بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های مختلف بخش هوایی و ریشه گیاه *Echium italicum* بر کاندیدا آلبیکنس و مقایسه آن‌ها با دو آنتی‌بیوتیک رایج

فاطمه نبی‌پور [1*]، محمد فضیلتی[2]، بهروز دوستی[3]، رضا میردریکوند[4]

۱-دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ص. پ . ۳۶۹۷- ۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

۲-استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ص. پ . ۳۶۹۷- ۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

۳-استادیار، گروه زیست شناسی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.

۴-استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره بیست و یکم / شماره ۱ / بهار ۹۸ / مسلسل ۷۹

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۱۰/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۱/۱۳

مقدمه: کاندیدیازیس شایع‌ترین عفونت انسانی در جهان است که در افرادی با سیستم ایمنی ضعیف جزء بیماری‌های خطرناک محسوب می‌شود و با توجه به مقاومت آن‌ها به داروهای ضدقارچی و عود مکرر و عوارض شناخته شده داروهای شیمیایی، برای اولین بار خواص ضدقارچی بخش‌های مختلف گیاه *Echium italicum* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری گیاه، شناسایی و خشک کردن آن، عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی از بخش هوایی و ریشه گیاه 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 نیستاتین و فلوکونازول به عنوان کنترل مثبت، DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. داده‌ها توسط آزمون t تست و واریانس یک طرفه ANOVA آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی بخش‌های مختلف گیاه *E.italicum* فعالیت ضدقارچی را بر علیه کاندیدا آلبیکنس نشان دادند به طوری‌که عصاره متانولی و ان-هگزانی ریشه در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نیستاتین برای کاندیدا آلبیکنس می‌باشد ($P<0/05$). کمترین میزان MIC و MFC مربوط به عصاره متانولی ریشه گیاه مذکور با مقدار مساوی ۱۵/۶۲µg/µl می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره‌های این گیاه می‌تواند برای درمان عفونت‌های ناشی از کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: نیستاتین، فلوکونازول، ضدقارچی، عصاره، *Eacium italicum*

*آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه پیام نور واحد اصفهان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی..

پست الکترونیک: nabipor.f@gmail.com

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

مقدمه

عفونت‌های قارچی در انسان بسته به اینکه کدام مناطق از بدن را تحت تأثیر قرار دهند، می‌توانند به عنوان بیماری‌های سطحی و سیستمیک طبقه بندی می شوند. کاندیدا قارچ فرصت طلب بوده و توانایی ایجاد عفونت‌های حاد و مزمن دهان، واژن، ریه و دستگاه گوارش را دارد (۱) عفونت‌های کاندیدایی در دهه‌های اخیر به طور چشمگیری افزایش یافته و در حال حاضر به عنوان یکی از رایج‌ترین عفونت‌های خون در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU)می‌باشند (۲). کاندیدیازیس شایع‌ترین عفونت‌های انسانی در جهان و علت عمده مرگ و میر می‌باشد (۳،۲).

دومین عفونت شایع واژن، واژینیت کاندیدایی می‌باشد که ۴۰ تا ۵۰ در صد زنان دچار عود مکرر شده و جمعیتی حدود ۵ درصد در طول زندگی خود به عفونت‌های مکرر مبتلا می‌شوند (۶،۵). عفونت‌های کاندیدایی علاوه بر کاندیدا آالبیکنس توسط گونه‌های دیگر کاندیدا مانند کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروزی و کاندیدا تروپیکالیس که فلور طبیعی بدن انسان هستند، ایجاد می شود (۸،۷) و به طور کلی با داروهای ضدقارچی درمان می‌شوند اما به طور فزاینده‌ای نسبت به داروهای مختلف مقاومت نشان می‌دهند (۹).

در تحقیقات جدید گونه‌های کاندیدا نسبت به آزول‌ها مانند فلوکونازول مقاومت نشان می‌دهند (۱۰). کاندیدا آلبیکنس بیشترین عامل بروز عفونت شناخته شده است که به دلیل دارا بودن فرم مقاوم به درمان نسبت به بسیاری از ترکیبات آزول‌ها خصوصاً فلوکونازول سریعاً مقاوم می‌گردد (۱۱). شایع‌ترین داروهای ضدقارچی مورد استفاده متعلق به گروه‌های آزول (فلوکونازول) و داروهای پلی‌ان (نیستاتین) می‌باشد اما به دلیل سمیت بالا، عوارض جانبی، بی پاسخی نسبت به درمان و عودهای مکرر به ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲).

عفونت‌های کاندیدایی به یک مشکل جدی سلامت تبدیل شده‌اند، زیرا قارچ‌ها به طور فزاینده‌ای در برابر داروهای قارچی موجود به ویژه فلوکونازول که بیش‌ترین استفاده را دارد، مقاومت کرده و منجر به عود مکرر بیماری می‌شوند (۱۴،۱۳). بنابراین توسعه داروهای ضدقارچی جدید و موثر در طبیعت به شدت مورد نیاز است (۱۵).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی شده است. به طور کلی، ترکیبات فنلی مسئولیت خواص ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌ها می‌باشند (۱۶).

تیره گل گاوزبان دارای ۱۵۶ جنس و ۲۰۰۰ گونه می‌باشند که جنس *Echium* متعلق به این تیره می‌باشد. این جنس بیشتر در اروپا، ترکیه، ایران و قفقاز می‌روید و ۴ گونه آن در ایران انتشار دارد (۱۸،۱۷).

گونه *Echium italicum* گیاهی دو ساله، پوشیده از کرک‌های انبوه زبر با قاعده برجسته، ساقه‌های محکم، قوی، افراشته، منشعب، به ارتفاع ۲۰ تا ۹۰ سانتی‌متر، برگ‌های قاعده‌ای طوقه‌ای، نواری و نیزه‌ای، به طول ۱۵ تا ۳۰ و عرض ۴ سانتی‌متر، نوک تیز، پوشیده از کرک‌های زبر زرد که در زمان گل‌دهی برگ‌های قاعده خشک می‌شوند. برگ‌های ساقه‌ایی کوچک‌تر، نیزه‌ای و فاقد دمبرگ هستد. جام گل قیفی باریک، نامنظم و به طول ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر، صورتی-سفید یا آبی است و بیشتر در اروپا، ترکیه، ایران و قفقاز می‌روید. این گونه نمونه تیپ از ایتالیا می‌باشد (۲۰،۱۹).

ریشه گونه‌های خانواده گل‌گاوزبان از جمله گیاه Echium غنی از مشتقات نفتاکینون از جمله شیکونین و آلکانین است (۲۱) که علاوه بر این، مشتقات شیکونین شامل: استیل شیکونین، داکسی شیکونین، ۲-متیل-بوتیریل شیکونین و ایزووالریل شیکونین از ریشه گیاه *E.italicum* شناسایی شد (۲۲). که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی (۲۳)، اثرات ضد سرطانی (۲۴)، ترمیم کننده زخم (۲۵)، ضد ویروسی، ضد میکروبی

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

و ضدقارچی می‌باشند (۲۶) و نسبت انانتیومرها و مشتقات استریفیه شده آن‌ها در گونه‌های مختلف با هم متفاوت است به‌طوری‌که بیشترین میزان مشتقات شیکونین در ریشه گیاه *E.italicum* نسبت به سایر گونه‌های این جنس مشاهده شد(۲۷) از طرفی دیگر، بخش هوایی آن‌ها دارای آلکالوئید پیرولیزیدین و ترکیبات فنول و فلاونوئید و اسیدهای چرب می‌باشند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهند (۳۰،۲۹،۲۸). گونه‌های این جنس دارای خواص آنتی‌اکسیدان (۳۲،۳۱)، ضدالتهابی (۳۳)، ضد ویروسی (۳۴)، ضد انعقاد (۳۵)، ضد افسردگی (۳۶)، تنظیم کننده چربی (۳۷)، ضد باکتریایی (۳۸) و ترمیم‌کننده زخم (۳۹) می‌باشند.

با توجه به اینکه مطالعات قبلی در زمینه اثرات ضدقارچی گونه‌های مختلف این جنس صورت پذیرفته و هم‌چنین مردم استان لرستان بر این باورند که این گیاه دارای اثرات ضدمیکروبی است، اما تاکنون مطالعه مدونی در خصوص تاثیرات ضدقارچی این گونه انجام نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضدکاندیدایی عصاره‌های مختلف آبی، ان-هگزانی و متانولی از بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *Echium italicum* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک فلوکونازول و نیستاتین انجام شده است. گردید.

مواد و روش‌ها

گیاه *Echium italicum* در اوایل بهار از شهرستان کوهدشت جمع‌آوری و مورد شناسایی قرار گرفت. پس از شستشو در دمای آزمایشگاه بخش‌های هوایی و ریشه گیاه در سایه خشک شده و سپس با استفاده از آسیاب برقی پودر و برای عصاره‌گیری استفاده گردید.

عصاره‌گیری، به روش خیساندن و با سه حلال آبی، ان-هگزانی و متانولی برای بخش‌های هوایی و ریشه گیاه انجام شد. در این روش به طور جداگانه به ۵۰ گرم از پودر حاصل از هر بخش به طور جداگانه ۵۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های فوق افزوده شد و بعد از ۷۲ ساعت محتویات ظرف با عبور از کاغذ صافی واتمن صاف 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 ازخشک شدن، عصاره‌ها تا زمان انجام آزمایش در ظروف دربسته، دور از نور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

۶ غلظت ۵ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی، ان- هگزانی و متانولی در حلال دی متیل سولفوکساید ۵٪ تهیه و با استفاده از فیلترهای به قطر ۰/۴۵ میکرون استریل گردید.

جهت انجام مطالعات فوق سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC ۱۰۲۳۱) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. جهت بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی گیاه از روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن استفاده گردید.

بررسی فعالیت ضد قارچی به روش انتشار دیسک (Disk Diffusion)

ابتدا سوسپانسیونی از کشت فعال و شبانه کاندیدا تهیه و کدورت آن با نیم مک فارلند تنظیم گردید. سپس بر روی محیط سابرو دکستروز آگار تلقیح گردید و دیسک‌های کاغذی استریل ۶ میلی‌متری حاوی ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۵ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های مختلف از بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *E.italicum* که در حلال دی متیل سولفوکساید ۵٪ حل شده، روی محیط کشت قرار داده شدند. دیسک حاوی حلال دی‌متیل سولفوکساید به عنوان شاهد منفی و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک فلوکونازول، نیستاتین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. سپس پلیت‌های قارچی۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۰۱

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

برحسب دهم میلی‌متر اندازه‌گیری شد و هر سنجش سه بار تکرار گردید

تعیین MIC، MFC

با استفاده از روش میکرودایلوشن حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC (Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت قارچ‌کشی MFC (Minimum fungicidal concentration)) عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی بخش‌های هوایی و ریشه گیاه تعیین گردید. به منظور تعیین MIC، سری رقتی از ۱۰۰۰ تا ۱/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های مختلف بخش هوایی و ریشه گیاه در محیط سابرو دکستروز براث در میکروپلیت ۹۶ خانه تهیه گردید. پس از تهیه سری رقت‌ها، ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون قارچی Cfu/ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$ 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 ۲۴ ساعت برای قارچ‌ها انکوبه گردیدند. آنگاه کمترین رقتی از عصاره های مختلف بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *E.italicum* که در آن هیچ کدورتی مشاهده نگردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

جهت تعیین حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) از عصاره های مختلف بخش های هوایی و ریشه گیاه *E.italicum*، از چاهک‌های فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده بود به کمک لوپ استریل بر روی محیط سابرو دکستروز آگار کشت داده شد. محیط کشت‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظتی از عصاره های مختلف بخش‌های هوایی و ریشه گیاه که قارچ در آن رشد نکرده بود به عنوان MFC در نظر گرفته شد. در این مطالعه تاثیر عصاره‌های مختلف بخش‌های هوایی و ریشه گیاه بر نمونه استاندارد ۳ مرتبه تکرارگردید.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA-one way) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تی تست در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) صورت گرفت. از نرم‌افزارSPSS ویرایش ۱۶ برای آنالیز آماری و Excel برای رسم نمودار استفاده شد. تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

یافته‌ها

فعالیت ضد قارچی عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی بخش‌های هوایی و ریشه *E.italicum* در ۶ غلظت از ۵ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از دو روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن بررسی شد.

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف از بخش های هوایی و ریشه *E.italium* و آنتی‌بیوتیک نیستانین و فلوکونازول به عنوان شاهد مثبت و دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است که هیچ هاله عدم رشدی اطراف دیسک دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی دیده نشد.

نتایج این پژوهش نشان داد که در میان بخش‌های مختلف *E.italicum*، عصاره‌های مختلف ریشه در تمامی غلظت‌ها بیشترین فعالیت ضدقارچی را نسبت به عصاره‌های بخش هوایی گیاه مذکور نشان دادند. هم‌چنین عصاره متانولی بخش‌های مختلف گیاه اثرات ضدقارچی بیشتری نسبت به عصاره ان-هگزانی و عصاره ان-هگزانی فعالیت ضدقارچی بیشتری نسبت به عصاره آبی نشان داد که در سطح $P<۰/۰۵$ از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۱،۲).

نتایج جدول ۱ نشان داد که عصاره متانولی و ان-هگزانی

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

ریشـــه *E.italicum* در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر یا ۱۵۰ میکروگرم بر دیسـک با میانگین قطر هاله عدم رشـد به ترتیب برابر با ۰/۲۵±۱۹و ۰/۷±۱۸/۵فعالیت ضدقارچی بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک نیستاتین با میانگین قطر هاله عدم رشـد ۰/۷±۱۸/۳ نشـان داد که در سـطح ۰/۰۵ >P دارای اختلاف معنی‌دار است. البته قطر هاله عدم رشد عصـــاره‌های مختلف ریشـــه *E.italicum* کمتر از قطر هاله عدم رشـــد آنتی‌بیوتیک فلوکونازول ۰/۵±۲۴ میلی‌متر می‌باشـــد که قدرت بیشـــتر آن را در مهار رشـــد کاندیدا آلبیکنس در مقایســـه با عصـــاره‌های مختلف گیاه مذکور نشان می‌دهد.

جدول ۱. مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه گیاه *E.italicum* با آنتی‌بیوتیک‌ها برکاندیدا آلبیکنس(برحسب میلی‌متر)

غلظت mg/m	متانولی	ان-هگزانی	آبی
۵	۱۹ ±۰/۲۵	۱۸/۵ ±۰/۷	۱۶ ±۰/۷۵
۲/۵	۱۷/۴ ±۰/۷	۱۶/۵ ±۱/۲	۱۴/۵ ±۰/۵
۱/۲۵	۱۵/۶ ±۰/ ۲	۱۵ ±۰/۵	۱۳ ±۱
۰/۶۲۵	۱۴/۲ ±۰/۷	۱۳/۵ ±۰/۴	۱۱ ±۱/۴
۰/۳۱۲	۱۳ ± ۱	۱۲±۰/۷۵	۱۰ ±۰/۳۸
۰/۱۵۶	۱۱ ±۰/۶	۱۰±۰/۸	۹ ±۰/۵
فلوکونازول	۲۴ ±۰/۵	۲۴ ±۰/۵	۲۴ ±۰/۵
نیستاتین	۱۸/۳ ±۰/۷	۱۸/۳ ±۰/۷	۱۸/۳ ±۰/۷
DMSO	-	-	-

نتایج جدول ۲ نشـــان داد که در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۱۵۰ میکروگرم بر دیســـک) بخش هوایی گیاه *E.italicum* بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره متانولی(۰±۱۶/۸۶) و کمترین میانگین قطر هاله عدم رشـــد مربوط به عصـــاره آبی(۰±۱۳/۵) می‌باشـــد. البته تمامی عصـــاره‌ها در غلظت‌های مختلف فعالیت ضـــدقارچی کمتری را نســـبت به آنتی‌بیوتیک نیستاتین و فلوکونازول نشان داد که قدرت مهار بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها را در مقایسه با عصاره‌های مختلف گیاه مذکور نشان می‌دهد.

جدول ۲. مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های بخش هوایی گیاه *E.italicum* با آنتی‌بیوتیک‌ها برکاندیدا آلبیکنس(برحسب میلی‌متر)

غلظت mg/ml	متانولی	ان-هگزانی	آبی
۵	۱۶ ±۰/۸۶	۱۵/۵ ±۰/۶	۱۳ ±۰/۵
۲/۵	۱۴/۷ ±۰/۵	۱۴±۰/۵	۱۲ ±۰/۴
۱/۲۵	۱۳ ±۰/۵	۱۲/۵ ±۰/۴	۱۱ ±۰/۶
۰/۶۲۵	۱۲ ±۰/۶۸	۱۱ ±۰/۴	۱۰ ±۰/۵
۰/۳۱۲	۱۱/۳±۰/۴	۱۰/۵±۰/۵	۹ ±۰/۴۸
۰/۱۵۶	۹ ±۰/۵	۸/۵ ±۰/۵	۸ ±۰/۳
فلوکونازول	۲۴ ±۰/۵	۲۴ ±۰/۵	۲۴ ±۰/۵
نیستاتین	۱۸/۳ ±۰/۷	۱۸/۳ ±۰/۷	۱۸/۳ ±۰/۷
DMSO	-	-	-

نتایج حاصـــل از MIC عصـــاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی بخش هوایی گیاه *E.italicum* بر علیه کاندیدا آلبیکنس به ترتیب برابر با ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای ریشـــه گیاه مذکور به ترتیب برابر با ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ و ۱۵/۶۲ میگروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میزان MIC و MFC غلظت‌های مختلف عصاره‌های بخش هوایی و ریشه گیاه *E.italicum* بر کاندیدا آلبیکنس بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

عصاره	متانولی		ان- هگزانی		آبی	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
بخش هوایی	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰
ریشه	۱۵/۶۲	۱۵/۶۲	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵

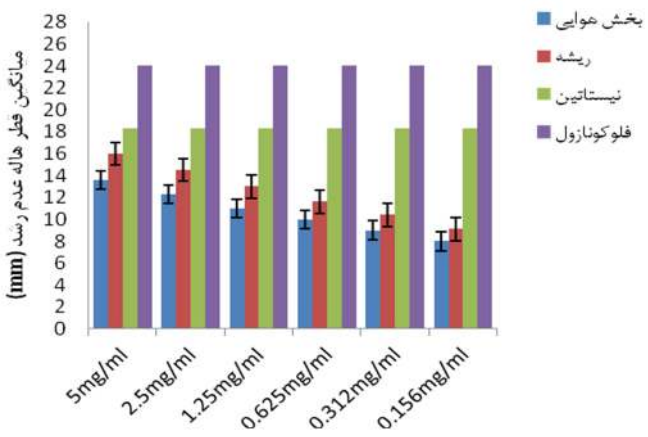
نتایج حاصـــل از MFC عصـــاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی بخش هوایی گیاه *E.italicum* بر علیه کاندیدا آلبیکنس به ترتیب برابر با ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای ریشـــه گیاه مذکور به ترتیب برابر با ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ میگروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۳).

نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی ریشـــه گیاه *E.italicum* در تمامی غلظت‌ها میانگین قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه مذکور را نشـــان دادند (نمودار ۳و۲و۱). به طوری‌که اختلاف میانگین قطر هاله عدم رشـــد غلظت‌های مختلف تمامی عصـــاره‌های بخش هوایی و ریشـــه گیاه *E.italicum* از نظر آماری معنی‌دار می‌باشـــد (P<۰/۰۵). هم‌چنین قطر هاله

www.SID.ir

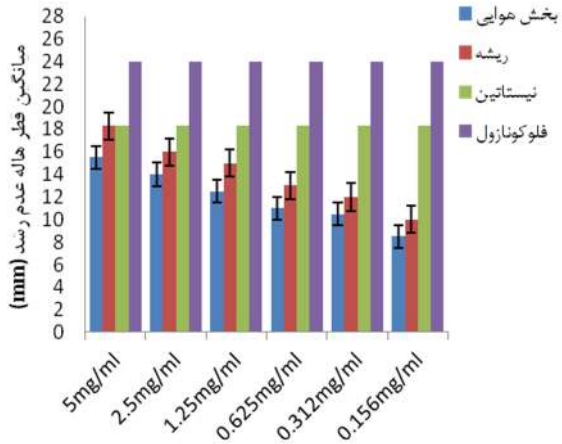
Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

عدم رشد عصاره متانولی بخش‌های مختلف به طور معنا داری بیشتر از قطر هاله عدم رشد عصاره آبی آن‌ها می‌باشد ($P<0/05$).

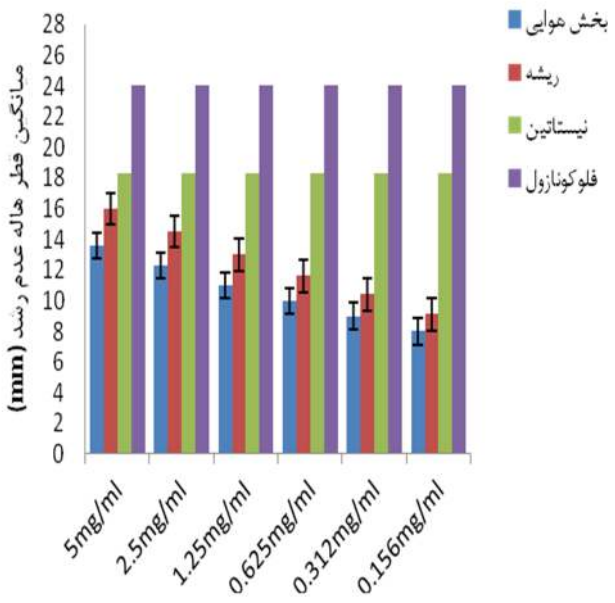


نمودار۱. مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی بخش‌های مختلف *E.italicum* با آنتی‌بیوتیک‌ها بر قارچ کاندیدا آلبیکنس

نتایج نشان داد که اندازه‌ی قطر هاله عدم رشد با مقدار غلظت عصاره‌های مورد نظر نسبت مستقیم داشت ($P<0/05$) به‌طوری‌که با افزایش غلظت هر کدام از عصاره‌ها از غلظت ۰/۱۵۶ تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری قطر هاله عدم رشد بیشتر می‌شود (نمودار۱،۲،۳).



نمودار۲. مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره ان-هگزانی بخش‌های مختلف *E.italicum* با آنتی‌بیوتیک‌ها بر قارچ کاندیدا آلبیکنس



نمودار ۳. مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی بخش‌های مختلف *E.italicum* با آنتی‌بیوتیک‌ها بر قارچ کاندیدا آلبیکنس

بحث و نتیجه‌گیری

در طی دهه‌های اخیر عفونت‌های سیستمیک ناشی از گونه‌های کاندیدا و به طور عمده کاندیدا آلبیکنس به علت افزایش بیماری‌های ضعیف کننده سیستم ایمنی نظیر ایدز، انواع بدخیمی‌های خونی، مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای کورتیکواستروئید به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر بخصوص برای بیماران بستری شده در بیمارستان مطرح شده است. هم‌چنین مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات جانبی آن‌ها، سمی بودن آن‌ها برای سلول‌های بدن انسان و عود مکرر موجب شده که جستجو در زمینه داروهای ضدقارچی جدید مخصوصاً گیاهان دارویی مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد (۴۰).

در این پژوهش فعالیت ضد قارچی عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی بخش‌های هوایی و ریشه *E.italicum* با استفاده از دو روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی، ان-هگزانی و متانولی ریشه گیاه *E.italicum* در تمامی غلظت ها

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

میانگین قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه مذکور را نشان دادند. به طوری‌که عصاره متانولی ریشه گیاه *E.italicum* در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت ضدقارچی را با میانگین قطر هاله عدم رشد ۰/۲۵±۱۹ و MIC و MFC به مقدار مساوی با ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس را نشان داد.

هم‌چنین عصاره متانولی بخش‌های مختلف با داشتن قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر در غلظت‌های مختلف و مقدار MIC کوچک‌تر نسبت به عصاره‌های آبی و ان-هگزانی بخش هوایی و ریشه *E.italicum* خواص ضدقارچی بیشتری نشان داد.

ریشه گونه‌های خانواده گل‌گاوزبان از جمله گیاه *Echium* غنی از مشتقات نفتاکینون از جمله شیکونین و آلکانین است (۲۱) که این ترکیبات دارای خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتریایی و ضدقارچی می‌باشند (۳۸) که نسبت انانتیومرها و مشتقات استریفیه شده آن‌ها در گونه‌های مختلف با هم متفاوت است، به‌طوری‌که بیشترین میزان مشتقات شیکونین در ریشه گیاه *E.italicum* نسبت به سایر گونه‌های این جنس مشاهده شد (۲۷). بنابراین می‌توان خاصیت ضدقارچی عصاره‌ها را به وجود این ترکیبات در عصاره‌ها نسبت داد.

در کل مطالعاتی در زمینهٔ بررسی اثر ضدقارچی گونه *E.italicum* تاکنون صورت نگرفته است، اما اما مطالعات محدودی روی اسانس این گیاه و ترکیبات آن انجام شده است. اسانس *E.italicum* اثرات ضدقارچی بر علیه کاندیدا آلبیکنس با MIC برابر با ۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد که این اثرات وابسته به غلظت بود (۴۱). یک مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ اثرات ضدقارچی در گونه *Onosma Khyberianum* را به اثبات رساند (۴۲). هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که گونه *Onosma chlorotricum* دارای اثرات ضدقارچی بر علیه کاندیدا آلبیکنس می‌باشد (۴۳).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ در زمینه بررسی اثرات ضدمیکروبی بعضی از گیاهان عربستان صعودی صورت گرفت، نتایج نشان داد که گونه *Echium arabicum* اثرات ضدمیکروبی و هم‌چنین ضدقارچی بر کاندیدا البیکنس نشان داد (۴۴).

در پژوهشی که در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت، نتایج نشان داد که عصاره متانولی گونه *Cordia gilletii* از خانواده گل‌گاوزبان خواص ضدقارچی قویتری نسبت به عصاره ان-هگزانی و آبی بر علیه کاندیدا آلبیکنس نشان داد (۴۵). که با نتایج پژوهش ما که عصاره متانولی بخش‌های مختلف گیاه خواص ضدقارچی بیشتری نسبت به عصاره‌های آبی و ان-هگزانی نشان داد، مطابقت دارد.

در پژوهشی که در زمینه بررسی اثرات ضدقارچی مشتقات نفتاکینون انجام شد، نتایج نشان داد که مشتقات نفتاکینون اثرات ضدقارچی قوی با MIC برابر با ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر قارچ کاندیدا آلبیکنس را نشان داد. بنابراین مشتقات نفتاکینون ترکیبات قابل‌توجه برای عوامل ضد قارچی جدید هستند (۴۶). در حالی‌که نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد که عصاره متانولی ریشه و بخش هوایی با کمترین میزان MIC به ترتیب برابر با ۱۵/۶۲ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر قارچ کاندید آلبیکنس بیشترین فعالیت ضدکاندیدایی را نشان داد و عصاره آبی با میزان MIC برابر با ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر قارچ کاندیدا آلبیکنس 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. هم‌چنین اثر ضدقارچی گیاهان دارویی ممکن است به علت تخریب دیواره سلولی قارچی و غشای سیتوپلاسمی ناشی از آزادسازی ترکیبات ضدمیکروبی در

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

گیاهان و آنزیم‌های لیز کننده گیاهی روی سلول‌های قارچی باشد (۴۷).

در این پژوهش عصاره متانولی و ان-هگزانی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضدقارچی بالایی را بر قارچ کاندیدا آلبیکنس نسبت به آنتی‌بیوتیک نیستاتین نشان دادند و این موضوع نشان می‌دهد که مواد مؤثره که دارای اثرات ضد قارچی می‌باشند در متانول و ان-هگزان حلال‌تر هستند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره‌های مختلف بخش‌های هوایی و ریشه اثر بازدارندگی بر رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس دارد و از این حیث می‌تواند علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها اثر داشته باشد.

در ادامه لازم است مطالعات بیشتری انجام شود تا غلظت مؤثر این عصاره‌ها بر جدایه‌های بالینی و اثرات درمانی آن‌ها در مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد تا در نهایت بتوان به فراورده جدید ضدقارچی دست یافت.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دوره دکتری بوده و در دانشگاه پیام نور واحد اصفهان به انجام رسیده است.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

References

1. Malekpour A, Delnavaz Hashemlouian B. Evaluation of the Antimicrobial Effects of the Alcoholic and Aqueous Extracts of Chenopodium Album and Chenopodium Botrys against Candida Albicans. Tabari J Prev Med. 2015; 1(3):33-40.
2. Soliman S.M, Semreen M.H, El-Keblaway A.A, Abdullah A, Uppuluri P, Ibrahim A.S and et al. Assesment of herbal drugs for promising anti-candida activity. B M C complementary. 2017; 17:257.
3. Akroum S. Antifungal activity of camellia sinsis crude extracts against four species of candida and Microsporum persicolor. J M M. 2018:1-4.
4. Soliman S, Alnajdy D, EI-Keblawy A.A, Mosa K.A, Khoder G, Noreddin A.M. Plant's natural products as alternative promising anti-Candida drugs.Phcog Rev. 2017; 11:104-122.
5. Bornstein J, Zarfati D. A universal combination treatment for vaginitis. Gynecol Obstet Invest. 2008; 65:195-200.
6. Khosravi AR, Eslami AR, Shokri H. Zataria multiflora cream for the treatment of acute vaginal candidiasis. Int J Gynaecol Obstet. 2008; 101:201-2.
7. Leite D. P, Piva M. R, Martins-Filho P. R. Identificac¸˜ao das esp´ecies de Candida em portadores de estomatite prot´etica e avaliac¸˜ao da susceptibilidade ao miconazol e `a terapia fotodinˆamica UNESP.2015; 44(1):12-17.
8. Martins C.H, Pires R.H, Cunha A.O and et al.Candida biofilms First description of dual species Candida albicans/C. rugosa biofilm Fungal Biol.2016; 120(4):530-537.
9. Mengltoh Y, Dhanashree B. Antifungal effect of cow urine distillate on candida species J-AIM. 2017; 8:233-237.
10. Mun˜oz JE, Rossi DCP, Ishida K, Spadari CC, Melhem MSC, Garcia DM, et al . Antifungal activity of the biphosphinic cyclopalladate C7a against Candida albicans yeast forms in vitro and in vivo. Front Microbiol 2017; 3:771.
11. Bigom Taheri Y, Iman M, Mehdipour M, Bakhtiari S,Namazi F,Teheri Bayan M and etal. Study of Aqueous and Alcoholic Extract of the Melissa officinalis Effect on Candidia albicans, Candida glaberata and Candida Krusei. Military med j.2017; 19(5):505-512(In Persian).
12. Jontell M, Homstrup P. Red and White Lesions of the Oral Mucosa. In: Glic M, Greenberg MS, Ship JA. Burket's oral medicine. 11th Ed, Ontario, BC Decker, 2008: 79-84.
13. Enfert C. Hidden Killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in human host.Cur Opin Microbiol.2009; 12(4):358-364.
14. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the orospective antifungal therapy alliance registry. J Clin Infect Dis. 2009, 48(12):1695-703.
15. Iosif L, Preoteasa C. T, Murariu-Maqureanu, Preoteasa C. E., "Clinical study on thermography, as modern investigation method for Candida-associated denture

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

stomatitis,"Romanian Journal of Morphology and Embryology. 2016; 57(1):191-195Enzyme. Cell Metabolism. 2007; 6(5): 363-375.

16. Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Z. Antioxidant phenoliccompounds from walnut kernels (Juglans regia L.). Food Chem.2009;113(1):160–5.
17. Khatamzaz M, Flora of Iran, Research Institute of Forests and Rangelands.Familay Boraginaceae.2002.39:504(In Persian)
18. .Kretschmer N, Rinner B, Deutsch AJ, Lohberger B, Knausz H, Kunert O and et al. melanoma Cells. J Nat Prod. 2012; 75(5):865-9.
19. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant, Names. Latin, English, Persian, First Edition, farhang moaser' publication.1996; P: 183-189(In Persian).
20. Ghahraman A Flora of Iran, Ministry of Agriculture Jahad, Agricultural and Natural Resources Research Organization, Fifth edition, Research Institute of Forests and Rangelands 1984; P:547(In Persian)
21. .Zare K, Nazemiyeh H, Movafeghi. Bioprocess engineering of *Echium italicum* L: Induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures.Plant Cell Tissue Organ Cult.2010; 100(2): 157–164.
22. Eruygur N, Yılmaz G, Kutsal O, Yücel G and Üstün O. Bioassay-guided isolation of wound healing active compounds from Echium species growing in Turkey. J Ethnopharmacol. 2016; 185:370-37.
23. Andújar I, Giner R.M, Recio M.C. Pharmacological Properties of Shikonin-A Review of Literature since 2002. Planta Med 2013; 79: 1685–169.
24. Nikita G, Vivek P, Chhaya G. Wound-healing activity of an oligomer of alkannin/shikonin, isolated from root bark of Onosma echioides. NAT PROD RES.2015:37-41.
25. Andújar I, Recio MD, Giner RM, Ríos JL. Traditional Chinese medicineremedy to jury: the pharmacological basis for the use of shikonin as an anticancer therapy. Curr Med Chem. 2013; 20: 2892–2898.
26. Errante G, La Motta G, Lagana C, Wittebolle V, Sarciron M.E, Barret R. Synthesis and evaluation of antifungal activity of naphthoquinone derivatives. Eur J Med Chem. 2006; 41:773-778.
27. Eruygur N. A Simple Isocratic High-perfomance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Shikonin Derivatives in Some Echium Species Growing Wild in Turkey. Turk J Pharm Sci. 2018; 15(1):38-43.
28. Sakineh TR., Taghizadeh M, Fazeli F, Salmaki Y. Characterization of fatty acids in different organs of some Iranian Echium plants. JMPR.2011; 5(19): 4814-4821.
29. Lucchetti M.A, Glauser G, Kilchenmann V, Dübecke A, Beckh G, Praz C, Kast C. Pyrrolizidine Alkaloids from Echium vulgare in Honey Originate Primarily from Floral Nectar. J Agric Food Chem. 2016. 64(25):5267-73.
30. Bošković I.D, Đukić D.A, Mašković P.Z, Mandić L.G Phytochemical composition and biological activity of *Echium italicum* L.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

plant extracts. Bulg Chem Commun. 2017; 49(4):836-845.

31. Abbaszadeh S, Radjabian T, Taghizadeh M. Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Contents of *Echium* Species from Different Geographical Locations of Iran. JMPB. 2013; 1: 23-31.
32. Korkmaz N, Sener S, Badem M, Akkaya S, Aliyazicioglu R. HPLC Profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of *Echium Vulgare* growing in Turkey. IJRSR. 2016; 11(7):14425-14429.
33. Abed A, Minaiyan M, Ghannadi A, Mahzouni P, Babavalian MR. Effect of Echium amoenum Fisch. ET Mey a Traditional Iranian Herbal Remedy in an Experimental Model of Acute Pancreatitis. ISRN Gastroenterol. 2012:141548.
34. Farahani M. Antiviral Effect Assay of Aqueous Extract of Echium amoenum-L against HSV-1. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15:46-48.
35. Raza M, Choudhary M.I. Medicinal Plants with Anticonvulsant. Studies in Natural Products Chemistry.2000; 22: 507-553.
36. Moallem SA, Hosseinzadeh H, Ghoncheh F. Evaluation of Antidepressant Effects of Aerial Parts of Echium vulgare on Mice.JBMS. 2007; 10:189-196.
37. Melissa L. Bainbridge, A. L. L., Jana Kraf. Lipid-Encapsulated Echium Oil (*Echium Plantagineum*) Increases the Content of Stearidonic Acid in Plasma Lipid Fractions and Milk Fat of Dairy Cows. J Agric Food Chem.2015; 63: 4827- 4835.
38. Shariatifar N, Ebadi Fathabad A, Madihi S. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of Echium amoenum on food-borne pathogens.J Food Safe & Hyg. 2016; 2(3-4): 63-66.
39. Eruygura N, Yılmaz G, Kutsal O, Yücel G, Üstün O. Bioassay-guided isolation of wound healing active compounds from Echium Species growing in Turkey.J Ethnopharmacol. 2016; 185:370-6.
40. AL-Fattani M.A, Douglas L.y. Biofilm matrix of candida albicans and candida tropicalls: chemical composition and role in drug resistance.J Med Microbial. 2009;12(5):557-561.
41. Morteza-Semnani K,Saeedi M, Akbarzadeh M.Chemical composition and Antimicrobial Activity of Essential oil of Echium italicum L.Jeobp.2006;55(8):999-1008.
42. 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.
43. 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. 2017; 19(2):75-84.
44. Shahat A.A, Mohmoud A.E, Al-Mishari A.A, Alsaid S.M. Antimicrobial Activities of some SaudiArabian herbal plants. AJtcam. 2017; 14(2): 161
45. Okusa P.N, Penge O, Devleeschouwer M, Duez P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gilletii* De Wild (*Boraginaceae*). J Ethnopharmacol. 2007; 112: 476–481.

Archive of SID
www.SID.ir

46. Errante G, Motta G.L, Lagana C, Wittebolle V, Sarciron M-E, Barret R. Synthesis and evalution of antifungal activity of naphthoquinone derivatives. Eur.J.Med.Chem. 2006; 41: 773-778.

47. Masomi F, Hassanshahian M. Antimicrobial activity of five medicinal plants on candida Albicans. IJT. 2016; 10(6): 39-43.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of the Antifungal effects of various Extracts of the Aerial part and Root of *Echium italicum* on Candida albicans compared with two common antibiotics

***Nabipour F*[*1], Fazilati M[2], Dousti B[3], Mir derikvand R[4]**

1. Ph.D. student of Biochemistry, Department of Biology, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697, Tehran, Iran. nabipor.f@gmail.com
2. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697, Tehran, Iran,
3. Assistant Professor, Department of Biology, Khorramabad branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran
4. Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

Received: *10 Jan 2019* **Accepted:** *2 Feb 2019*

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 10:36 +0430 on Monday June 10th 2019

Abstract

***Background*:** Candidiasis is the most common human infection in the world, and is considered a dangerous disease in people with a weak immune system because of their low resistance to antifungal drugs, the frequent recurrence of infections, and the known complications of chemical drugs. The antifungal properties of different parts of *Echium italicum* were compared with antibiotics for the first time.

Materials and Methods: After collection, identification and drying, water, n-hexane and methanolic extracts from the air and root parts of the plant 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) by the microdilution method. The antibiotics nystatine and fluconazole were used as positive controls and DMSO as the negative control. Data was analyzed bythe t-test and one-way ANOVA.

Results: The results showed that the aqueous, n-hexane and methanolic extracts of different parts of E. italicum plant exhibited antifungal activity against Candida albicans. The mean inhibitory diameter of growth of the methanolic and n-hexane extract in concentration of 5 mg / ml was higher than the nystatin antibiotic inhibitory diameter of growth for Candida albicans ($P<0.05$). The lowest MIC and MFC was of the methanolic extract of the root of the plant for Candida albicans with a value of 15.62 µg / µl.

Conclusion: Extracts of this plant can be used to treat Candida albicans infections.

Keywords: nystatin, Fluconazole, Antifungal, Extract, *Echium italicum*.

Citation: Nabipour F, Fazilati M, Dousti B, Mir derikvand R. Evaluation of the antifungal effects of different extracts of aerial part and root of Echium italicum on Candida albicans and comparison them with two common antibiotics. Yafte. 2019; 21(1):122-134.

Archive of SID
www.SID.ir