/۳۱۲	۱۲/۵ ±۰/۶	۱۱/۵ ±۰/۴	۹ ±۰/۳
فلوکونازول	۲۵ ±۰/۸۱	۲۵ ±۰/۸۱	۲۵ ±۰/۸۱
نیستاتین	۱۸ ±۰/۴	۱۸ ±۰/۴	۱۸ ±۰/۴
-	-	-	-

جدول شماره ۲ نشان می‌دهد که میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره ان-هگزانی گیاه *O.chlorotricum* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی قارچ کاندیدا گلابراتا برابر ۰/۸۶±۱۸/۵ است که بیشتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نیستاتین ۰/۵±۱۸/۲ می‌باشد که در سطح P<۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار است. ولی البته قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک فلوکونازول ۰/۶±۲۶ میلی‌متر می‌باشد و قدرت مهار بیشتر آن را در قیاس با عصاره‌های مختلف گیاه مذکور نشان می‌دهد؛ بنابراین می‌توان گفت تأثیر ضدقارچی عصاره ان-هگزانی گیاه در غلظت‌های بالا بیشتر از آنتی‌بیوتیک نیستاتین بوده است.

نتایج حاصل از MIC عصاره ان-هگزانی، متانولی و آبی گیاه *O.chlorotricum* برای کاندیدا آلبیکنس به ترتیب برابر با ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کاندیدا گلابراتا به ترتیب برابر با ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۲. مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه *Onosma Chlorotricum* بر کاندیدا گلابراتا (بر حسب میلی‌متر)

غلظت mg/ml	ان-هگزانی	متانولی	آبی
۱۰	۱۸/۵ ±۰/۸۶	۱۶ ±۰/۶	۱۴ ±۰/۵
۵	۱۶/۵ ±۰/۵	۱۴/۵±۰/۵	۱۳ ±۰/۴
۲/۵	۱۵ ±۰/۵	۱۳/۸ ±۰/۴	۱۱/۵ ±۰/۶
۱/۲۵	۱۴ ±۰/۶۸	۱۲/۵ ±۰/۴	۱۰/۳ ±۰/۵
۰/۶۲۵	۱۲/۶±۰/۴	۱۱/۳±۰/۵	۹ ±۰/۴۸
۰/۳۱۲	۱۱/۵ ±۰/۵	۱۰ ±۰/۵	۸ ±۰/۳
فلوکونازول	۲۶ ±۰/۶	۲۶ ±۰/۶	۲۶ ±۰/۶
نیستاتین	۱۸/۲ ±۰/۵	۱۸/۲ ±۰/۵	۱۸/۲ ±۰/۵
-	-	-	-

نتایج حاصل از MFC عصاره ان-هگزانی، متانولی و آبی گیاه *O.chlorotricum* برای کاندیدا آلبیکنس به ترتیب برابر با ۳۱/۲۵، ۳۱/۲۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کاندیدا گلابراتا به ترتیب برابر با ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳. میزان MIC و MFC عصاره‌های مختلف گیاه *Onosma Chlorotricum* بر قارچ‌های مورد آزمون بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

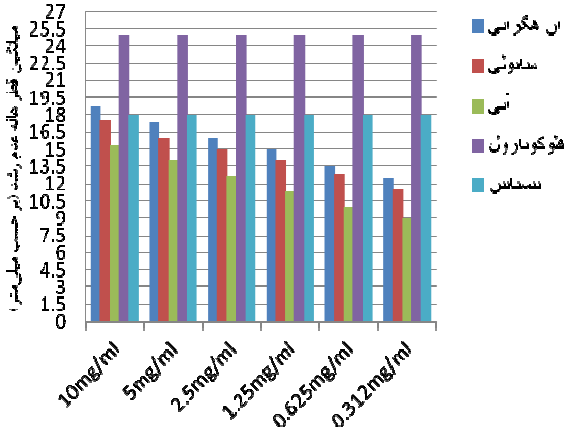
عصاره	ان- هگزانی		متانولی		آبی	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
کاندیدا آلبیکنس	۱۵/۶	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵
کاندیدا گلابراتا	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره ان-هگزانی اثرات ضد کاندیدایی بیشتری نسبت به عصاره متانولی و عصاره متانولی نیز اثرات ضد کاندیدایی بیشتری نسبت به عصاره آبی دارد که این اختلاف در سطح P<۰/۰۵ ازنظر آماری معنی‌دار بود (نمودار ۱ و ۲).

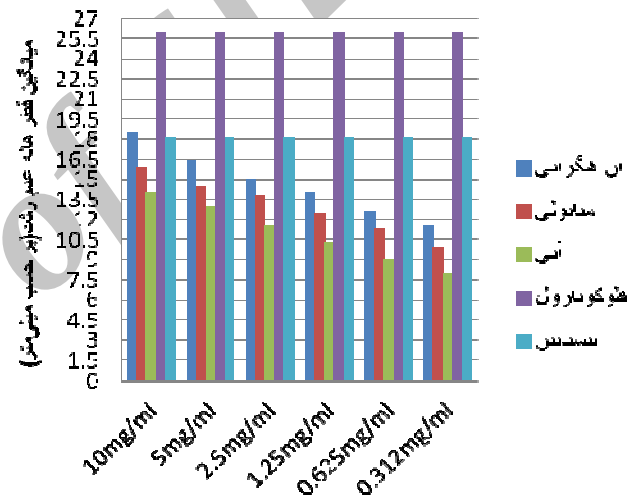
Arhive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018



نمودار ۱. مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف انواع عصاره‌های گیاه *O.chlorotricum* نسبت به آنتی‌بیوتیک بر قارچ کاندیدا آلبیکنس



نمودار ۲. مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف انواع عصاره‌های گیاه *O.chlorotricum* نسبت به آنتی‌بیوتیک بر قارچ کاندیدا گلابراتا

بحث و نتیجه‌گیری

گستردگی بیماری‌های قارچی فرصت‌طلب در افراد مستعد از یک‌سو و افزایش روزافزون مقاومت‌های دارویی و اثرات سوء آن از طرفی دیگر موجب اهمیت پژوهش در زمینهٔ بررسی آثار ضد قارچی گیاهان شده است.

اخیراً با توجه به اثرات جانبی و مقاومت دارویی آنتی‌بیوتیک‌ها، در پزشکی به عصاره‌ها و ترکیبات با خواص بیولوژیکی گونه‌های گیاهی توجه زیادی شده است. عصاره‌های گیاهی از زمان‌های قدیم برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۲). با توجه به سازگاری این مواد با بدن و اثرات دارویی مفید آن‌ها تحقیق بر روی اثرات ضدقارچی گیاهان در درمان بیماری‌ها، مفید است.

در این پژوهش با دو روش کیفی (انتشار چاهک) و کمی (میکرودایلوشن) نشان داده شد که عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی *O.chlorotricum* اثرات ضدقارچی نسبتاً بالایی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس نسبت به کاندیدا گلابراتا داشتند. در روش انتشار دیسک اندازه‌ی قطر هاله عدم رشد با مقدار غلظت عصاره‌های موردنظر نسبت مستقیم داشت ($P<0/05$) به‌طوری‌که با افزایش غلظت هر کدام از عصاره‌ها یا به‌عبارت‌دیگر با افزایش ماده مؤثره، قطر هاله عدم رشد به‌صورت معنی‌دار بیشتر شد. قارچ کاندیدا آلبیکنس با داشتن قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر در غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و مقدار MIC کوچک‌تر در مقایسه با قارچ کاندیدا گلابراتا نسبت به اثر عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی *O.chlorotricum* حساس‌تر است.

گیاه *O.chlorotricum* دارای ترکیبات آلکانین و شیکونین است که این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدان، ضد باکتریایی، ضدقارچی و ضد التهابی می‌باشند (۲۹) که نسبت انانتیومرها و مشتقات استریفیه شده آن‌ها در گونه‌های مختلف با هم متفاوت است، بنابراین می‌توان خاصیت ضدقارچی عصاره‌ها را به وجود این ترکیبات در عصاره‌ها نسبت داد.

در کل مطالعاتی در زمینهٔ بررسی اثر ضدقارچی گونه *O.chlorotricum* تاکنون صورت نگرفته است. در مطالعه‌ای که توسط احمد و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت، عصاره‌های اتانولی و کلروفرمی گونه *Onosma Khyberianum* بر روی سه سویه قارچی فوزاریوم اکسی سپورم، آلترناریا آلترناتا و آسپرژیلوس فلاووس اثرات ضدقارچی خوبی را نشان دادند (۳۳).

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

در مطالعه‌ای که توسط سازاکی برای بررسی اثرات ضدقارچی شیکونین، داکسی شیکونین، بتا هیدروکسی والریل شیکونین و استیل شیکونین مشتق شده از *euchroms Arnebia* از خانواده گل‌گاوزبان صورت گرفت نتایج نشان داد که شیکونین و داکسی شیکونین فعالیت ضدقارچی قوی با MIC برابر با ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر قارچ کاندیدا کروزی و ساکرومایسس سرویزیه نشان دادند و شیکونین هم‌چنین MIC برابر با ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا نشان داد؛ بنابراین شیکونین و داکسی شیکونین ترکیبات قابل‌توجه برای عوامل ضدقارچی جدید هستند (۳۴).

درحالی‌که نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد که عصاره ان-هگزانی با کمترین میزان MIC برابر با ۱۵/۶۲ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا بیشترین فعالیت ضد کاندیدایی را نشان داد و عصاره آبی با میزان MIC برابر با ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا کم‌ترین فعالیت ضد کاندیدایی را نسبت به عصاره‌های دیگر نشان داد. نتایج این مطالعه مانند مطالعات دیگر نشان داد که نوع عصاره می‌تواند در استخراج ترکیبات مؤثر این گیاه و سایر گیاهان مهم باشد (۳۵).

در مطالعه حاضر عصاره ان-هگزانی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضدقارچی بالایی را بر قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا نسبت به آنتی‌بیوتیک نیستاتین نشان دادند و این موضوع نشان می‌دهد که مواد مؤثره که دارای اثرات ضدقارچی می‌باشند در ان-هگزان حلال‌تر هستند.

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان چنین بیان کرد که عصاره‌های ان-هگزانی، متانولی و آبی اثر بازدارندگی بر رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا دارد. در ادامه لازم است مطالعات بیشتری در زمینهٔ In vivo انجام شود تا غلظت مؤثر این عصاره‌ها بر جدایه‌های بالینی و اثرات جانبی آن‌ها (در صورت وجود) مورد ارزیابی قرار گیرد تا در نهایت بتوان به فراورده جدید ضدقارچی دست یافت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد می‌باشد و بودجه مصوب طرح از محل اعتبارات صندوق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد تأمین شده است.

Arhive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

References

1. Kantarcioglu AS, Yucel A. The presence of fluconazole-resistant Candida dubliniensis strain among Candida albicans isolated from immune compromised or otherwise debilitated HIV negative Turkish patients. Rev Iberoam Mycol. 2002; 19: 44-48.
2. Sharanappa R, Vidyasagar GM. Anti Candida activity of medicinal plants: A review. Int J Pharm Sci. 2013; 5: 9-16.
3. Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-Garcia F, Monteoliva L, Pla J. Candida albicans Genetics, dimorphism and pathogenicity. Int Microbiol. 2010; 1: 95-106.
4. Panaček A, Kolař M, Večeřova R, Prucek R, Soukupova J, Kryštof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp. Biomaterials. 2009; 30(31): 6333-6340.
5. Consolaro MEL, Albetoni TA, Yoshida CS, Mazucheli J, Peralta RM, Svidzinski TIE. Correlatin of candida species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in marina Parana Brazil. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 202-205.
6. Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Molecular heterogenesity of fluconazole resistant and susceptible oral Candida albicans isolates within a single geographic locale. APMIS. 2002; 110: 315-324.
7. Nouri F, Raoofi A, Dadfar D. Antifungal Activity of Lavandula Angustifolia and Quergues Infectoria Extracts in Comparison with Nystatin on Candida Albicans. Sci J Hamadan Univ Med Sci. 2016; 23(2): 172-178. (In Persian)
8. Hoseini SS, Rudbar-Mohammadi SH, Joshaghani HR. Evaluation of antifungal activity of essential oil of Carvacrol on standard Fluconazole sensitive and resistance strains of Candida albicans. MLJ. 2011; 5(2): 28-33. (In Persian)
9. Jefferies JM, Cooper T, Yam T, Clarke SC. Pseudomonas aeruginosa outbreaks in the neonatal intensive care unit - a systematic review of risk factors and environmental sources. J Med Microbiol. 2012; 61: 1052-1061.
10. Periyasamy N, Srinivasan M, Balakrishnan S. Antimicrobial activities of the tissue extracts of Babylonia spirata Linnaeus,1758 (Mollusca: Gastropoda) from Thazhanguda, Southeast coast of India. Asian Pac J Trop Biomed. 2012; 2: 36-40.
11. Nayan R, Bholodia VJ. Antibacterial and antifungal activities from leaf extract of cassia fistula. J Adv pharm Technol Res. 2011; 2(2): 104-109.
12. Rechinger KH. Flora Iranica. Akademische Druck-U. Verlagsanstalt: Graz, Austria. 1967; 48: 169-212.
13. Binzet R, Kandemir I, Orcan N. Palynological classification of onosma L. (Boraginaceae) species from east mediteranean region in Turkey. Acta Bot Croat. 2010; 69: 259-274.
14. Khatamzaz M. Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Familay Boraginaceae. No. 39. (In Persian)
15. Kretschmer N, Rinner B, Deutsch AJ, Lohberger B, Knausz H, Kunert O, et al. Melanoma Cells. J Nat Prod. 2012; 75(5): 865-869.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

16. Kumar N, Singh A, Sharma DK, Kishore K. In-Vitro anti inflammatory and antioxidant activity of Onosma hispidum (Ratanjot) Roots. IJPBS. 2017; 3(7): 30-35.
17. Hasenoehrl C, Schwach G, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Fuchs R, Kretschmer N. Anti-tumor effects of shikonin derivatives on human medullary thyroid carcinoma cells. Endocr Connect. 2017; 6(2): 53-62.
18. Güzel Ö, Duman S, Yılmaz S, Pirhan AF, Bedir E. Screening of Onosma Species for Cytotoxic Activity. MDPI. 2017; 1(10): 1048-1052.
19. Mohammadi N, Bahrami GH, Ghiasvand N, Miraghaei SH, Madani SH, Karimi I, et al. The Wound Healing Effect of Various Extracts from Onosma Microcarpum Root in a Diabetic Animal Model. JRPS. 2017; 6(1): 59-67.
20. Chen X, Yang L, Zhang N, Turpin JA, Buckheit RW, Osterling C, et al. Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. AAC. 2003; 47: 2810-2816.
21. Yamasaki K, Otake T, Mori H, Morimoto M, Ueba N, Kurokawa Y, et al. Screening test of crude drug extracton anti-HIV activity. Yakugaku Zasshi. 1993; 113: 818-824.
22. Vukic MD, Vukovic NL, Djelic GT, Popovic SL, Zaric MM, Baskic DD, et al. Antibacterial and cytotoxic activities of naphthoquinone pigments from Onosma visianii Clem. EXCLI J. 2017; 16: 73-79.
23. Ahmad B, Ali N, Bashir S, Choudhary MI, Azam S, Khan I. Parasiticidal, antifungal and antibacterial activities of Onosma griffithii Vatke. AJB. 2009; 8(9): 5084-5087.
24. Orfanou IM, Damianakos H, Bazos I, Graikou K, Chino I. Pyrrolizidine Alkaloids from Onosma kaheirei Teppner (Boraginaceae). ACG Publications. 2016; 2(10): 221-227.
25. Damianakos H, Sotiroudis G, Chinou I. Pyrrolizidine alkaloids from Onosma erecta. J Nat Prod. 2013; 76: 1829-1835.
26. Mellidis AS, Papageorgiou VP, Kokkalou E. Phenolic constituents from Onosma heterophylla. J Nat Prod. 1993; 56: 949-952.
27. Mazandarani M, Moghaddam Z, Zolfaghari M, Ghaemi E, Bayat H. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in Onosma dichroanthum Boiss. J Med Plants Res. 2012; 6: 4481-4488.
28. Bozan B, Baser KHC, Kara S. Quantitative determination of naphthaquinones of Arnebia densiflora Nordm Ledeb by an improved highperformance liquid chromatographic method. J Chromatogr. 1997; 78(20): 133-136.
29. Namjoyan F, Bazvand M, Azemi ME. Antioxidant activity and phytochemical investigation of Onosma chlorotricum Boiss and Noe lipophilic extract on thin layer chromatography (TLC). Jentashapir. 2012; 15: 55-60.
30. Nazemi A, Hashemi M, Khatami-Nejad MR, Pourshamsian K. The first study antimicrobial activity of aqueous and

Archive of SID

www.SID.ir

methanolic extracts of the plant. MSJ. 2005; 15(2): 91-94. (In Persian)
31. Mirrezaee N, Dakhili M, Mehrpour Sh. Effects of antifungal Rue on the candida albicans isolated from patients with vaginitis on in vitro during spring and winter seasons and comparison with two antibiotics. Yafte. 2017; 19(2): 50-59. (In Persian)
32. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol. 2002; 82: 51-53.
33. Ahmad SH, Alikhan M, Ayaz S, Ahmad I. Anti bacterial and anti fungal studies of the crud extract and solvent Fractions of onosma Khyberianum. Pharmacologica. 2013; 4(9): 525-528.
34. Sasaki K, Abe H, Yoshizaki F. Invitro antifungal activity of Naphthaquinon derivatives. Bio Pharm Bull. 2002; 25(5): 669-670.
35. Ghahfarokhi M, Sattari M, Yadegari MH, Gudarzi GHR, Saharkhiz MJ. Anti fungal activity of essential oils and extracts Ajowan against clinical isolates Candida albicans resistant to fluconazole in vitro. Modare J Med Sci. 2008; 1: 91-97.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

Arhive of SID

www.SID.ir

Comparison of the antifungal effects of various extracts of Onosma Chlorotricum on Candida albicans and Candida glaberata with two antibiotics fluconazole and nystatin

***Nabipour F*[*1], Dousti B [2]**

1. Instructor, Department of Physiology, Khorramabad branch, Islamic Azad university, Iran, nabipor.f@gmail.com.
2. Assistant Professor, Department of Physiology, Khorramabad branch, Islamic Azad university, Iran.

Received: *7 Jun 2018* **Accepted:** *7 Feb 2018*

Abstract

Background **:** Because of the recurrence of Candida infections, their resistance to antifungal drugs during treatment, the known side effects of chemical drugs, and the existence of some studies that Onosma's genus contains derivatives of alkannin and shikonin that have antifungal properties, for the first time, the antifungal properties of *Onosma Chlorotricum* were compared with antibiotics.

Materials and Methods: The plant was collected from Koohdasht in July of 2016, and after detection and drying, N- hexane, methanol, aqueous extracts of plants were prepared by soaking. The antifungal effects of different concentrations of extracts were studied by the disc diffusion method and determination of MIC (minimum inhibitory concentration of growth), MFC (minimum fungicidal concentration) was done by microdilution method. Antibiotics fluconazole and nystatine were used as a positive control and DMSO was used as a negative control . Data were analyzed by t-test and one-way ANOVA.

Results: The mean inhibitory diameter of growth of the hexane extract in concentration of 10 mg / ml was higher than nystatin antibiotic inhibitory diameter of growth for Candida albicans and Candida glaberata ($P<0.05$). The lowest MIC for Candida albicans and Candida glaberata was respectively, 15.62 and 31.25 µg / µl, and the lowest MFC for Candida albicans and Candida glaberata was 31.25 and 62.5. µg / µl.

Conclusion: Extracts of this plant showed antifungal effect on Candida albicans and glaberata. The possibility of using this extract in the treatment of Candida infection requires the completion of supplementary studies.

Keywords: Fluconazole, Nystatin, Antifungal, Extract, *Onosma Chlorotricum*.

Citation: Nabipour F, Dousti B. The comparison of the antifungal effects of various extracts *Onosma Chlorotricum* on Candida albicans and Candida glaberata with two antibiotics fluconazole and nystatin. Yafte. 2018; 20(1):12-22.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 11:14 +0430 on Monday July 2nd 2018

Archive of SID

www.SID.ir