فعالیت ضدقارچی اسانس کندر (*Boswellia serrata*) بر علیه ایزوله‌های بالینی مقاوم و حساس کاندیدا آلبیکنس به فلوکونازول

رسول محمدی*، دکتر محمدحسین یادگاری**، دکتر فریبرز معطر***، دکتر معصومه شمس**

چکیده

هدف. کاندیدا آلبیکنس قارچ فرصت طلبی است که در صورت ضعف سیستم ایمنی می تواند در انسان ایجاد بیماری بنماید. کندر گیاهی است که خاصیت ضدباکتریایی و ضد التهابی آن توسط محققین به اثبات رسیده است. هدف از این تحقیق اثر دادن اسانس گیاه کندر بر ۲۵ ایزوله کاندیدا آلبیکنس حساس به فلوکونازول و ۲۵ ایزوله کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول و درنهایت مقایسه این دو گروه می باشد.

روش‌ها. در این تحقیق از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد. برای این منظور با استفاده از دستگاه Clevenger و با استفاده از روش تقطیر با بخار آب اسانس کندر استخراج شد و سپس این اسانس بر سلول های کاندیدا آلبیکنس در گودهای میکروپلیت اثر داده شد و نتایج بررسی گردید.

نتایج. تعداد نمونه ها در این تحقیق ۵۰ ایزوله قارچ کاندیدا آلبیکنس بود که ۲۵ ایزوله حساس به فلوکونازول و ۲۵ ایزوله مقاوم به فلوکونازول بودند. در گروه ایزوله های حساس به فلوکونازول سه ایزوله تا رقت ۱/۳۲ اسانس، هفت ایزوله تا رقت ۱/۶۴ اسانس، هفت ایزوله تا رقت ۱/۱۲۸ و هشت ایزوله تا رقت ۱/۲۵۶ اسانس رشد نکردند. در گروه ایزوله های مقاوم به فلوکونازول یک ایزوله تا رقت ۱/۳۲، شش ایزوله تا رقت ۱/۶۴، هشت ایزوله تا رقت ۱/۱۲۸ و ده ایزوله تا رقت ۱/۲۵۶ اسانس رشد نکردند.

نتیجه‌گیری. با توجه به این که اسانس کندر بر روی همه ایزوله های بکاررفته در این تحقیق اثر مهاری داشته می‌توان آن را اسانسی موثر بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی معرفی و بررسی‌های بالینی اثرات ضد قارچی آنرا توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی. کاندیدا آلبیکنس، فلوکونازول، فعالیت ضد قارچی، کندر.

مقدمه

کاندیدیازیس یکی از مهمترین و شایعترین عفونتهای قارچی فرصت طلب در انسان است که بوسیله برخی گونه های مخمری کاندیدا به وجود کاندیدا آلبیکنس ایجاد می شود. اشکال مختلف بیماری به فرمهای حاد، تحت حاد و مزمن در نواحی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مختلف بدن از جمله پوست ، ناخن، مخاط واژن، برونش، ریه و دستگاه گوارش مشاهده می گردد . این عفونتها معمولاً در ارتباط با اختلال سیستم ایمنی و سایر فاکتورهای مستعد کننده منتشر می‌گردد و اندامهای داخلی نظیر کلیه، کبد و ... را درگیر میسازد (۱، ۲). در سالهای اخیر گزارشات متعددی از شکست در درمان مبتلایان به اشکال بالینی متفاوت کاندیدیازیس اراچه شده است. داروهای ضد قارچی با فرمولاسیونهای متفاوت جهت درمان

* کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.
** دانشیار قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.
*** استاد فارماکوگنوزی، دانشگاه اصفهان.
نویسنده رابط: rasoulm58@yahoo.com
Email:
تاریخ وصول: ۸۴/۱۲/۸ تصحیح نهاچی: ۸۵/۵/۱۵ پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۸

وجود دارد که در بسیاری از موارد بدلیل عدم پاسخ مناسب به درمان، بیماری به شکل مزمن درآمده، گاهی عودهای مکرر مشاهده می‌شود. در میان داروهای ضدقارچی، داروی فلوکونازول بدلیل انتشار مناسب در اکپر بافتهای بدن میزبان، استفاده گسترده‌تری در درمان اشکال موضعی و منتشره بیماری دارد. در سالهای اخیر مطالعات انجام گرفته در مورد حساسیت گونه‌های کاندیدا نسبت به داروهای ضدقارچی و بخصوص فلوکونازول، مکانیسمهای مولکولی مختلفی را در جهت بیان دلایل مقاومت دارویی گونه‌های کاندیدا نشان داده است(۳). هم‌چنین نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضدقارچی که خود منجر به بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آنها می‌گردد و شناسایی بعضی ازفاکتورهای ژنتیکی درارتباط با مقاومت داروی نسبت به فلوکونازول محدودیتهایی را در استفاده از این قبیل ترکیبات ضدقارچی بوجود آورده است(۴، ۵). لذا تحقیقات مختلفی در زمینه یافتن ترکیبات ضدقارچی موپر با منشأ طبیعی و اپرات جانبی کمتر انجام پذیرفته است. در این راستا محققین مختلف اپرات ضدقارچی عصاره‌های گیاهی مختلف نظیر سیر، چریش، پیاز، آویشن و.. را برروی گروه متنوعی از قارچها به اپبات رسانیده‌اند (۶-۹).دربین عصاره‌های گیاهی اپرات ضدمیکروبی گیاه کندر(Boswellia) برروی برخی ارگانیسم‌ها نظیر باکتریها و ویروسها و هم‌چنین اپرات ضدالتهابی آن بررسی شده است و مطالعات اندکی برروی اپرات ضدقارچی این گیاه صورت گرفته است(۱۰-۱۳). لذا تحقیق حاضر با هدف تعیین اپرات ضدقارچی اسانس گیاه کندر برروی ایزوله‌های مقاوم و حساس به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس طراحی گردیده است.

مواد و روشها

با استفاده ازدستگاهClevenger اسانس‌گیری انجام شد(۱۴). بدین طریق که ۱۰۰گرم از پودر کندر (شناسایی شده در شرکت داروسازی گل دارو) را به همراه ۳۰۰ cc آب مقطر و چند عدد پرل شیشه‌ای درون فلاسک دستگاه ریخته و بمدت ۳-۴ ساعت با حرارت 100^{0C} روی هیتر قرار دادیم تا مواد

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

داخل فلاسک به جوش آید. پس از این مدت اسانس استخراج شده در لوله جمع‌آوری کننده اسانسِ دستگاهClevengerجمع‌آوری گردید. سپس با استفاده از روش انتشار دارو در محیط کشت جامد و اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌های فلوکونازول ایزوله‌های مقاوم و حساس به فلوکونازول شناسایی شدند(۱۵، ۱۶). سپس با استفاده از میک‌روپلیت های ۹۶ خانه‌ای به هر گوده پلیت ۱۰۰ میک‌رولیتر محیط سابورودکستروزبراپ اضافه شد. پس از آن میزان ۱۰۰ میک‌رولیتر اسانس به گوده اول اضافه شد و با انتقال به گوده‌های بعدی رقت‌های متوالی از اسانس تهیه گردید. سپس به هر گوده تعداد ۱۰۰۰ سلول کاندیدا آلبیکنس که با استفاده از لام نچوبار شمارش شدند اضافه گردید. پس از۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد، نتایج از نظر کدورت ایجاد شده در گوده‌ها بررسی گردید. گوده قبل از اولین گوده‌ای که در آن کدورت مشاهده شده بعنوان Minimum Inhibitory Concentration (MIC) **در نظر گرفته می شود. میزان ۱۰ میک‌رولیتر از هر گوده به محیط** Sabouraud Dextrose Agar (SDA) **منتقل شده وپس از کشت جارویی برروی محیط بوسیله سوآپ استریل وانکوباسیون به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد میزان** Minimum Fungicidal Concentration(MFC) **هر ایزوله محاسبه شد (۱۹-۱۷).**

نتایج

در گروه ایزوله‌های حساس به فلوکونازول سه ایزوله(۱۲٪) تا رقت ۱/۳۲، هفت ایزوله(۲۸٪) تا رقت ۱/۶۴، هفت ایزوله(۲۸٪) تا رقت ۱/۱۲۸ و هشت ایزوله(۳۲٪) تا رقت ۱/۲۵۶ اسانس از خود رشدی نشان نداده و در گروه ایزوله‌های مقاوم به فلوکوتازول یک ایزوله (۴٪) تا رقت ۱/۳۲، شش ایزوله (۲۴٪) تا رقت ۱/۶۴، هشت ایزوله (۳۲٪) تا رقت ۱/۱۲۸ و ده ایزوله (۴۰٪) تا رقت ۱/۲۵۶ اسانس از خود رشدی نشان ندادند. یک میلی‌لیتر اسانس کندر برابر ۰/۸ گرم وزن دارد. در رقت ۱/۲ از آنجاچیکه ما در حجم ۲ میک‌رولیتر ۰/۸ میک‌رولیتر اسانس داریم حال در ۱۰۰۰میک‌روگرم که برابر با ۱ میلی لیتر است مقدار۴۰۰ µg/ml اسانس داریم. بهمین ترتیب در رقتهای ۱/۴ = ۲۰۰ µg/ml، ۱/۸= ۱۰۰ µg/ml، ۱/۱۶ = ۵۰ µg/ml، ۱/۳۲ = ۲۵ µg/ml، ۱/۶۴ = µg/ml ۱/۱۲۸ =۶/۲۵ µg/ml، ۱/۲۵۶ = ۱۲/۵ µg/ml، ۳/۱۲۵ µg/ml = اسانس کندر موجود است. در گروه ایزوله‌های حساس به فلوکونازول نتایج MIC به ترتیب سه ایزوله (۱/۱۶)، هفت ایزوله (۱/۳۲)، هفت ایزوله (۱/۶۴)، هشت ایزوله (۱/۱۲۸) بود (جدول ۱). درگروه ایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول نتایج MIC به ترتیب یک ایزوله (۱/۱۶)، شش ایزوله (۱/۳۲)، هشت ایزوله (۱/۶۴)، ده ایزوله (۱/۱۲۸) بود (جدول ۲).

جدول ۱. نتایج MIC در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس حساس به فلوکونازول

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تعداد ایزوله‌ها	۸	۷	۷	۳
MIC, µg /µl	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰
رقت اسانس	۱/۱۲۸	۱/۶۴	۱/۳۲	۱/۱۶

جدول۲. نتایج MIC در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس حساس به فلوکونازول

تعداد ایزوله‌ها	۱۰	۸	۶	۴
MIC, µg /µl	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰
رقت اسانس	۱/۱۲۸	۱/۶۴	۱/۳۲	۱/۱۶

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس کندر برروی همهٔ ایزوله‌های به کار رفته اثر مهاری داشت. باتوجه به مقاومت روزافزون قارچ‌ها به داروهای ضدقارچی شیمیایی و اثرات جانبی فراوان این داروها بر سلولهای بدن، محققان به فکر استفاده از گیاهان داروی در درمان بیماریهای قارچی افتاده‌اند. کندر از جمله گیاهان دارویی است که تحقیقات زیادی روی آن انجام شده است. بعنوان مثال:

Ammon **و همکاران در سال** ۱۹۹۲ **نشان دادند که اسانس موجود در کندر، دارای اثر شل کنندگی برروی عضلات عروق بالاخص عروق مغزی بوده وموجب برطرف شدن اس‌پاسم و تنگی عروق و در نتیجه خون رسانی بهتر به بافتها و سلولها می‌گردد(۲۰).**

دانشمندان آلمانی سهم به سزایی درتحقیقات انجام گرفته برروی این گیاه دارند بطوری‌که Martinetz **در سال** ۱۹۹۲ **ثابت نمود که مشتقات بوزولی‌ک اسید موجود در کندر بخصوص استیل** ۱۱- **کتوبوزولی‌ک اسید از لحاظ فارماکولوژی بسیار فعال بوده و بطور خاص باعث مهار سنتز لکوترین آندروژن می‌گردد(۲۱).**

از طرف دیگر Wasielewski, Ammon **و همکاران در دو تحقیق جداگانه، گیاه کندر را برای درمان سرطان معده، کبد، طحال و تومورهای ناحیه شکم و مقعد و سرطان نوک پستان توصیه نمودند(۲۲، ۲۳). افزون براین** Muller **برای گیاه کندر اثرات ضد اس‌پاسم، آرامبخش، ترمیم کنندگی زخم‌ها و بثورات جلدی قاچل شده و کاربرد آنرا درمانی موپر برای پلی آرتریت و زخم‌های کولیت معرفی نموده است(۲۴). شایان ذکر است که دانشمندان ایران زمین قرنها پیش به خواص ضدالتهابی و ترمیم کنندگی گیاه کندر اشاره کرده‌اند(۲۵، ۲۶). برخی محققان نیز اثرات افزایش دهندگی حافظه توسط این گیاه را ثابت نمودند. بعنوان مثال: طوری و همکاران نیز تحقیقاتی انجام داده و با استفاده از متد محرک‌های شرطی غلظت‌های مختلف تهیه شده از اسانس کندر را در حیوان با در نظر گرفتن گروه کنترل بررسی کردند که نتایج بدست آمده افزایش میزان حافظه را در حیوان آزمایشگاهی به میزان ۵۶-۳۶ درصد نشان داده است(۲۷).**

Adelakun **و همکاران نیز در سال** ۲۰۰۱ **اثرات ضد باکتریایی و ضد ویروسی کندر را به اثبات رسانیدند(۱۰).**

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

با توجه به این که در جستجوهای انجام گرفته هیچ‌گونه مطلبی در زمینه اپرات ضدقارچی این گیاه به دست نیامد، در این تحقیق سعی شد تا اپرات ضدقارچی اسانس این گیاه ارزیابی گردد تا بتوان با استفاده از اسانس این گیاه به عنوان درمان کمکی همراه داروهای شیمیایی ضدقارچ در درمان بیماران مبتلا به کاندیدیازیس از آن بهره گرفت.

نتیجه‌گیری

با توجه به اپر مهاری اسانس کندر بر روی ۵۰ ایزوله بالینی کاندیدا آلبیکنس بکار رفته در این تحقیق می‌توان این اسانس را، اسانسی مؤثر در ممانعت از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس (در شرایط آزمایشگاهی) معرفی کرده و جهت استفاده کلینیکی از اسانس این گیاه انجام تحقیقات بیشتری هم‌چون بررسی PH، بررسی مواد شیمیایی موپر در اسانس کندر، تغییرات حاصل از حرارت دادن اسانس کندر و ... را توصیه نمود

منابع

1. Rippon, JW. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes. 2 ed. Philadephia: W.B. Saunders. 1982, 433 – 434.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology .2 ed. Philadelphia. Lea & Febi ger. 1992, 280-289.
3. White, TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of Candida albicans. Antimicrob agents and Chemo, ther 2002, 46(6): 1704- 1713 .S
4. Morschhauser, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans. Biochim-Biophysi Acta, 2002, 1587, 240- 248.
5. Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Molecular heterogenity of fluconazole – resistant and susceptible oral Candida albicans isolates within a single geographic local. APMIS, 2002, 110(4), 315- 324.
6. Adetumbi MA, Lau BH. Allium sativum (garlic) a natural antibiotic. Med Hypotheses, 1983, 12(3), 227 – 237.
7. Shams Ghahfarokhi M, Razafsha M, Allameh AA, Razzaghi Abyaneh M. Inhibitory effects of aqueous onion and garlic extracts on growth and keratinase activity in Trichophyton Mentagrophytes. Iranian Biomedical Journal, 2003, 7(3), 113-118.
8. Wang HX. Nigour TB. Isolation of allicepin a novel antifungal peptide from onion (Allium cepa) bulbs. J Pet Sci, 2004, 10(3): 173-177.
9. Motsei ML. Lindsey KL, Van Staden J, Jager AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against Candida albicans. J Ethnopharmacol, 2003, 86(2-3): 235-241.
10. Adelakun EA. Finbar EA, Agina SE. Makinele AA. Antimicrobial activity of Boswellia dalziellii stem bark. Fitoterapia, 2001, 72(7), 822- 824.
11. Darshan S, Doreswamy R. Patented anti-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1992, 57(3): 203-207.
21. Martinetz D. Der indische weihrauch neue Aspekete eines altes Harzes. Phytother, 1992, 13: 121-125.
22. Ammon HPT. Entzundliche Darmerkarankungen Weihrauch bei colitis ulcerosa. Dt Apoth Zth 1997, 37(3), 139 - 140 .
23. Wasielewski S, Maligne G. Weihrauchextract bei bosartigen Hirntumoren. DAZ, 1997, 137(26), 2250-2251.
24. Muller T. Chemie und pharmakologie des Weihrauches Boswellia sauren gegen choronische polyarthritis und Colitis ulcerosa. DAZ, 1996, 136(48), 4324-4325.

۲۵. **ابوعلی سینا ح. قانون فی‌الطب. چاپ دوم. تهران. انتشارات سروش.** ۱۳۶۲. ۱۸۳–۸۳.

۲۶. **هروی ا. الابنیه عن الحاچق الادویه. تهران . انتشارات دانشگاه تهران .** ۱۳۶۸. ۲۷۱– ۲۷۰ .

۲۷. **طوری ل. بررسی فارماکوگنوزی ومطالعه تاپیر فرآورده‌های تهیه شده از کندر بر روند افزایش سرعت یادگیری و حافظه در رت به روش** Active Auoidance **(پایان‌نامه دکترای داروسازی). اصفهان. دانشکده داروسازی علوم پزشکی اصفهان.** ۱۳۷۴ . ۴ **–۱ و ۲۳–۲۱.**

۱۲. **کپیری م. اپرات دارویی و فیزیولوژی‌کی کندر (پایان‌نامه دکتری داروسازی). تهران. دانشگاه علوم پزشکی تهران.** ۱۳۴۱. ۵۶– ۱۲.

۱۳. **مینویی ل. کندر و اقسام آن (پایان‌نامه دکترای داروسازی). تهران. دانشگاه علوم پزشکی تهران.** ۱۳۴۰. ۶۹ – ۲۵.

inflammatory plant drug development from traditional medicine. Phytother Res, 2004, 18(5), 343-357.

14. The Brithish Pharmacopeia. Commission. Her Majesty Stationary Office. London, 2003. vol IV. A243-A249.
15. Scheven M. Susceptibility testing of yeasts to fluconazole by Etest and agar-diffusions disk test using the synthetic agar medium Mycoplate. Myco. 2002, 45, 156-159.
16. Sandven P. Detection of fluconazole-resistant candida strains by a disk diffusion screening test. J of Cli Micro. 1999, 37(12), 3856 – 3859.
17. Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S. Comparison of visual and spectrophotometris methods of MIC and point determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents including the new triazole. J Clin Micro, 1995, 33, 1094-1097.
18. Galgiani JN, Rinadi MG, Polak AM, Pfaller MA. Standardization of antifungal susceptibility testing. J Med. & Vet Mycol, 1992, 30(1), 213- 227.
19. Arthington-Skaggs BA, Motley M, Warnoch DW, Morrison CJ. Comparative evaluation of PASCO national committee for clinical laboratory standards M27-A broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of yeast. J Clin Micro, 2003, 38, 2254- 2260.
20. Ammon HP, Mack T, Singh GB, Safayhi H. Inhibition of Leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudates of Bowellia serrata. Planta Med

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Antifungal activity of *Boswellia serrata's* essential oil against fluconazole resistant and susceptible isolates of *Candida albicans* .

Rasoul Mohammadi,[*] Dr. Mohammad hosein Yadegari,[**] Dr. Fariborz Moattar.[**] Dr. Masoumeh Shams.[***]

Abstract:

Candidiasis as an opportunistic infection is created by some species of Candida here the role of *Candida albicans* is more noticeable than other species. Candida can make an extended variety disease symptoms appear in human body. According to the increasing consumption of immunosupress drugs including Corticostroides and some diseases like diabetes, this disease has drown attention more than before. Considering the side effects of antifungal chemical drugs and the high price of them.

We used the essential oil of *Boswellia serrata* against the isolates of Candida that are sensitive and resistant to fluconazole, the number of samples that was used in this research was fifty. Twenty five of them were sensitive to the fluconazole and the twenty five ones were resistant to the fluconazole. So, in order to this experiment different (densities) were prepared in microplate. Then one thousand of *Candida albicans* were added to each well and after twenty four hours of incubation the number of Candida in each well was counted.

In group of sensitive isolates, three isolates didn't grow up to the dilution of $1/32_{nd}$ of essential oil, seven isolates up to the dilution of $1/64_{th}$, seven isolates up to the dilution of $1/128_{th}$, eight isolates up to the dilution of $1/256_{th}$.

And in group of resistant isolates one isolate didn't grow up to the dilution $1/32_{nd}$ of essential oil, six isolates up to the dilution of $1/64_{th}$, eight isolates up to the dilution of $1/128_{th}$ and ten isolates up to the dilution of $1/256_{th}$.

Key words: *Candida albicans,* Fluconazole, Antifungal activity, *Boswellia serrata.*

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com