DOI: 10.22122/jims.v39i618.13860 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۱۸/هفته‌ی دوم خرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۸ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۳/۱۴

اثرات ضد قارچی عصاره هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه بر روی عوامل قارچی در مقایسه با آمفوتریسین B

آذر پورنجفیان[۱]، علی ناصری[۲]، عبدالمجید فتی[۳]، حسن رخشنده[۴]، منور افضل آقایی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ظهور گونه‌های قارچی مقاوم و عوارض جانبی زیاد داروهای ضد قارچی، محققان را به گسترش روش‌های جدید درمانی بر ضد قارچها ترغیب می‌کند. هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی اثرات ضد قارچی عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه بر روی عوامل قارچی جدا شده از نمونه‌های بالینی بود.

روش‌ها: در این مطالعه، با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط مایع (Broth microdilution)، اثر ضد قارچی عصاره‌های هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه که با دو روش خیساندن و سوکسله تهیه شده بود، بر ضد ۱۱ ایزوله‌ی کاندیدایی (کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس) جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران مورد آزمایش قرار گرفت. ایزوله‌های کاندیدایی در مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره‌های ذکر شده قرار گرفتند و میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) از رشد هر یک از عصاره‌ها در مقایسه با آمفوتریسین B تعیین گردید.

یافته‌ها: عصاره‌های هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه، فعالیت ضد قارچی علیه ایزوله‌های کاندیدایی داشتند. مقادیر MIC90 عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه به روش خیساندن و سوکسله برای کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس به ترتیب ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین، مقادیر MIC90 عصاره‌ی هیدروالکلی گزنه به روش خیساندن و سوکسله برای هر دو گونه‌ی کاندیدا در هر دو روش، ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. علاوه بر این، میزان MIC90 آمفوتریسین B در برابر کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: هرچند آمفوتریسین B به عنوان داروی مؤثر، در برابر گونه‌های کاندیدا اثر ضد قارچی بهتری نشان می‌دهد، اما عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه نیز دارای اثرات ضد قارچی قابل قبولی بر روی ایزوله‌های کاندیدایی مورد بررسی می‌باشند و از بین این دو، عصاره‌ی گزنه اثربخشی بهتری نسبت به عصاره‌ی سیاهدانه دارد.

واژه های کلیدی: سیاهدانه؛ گزنه؛ کاندیدا آلبیکنس؛ کاندیدا پاراپسیلوزیس

ارجاع: پورنجفیان آذر، ناصری علی، فتی عبدالمجید، رخشنده حسن، افضل آقایی منور. **اثرات ضد قارچی عصاره هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه بر روی عوامل قارچی در مقایسه با آمفوتریسین B.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۱۸): ۲۰۵-۱۹۸.

مقدمه

عفونت‌های مخمری از جمله کاندیدیازیس، از جمله مهم‌ترین و شایع‌ترین عفونت‌های قارچی فرصت‌طلب هستند که به صورت حاد، تحت حاد و مزمن در پوست، ناخن، سطوح مخاطی واژن، برونش، ریه و دستگاه گوارش ایجاد می‌شوند. این عفونت‌ها گاهی نیز منتشر می‌شوند و کلیه، کبد، ریه و قلب را گرفتار می‌سازند (۱). اونیکومایکوزیس ناشی از مخمرها، در بالغین بیشتر مشاهده می‌شود و شیوع آن در زنان ۲ تا ۳ برابر مردان است (۳-۲). از نظر بعضی محققان، تشخیص اونیکومایکوزیس مخمری بسیار مهم است؛ چرا که در برخی از موارد، وضعیت ایمنی شخص را نشان می‌دهد و شواهد زیادی وجود دارد که تشخیص اونیکومایکوزیس کاندیدایی به شناسایی عفونت پیشرفته‌ی Human immunodeficiency virus (HIV) کمک کرده است (۴).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات سالک جلدی و گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- استادیار، مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- دانشیار،گروه اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علی ناصری ؛ دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Email: naseria@mums.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

سمیت داروهای ضد قارچی، مقاومت دارویی در قارچها و تداخلات دارویی، ضرورت استفاده از داروهای با تأثیر بیشتر و سمیت کمتر را موجب شده است. به همین دلیل، امروزه گیاهان دارویی در فرایند درمان و داروشناسی بیشتر از همیشه مورد توجه قرار گرفتهاند (۵).

تاکنون محققان زیادی در تلاش برای دستیابی به مواد ضد قارچ با منشأ طبیعی و اثرات جانبی کمتر بودهاند. در این رابطه، فعالیت ضد قارچی برخی از گیاهان دارویی به اثبات رسیده است. از اینرو، هدف از انجام پژوهش حاضر این بود که ضمن اثبات اثرات ضد قارچی عصارههای هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه، بتوان به ترکیب جایگزینی برای داروهای ضد قارچی کنونی که صرف نظر از بحث مقاومت دارویی عوامل قارچی نسبت به آنها، همواره عوارض جانبی آنها یکی از دغدغههای بیماران بوده است، دست پیدا کرد.

سیاهدانه (Nigella sativa) گیاهی از خانوادهی Ranunculaceae و یک گیاه دارویی با گستردگی پراکنده در سراسر جهان است. دانههای سیاهدانه به طور وسیعی در درمان بیماریهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

مطالعات گستردهای در مورد سیاهدانه توسط محققان مختلف انجام شده و طیف گستردهای از اقدامات دارویی آن مورد بررسی قرار گرفته است که شامل داروهای ضد دیابتی، ضد سرطان، ایمنسازی، ضد درد، ضد میکروبی، ضد التهابی، اسپاسمولیتیک، برونکودیلاتور، محافظ کبد، محافظ کلیه، ضعف دستگاه گوارش، خواص آنتیاکسیدانی و... میباشد (۶).

گزنه (Urtica dioica) یکی از اعضای خانوادهی Urticaceae میباشد که خواص دارویی بسیاری دارد و صدها سال است که در طب سنتی جهان جهت معالجهی بیماریهای انسان به کار میرود (۷).

استفادهی انسان از گیاهان به عنوان دارو، از ابتدای تمدن بشری تاکنون ادامه دارد. داروهای گیاهی به عنوان درمان جایگزین با عوارض کمتر و خواص متعدد و در برخی موارد به عنوان تنها درمان مؤثر، مورد استفاده قرار میگیرد (۸).

در پژوهشهای مختلفی (۱۰-۸)، اثرات دارویی و ضد قارچی گیاه سیاهدانه و گزنه مورد بررسی قرار گرفته که در ادامه به آنها اشاره شده است.

مرادی و امینی در ساوه به بررسی اثرات ضد باکتری و ضد قارچی عصارهی اندامهای مختلف گیاه گزنه به روش دیسک دیفیوژن پرداختند و به این نتیجه رسیدند که عصارهی آبی برگ گزنه در رقتهای مختلف، اثر ضد قارچی مناسبی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس داشته است (۹). در مطالعهی قائدی و همکاران نیز عصارهی نانوذرات هیدروکسید گل گزنه در غلظتهای ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میلیگرم بر میلیلیتر در برابرکاندیدا آلبیکنس، فعالیت ضد قارچی از خود نشان داد (۸). همچنین، بر اساس تحقیقی که توسط ضیایی و همکاران انجام شد، روغن سیاهدانه اثر ضد قارچی قوی به خصوص بر علیه گونههای آسپرژیلوس نشان داد و عصارهی آبی این گیاه اثر مهاری بر گونههای کاندیدایی داشت (۱۰).

مصرف گیاهان دارویی در کشورهای مختلف به دلیل اثبات اثربخشی بسیاری از آنها و مقبولیت آن در بیشتر جوامع بشری، روز به روز در حال افزایش میباشد و به دلیل عوارض قابل توجه داروهای شیمیایی، استفاده از ترکیبات طبیعی به صورت جایگزین یا مکمل درمان، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است (۸). هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی اثرات ضد قارچی عصارهی هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه بر روی ایزولههای کاندیدایی جدا شده از نمونههای بالینی به منظور دستیابی به ترکیب احتمالی ضد قارچی جدید با عوارض جانبی کمتر بود.

روشها

این مطالعه به روش تجربی- آزمایشگاهی و با هدف بررسی اثرات عصارههای هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه بر روی عوامل جدا شده از نمونههای بالینی در بیمارانی که توسط پزشکان به آزمایشگاههای قارچشناسی بیمارستانهای امام رضا (ع) و قائم (عج) مشهد ارجاع داده شده بودند، طی سالهای ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد. جهت تشخیص ایزولهها، همزمان از دو روش آزمایش مستقیم و کشت و سپس آزمایشهای مولکولی استفاده گردید. تحقیق حاضر بر روی گونههای کاندیدایی جدا شده از بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس شامل کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس که از قبل با روش Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) شناسایی شده بودند، انجام گرفت.

در پژوهش حاضر، از روش استاندارد Broth microdilution به منظور بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی Minimum inhibitory concentration (یا MIC) عصارههای هیدروالکلی سیاهدانه، گزنه و داروی آمفوتریسین B استفاده شد. گیاهان مورد بررسی از منابع تجاری تهیه و در هرباریوم دانشکدهی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأیید هویت شد. پس از شستشو با آب مقطر در درجهی حرارت اتاق و شرایط سایه، خشک و پودر شد. پودر به دست آمده با روش خیساندن (Maceration) و سوکسله (Soxhlet) عصارهگیری گردید.

طرز تهیهی عصارهی هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه به دو روش خیسانده و سوکسله در ادامه آمده است.

۱- روش خیساندن: ۵۰ گرم پودر گیاه در ۳۰۰ سیسی الکل ۷۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد و سپس در آون ۴۰ درجهی سانتیگراد قرار گرفت. در این مدت، ۲ تا ۳ بار محلول تکان داده شد و سپس با استفاده از کاغذ Whatman صاف شد و به وسیله دستگاه حذف حلال در فشار کم و حرارت ۴۰ درجهی

سانتی‌گراد، حلال حذف گردید.

۲- روش سوکسله: ۵۰ گرم پودر داخل کارتوش ریخته و در دستگاه سوکسله قرار داده شد. پس از آن، ۵۰۰ سی‌سی الکل ۷۰ درصد داخل دستگاه اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام گرفت. سپس عصاره مانند روش قبل با دستگاه حذف حلال در فشار کم، حذف شد.

عصاره‌ی به دست آمده در هر دو روش، برای ادامه‌ی کار و انجام مطالعات، در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در زمان انجام کار، ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره با استفاده از ترازوی الکترونیکی با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم وزن و در ۱ میلی‌لیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) حل شد. بعد از ورتکس کردن آن، محلول آماده آزمایش گردید (۱۱، ۸).

تعیین MIC عصاره‌ها: این کار با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط مایع (Broth microdilution) در کنار داروی آمفوتریسین B طبق پروتکل استاندارد CLSIM27-A3 برای قارچ‌های مخمری و طی مراحلی که در ادامه آمده است، انجام گرفت.

۱- تهیه‌ی رقت‌های سریالی عصاره‌های هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه: ابتدا در ۱۰ میکروتیوب استریل، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ریخته شد. سپس از رقت عصاره‌ی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده، ۱۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب اول اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب اول به میکروتیوب دوم انتقال داده شد و این عمل تا میکروتیوب دهم ادامه یافت و از میکروتیوب دهم، ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط عصاره و RPMI دور ریخته شد. بدین ترتیب، رقت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲۵، ۰/۷۸۱۲، ۰/۳۹۰۶، ۰/۱۹۵۳ و ۰/۰۹۷۶۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره به دست آمد. این رقت‌های سریالی برای عصاره‌های هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه که هر کدام به دو روش خیساندن و سوکسله تهیه شده بودند، انجام گرفت (۱۱، ۸).

۲- تهیه‌ی محلول مادر (استوک) دارویی: طبق راهنمای پروتکل، داروی آمفوتریسین B (سیگما، آمریکا) در DMSO حل گردید. محلول دارویی حاصل به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس با محیط RPMI-۱۶۴۰ سیگما حاوی گلوتامین و بدون بی‌کربنات بافر شده با مورفولین پروپان سولفونیک (۳-Morpholinopropane sulfonic یا MOPS) که در pH = ۷ تنظیم شده بود، به نسبت ۱ به ۵ رقیق و رقت‌های سریالی از ۰/۰۳۱۲۵ تا ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید (۱۳-۱۲).

۳- تهیه‌ی سوسپانسیون قارچ مخمری: ابتدا گونه‌های کاندیدایی مورد نظر در محیط Sabouraud dextrose agar (SDA) حاوی کلرامفنیکل (Conda-Spanish) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. مقداری آب مقطر استریل داخل کووت دستگاه ریخته و ترانس‌میتانس دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۱۰۰ تنظیم شد. سپس مقداری از کلنی کاندیدا داخل کووت حاوی آب مقطر ریخته شد و ورتکس گردید و کووت‌ها داخل دستگاه قرار گرفت؛ به طوری که در طول موج ۵۳۰ نانومتر، ترانسمیشن ۷۷-۷۵ درصد به دست آمد. این سوسپانسیون استوک حاوی ۱۰۶ × ۴-۱ ارگانیسم در هر میلی‌لیتر بود. سوسپانسیون به دست آمده با استفاده از آب مقطر استریل به نسبت ۱/۱۰ رقیق و بعد از شیک، دوباره با استفاده از محلول RPMI به نسبت ۱/۱۰۰ رقیق گردید. سوسپانسیون حاصل به طور تقریبی حاوی ۱۰۳ × ۴-۱ کاندیدا در هر میلی‌لیتر بود (۱۲).

طبق پروتکل، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های عصاره‌ها و داروی تهیه شده به چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه و در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی نیز به هر چاهک افزوده شد. چاهک دوازدهم، کنترل مثبت در نظر گرفته شد و حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری، ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI فاقد دارو یا عصاره‌ی گیاهی بود. از RPMI همراه با دارو یا عصاره‌ی گیاهی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پس از کامل شدن، پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند (۱۲).

جهت خواندن نتایج از روش چشمی (Visual) استفاده گردید و اولین چاهکی که باعث مهار رشد قارچی شده بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

از سوش‌های استاندارد کاندیدا پاراپسیلوزیس ATCC 22019 و کاندیدا آلبیکنس PTCC 5027 به منظور کنترل کیفی آزمایش استفاده گردید. لازم به ذکر است که آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

یافته‌ها

از ۱۱ ایزوله‌ی شناسایی شده‌ی مربوط به اونیکومایکوزیس کاندیدایی، ۶ مورد مربوط به بیماران زن و ۵ مورد مربوط به بیماران مرد بود. از این ۱۱ ایزوله، ۹ مورد به ناخن دست و ۲ مورد به ناخن پا اختصاص داشت.

نتایج MIC عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه تهیه شده با روش خیسانده و سوکسله و داروی آمفوتریسین B در جدول ۱ ارایه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین محدوده‌ی MIC عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه‌ی خیسانده و سوکسله در گونه‌های آلبیکنس و پاراپسلوزیس، ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کمترین محدوده‌ی MIC عصاره‌ی خیسانده‌ی سیاهدانه در هر دو گونه‌ی

جدول ۱. نتایج فعالیت‌های مهار رشد Minimum inhibitory concentration-90 (MIC90) و MIC50 عصاره‌های هیدروالکلی سیاهدانه، گزنه و آمفوتریسین B بر روی گونه‌های کاندیدا

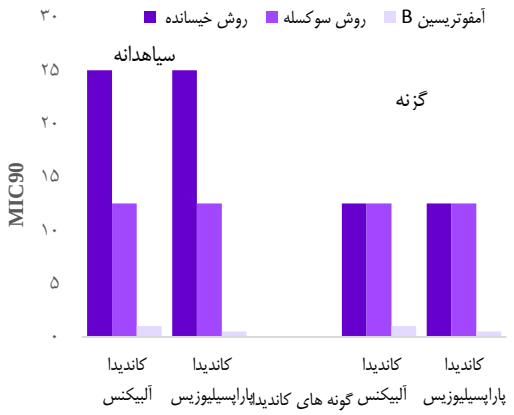
ارگانیسم	عصاره/ دارو	MIC90** (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	MIC50*** (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	طیف MIC	GM#
کاندیدا آلبیکنس	سیاهدانه‌ی خیسانده	۲۵/۰	۲۵/۰	۵۰- ۲۵	۲۵/۰
	سیاهدانه‌ی سوکسله	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰- ۱۲/۵	۱۳/۶
	گزنه‌ی خیسانده	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰- ۱۲/۵	۱۲/۵
	گزنه‌ی سوکسله	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰- ۱۲/۵	۱۲/۵
	آمفوتریسین B*	۱/۰	۱/۰	۱۶- ۰/۲۵	۰/۶
کاندیدا پاراپسیلوزیس	سیاهدانه‌ی خیسانده	۲۵/۰	۲۵/۰	۵۰- ۲۵	۲۵/۰
	سیاهدانه‌ی سوکسله	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰- ۱۲/۵	۱۲/۵
	گزنه‌ی خیسانده	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰- ۱۲/۵	۱۲/۵
	گزنه‌ی سوکسله	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰- ۱۲/۵	۱۲/۵
	آمفوتریسین B*	۰/۵	۰/۵	۱۶- ۰/۲۵	۰/۵

*واحد اندازه‌گیری میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد، **حداقل غلظتی از دارو/ عصاره که باعث مهار رشد ۹۰ درصد ایزوله‌های قارچی شود، ***حداقل غلظتی از دارو/ عصاره که باعث مهار رشد ۵۰ درصد ایزوله‌های قارچی شود، #میانگین هندسی نتایج MIC که با استفاده از نرم‌افزار Excel قابل محاسبه می‌باشد.

MIC: Minimum inhibitory concentration; GM: Geometric range

کاندیدایی، ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اما کمترین محدوده‌ی MIC عصاره‌ی سوکسله‌ی سیاهدانه، ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش گردید. این میزان در مورد عصاره‌ی گزنه‌ی تهیه شده با روش‌های خیسانده و سوکسله نیز در هر دو گونه‌ی کاندیدایی، ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد که نشان دهنده‌ی اثر بخشی بهتر عصاره‌های تهیه شده با روش سوکسله بر روی گونه‌های کاندیدایی بود.

شکل ۱ بیان‌کننده‌ی مقادیر MIC90 عصاره‌ها و داروی آمفوتریسین B می‌باشد. بر این اساس، MIC90 عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه‌ی تهیه شده با روش خیساندن در هر دو گونه‌ی کاندیدا، ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اما MIC90 این عصاره تهیه شده با روش سوکسله، ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و میزان MIC90 داروی آمفوتریسین B مربوط به کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس به ترتیب ۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین، MIC90 عصاره‌ی هیدروالکلی گزنه تهیه شده با روش خیساندن و سوکسله در هر دو گونه‌ی کاندیدا، ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که نشان داد هرچند عصاره‌ی گزنه نسبت به داروی آمفوتریسین B تأثیر کمتری بر روی گونه‌های کاندیدایی داشته، اما اثربخشی آن بر روی گونه‌های مورد بررسی نسبت به عصاره‌های سیاهدانه بهتر بوده است.



شکل ۱. مقایسه‌ی Minimum inhibitory concentration-90 (MIC90) عصاره‌های هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه بر روی گونه‌های کاندیدا

MIC: Minimum inhibitory concentration

بحث

پژوهشگران برای درمان بیماری‌های قارچی، درصدد یافتن ترکیباتی هستند که اثرات بسیار خوب و عوارض جانبی کمتری داشته باشد. بدین منظور، تاکنون مطالعات مختلفی بر روی اثرات گیاهان و استفاده از آن‌ها به عنوان داروی جایگزین صورت گرفته است (۱۴) که گیاهان سیاهدانه و گزنه از این قضیه مستثنی نبوده‌اند.

مقایسه‌ی داده‌های به دست آمده از عصاره‌های هیدروالکلی سیاهدانه و گزنه نشان داد که عصاره‌ی خیسانده‌ی گیاه سیاهدانه با غلظت بالاتری اثر ضد قارچی داشت و عصاره‌ی سوکسله‌ی آن با غلظت پایین‌تر این اثر را نشان داد. پس می‌توان نتیجه گرفت که ماده‌ی ضد قارچ در مقابل حرارت مقاوم است و از طرف دیگر، حرارت منجر به استخراج بیشتر ماده‌ی مؤثره می‌شود. بنابراین، با غلظت کمتر اثر داشته است، اما درگیاه گزنه با توجه به این که غلظت مؤثره‌ی سوکسله و خیسانده با هم برابر بود، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ماده‌ی ضد قارچ گزنه به راحتی در عصاره‌ی خیسانده حل می‌شود و برای استخراج آن نیاز به حرارت نیست. از طرف دیگر، به دلیل این که عصاره‌ی سوکسله هم با همان غلظت خیسانده اثر داشته است، ماده‌ی

مؤثره در مقابل حرارت پایدار و اثر ضد قارچی دو روش عصاره‌گیری یکسان می‌باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده، عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه بر روی گونه‌های آلبیکنس و پاراپسیلوزیس اثر مهاری ضد قارچی داشت؛ به طوری که MIC90 عصاره‌ی هیدروالکلی سیاهدانه تهیه شده با روش خیساندن، بر روی گونه‌های آلبیکنس و پاراپسیلوزیس، ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در روش سوکسله، ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که این مهار رشد در سایر تحقیقات (۱۸–۱۵، ۹) نیز گزارش شده است.

مقیم و همکاران در شهرکرد، فعالیت‌های ضد قارچی عصاره‌ی دو گیاه آویشن شیرازی و سیاهدانه را بر روی کاندیدا آلبیکنس به روش میکرودایلوشن براث مورد ارزیابی قرار دادند. میزان MIC عصاره‌ی سیاهدانه بر روی کاندیدا آلبیکنس، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، MIC50 آن ۲۷/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، MIC90 آن ۵۲/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و Minimum fungicidal concentration (MFC)، ۷۲/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عنوان شد. بر اساس پژوهش آنان، عصاره‌های این دو گیاه فعالیت ضد قارچی خوبی از خود نشان دادند (۱۵).

در مطالعه‌ی حاضر، MIC90 عصاره‌ی هیدروالکلی گزنه بر روی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس، در هر دو روش خیسانده و سوکسله، ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

مرادی و امینی در ساوه، به بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی اندام‌های مختلف گیاه گزنه پرداختند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های آبی بخش‌های مختلف گیاه نسبت به عصاره‌های الکلی، دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بود. در تحقیق آنان، عصاره‌ی آبی برگ گزنه در رقت‌های مختلف (۰/۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اثر ضد قارچی مناسب‌تری بر قارچ کاندیدا آلبیکنس از خود نشان داد. همچنین، اثر عصاره‌ی اتانولی ساقه بر روی کاندیدا آلبیکنس در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به عصاره‌ی اندام برگ و ریشه بیشتر بود (۹).

پژوهش حقیقی در گناباد، اثر مهاری اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاهدانه بر روی برخی قارچ‌ها و میزان MIC و MFC عصاره‌ها را با روش رقیق‌سازی (براث ماکرودیلوسیون و براث میکرودیلوسیون) مورد بررسی قرار داد. بدین ترتیب، میانگین MIC90 اسانس سیاهدانه، ۱/۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و میانگین MFC، ۲/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عنوان گردید. همچنین، نتیجه‌گیری شد که اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاهدانه دارای عملکرد مهاری و قارچ‌کشی مناسبی علیه عوامل قارچی می‌باشند (۱۶).

گران و همکاران در پژوهش خود در کرج، به بررسی اثر اسانس و عصاره‌های گزنه و نعناءفلفلی در جلوگیری از رشد عوامل قارچی پرداختند. آن‌ها تأثیر اسانس و عصاره‌های آبی، اتانولی و اتانولی ۷۰ درصد را بر کاهش رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش اختلاط با محیط کشت مایع بررسی نمودند. بر اساس نتایج مطالعه‌ی آنان، به کارگیری اسانس نعناءفلفلی و گزنه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، به ترتیب ۷۹/۴۰ و ۵۳/۳۰ درصد کاهش در وزن خشک قارچ را به دنبال داشت. همچنین، عصاره‌ی گیاه نعناءفلفلی در کاهش رشد میسلیومی قارچ کارامدتر از عصاره‌ی گزنه بود (۱۷).

در تحقیقی که در عمان انجام شد، اثر ضد باکتری و ضد قارچی عصاره‌های متانولی دارچین، انار، چای ترش و روغن سیاهدانه بر روی دو باکتری گرم مثبت، دو باکتری گرم منفی و سه نوع قارچ به روش انتشار چاهک بررسی گردید. نتیجه این که عصاره‌های دارچین و روغن سیاهدانه در مقایسه با بقیه، فعالیت ضد قارچی بهتری از خود نشان دادند (۱۸).

علاوه بر موارد فوق، در سایر پژوهش‌ها نیز تأثیر عصاره‌ی دو گیاه سیاهدانه و گزنه بر روی عوامل قارچی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۰–۱۹). فروزان‌فر و همکاران در مطالعه‌ی خود در مشهد، به بررسی خواص درمانی گسترده‌ی سیاهدانه و همچنین، اثر عصاره‌ی اتر سیاهدانه بر روی هشت گونه درماتوفیت با روش آگار دیفیوژن پرداختند. بدین ترتیب، میزان MIC این عصاره، ۴۰–۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین گردید (۱۹).

تحقیقی در ترکیه نیز به بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌ی متانولی و کلروفرمی هشت گیاه از جمله گزنه بر روی گونه‌های کاندیدا شامل کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا با روش دیسک دیفیوژن پرداخت و عصاره‌ها به روش سوکسله تهیه گردید و مشخص شد که عصاره‌ی متانولی این گیاهان فعالیت ضد قارچی خوبی در برابر گونه‌های کاندیدا از خود نشان می‌دهند؛ در حالی که عصاره‌ی کلروفرم اثر ضد قارچی ندارد (۲۰).

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، با یافته‌های حاصل از سایر مطالعات در برخی موارد مغایر و در مواردی مشابه است.

اختلاف در نتایج گزارش شده می‌تواند به عوامل مختلفی بستگی داشته باشد. به عنوان مثال، به نظر می‌رسد روش عصاره‌گیری از جمله عواملی است که تأثیر بسزایی در تفاوت موجود بین نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های سایر پژوهش‌ها داشته باشد. این امکان وجود دارد که استفاده از روش‌های دیگر به جزء خیساندن و سوکسله که در بررسی حاضر استفاده شد، در جداسازی مواد مؤثره‌ای که دارای فعالیت ضد قارچی می‌باشند، کارایی متفاوتی داشته باشد. بنابراین، تأثیرات ضد قارچی عصاره‌های به دست آمده نیز می‌تواند متفاوت باشد.

از دیگر مواردی که ممکن است در اختلاف نتایج تأثیر بگذارد، می‌توان به نوع سوش قارچی استفاده شده در مطالعات مذکور و اختلافات ژنتیکی احتمالی آن‌ها با یکدیگر اشاره نمود. از آن‌جایی که سوش‌های مختلف ممکن است در سطح ژن اختلافاتی با یکدیگر داشته باشند یا این که دچار جهش‌های ژنتیکی شوند، این اختلافات

می‌تواند یکی از دلایل احتمالی در اختلاف نتایج باشد (۱۱).

علاوه بر این، شرایط محیط انجام آزمایش، مواد و ترکیبات مورد استفاده، رعایت یا عدم رعایت شرایط بهینه‌ی آزمایش و در نهایت، خطاهایی که در حین انجام کار توسط محقق رخ می‌دهد، می‌توانند در اختلاف نتایج مؤثر باشد. عواملی مانند ترکیبات خاک، شرایط آب و هوایی و جغرافیایی، شرایط کشت گیاه و روش آن، سن گیاه، اندام‌های گیاه، مرحله‌ی رویشی و زمان جمع‌آوری اجزای گیاه نیز می‌توانند در اختلاف نتایج گزارش شده در طرح‌های مختلف، تأثیرگذار باشند (۱۱).

آنچه که حایز اهمیت است، این که مقادیر MIC گزارش شده در پژوهش حاضر در مقایسه با دیگر مطالعات انجام شده در زمینه‌ی اثرات ضد قارچی عصاره‌های سیاهدانه و گزنه، راضی‌کننده بود. در این راستا، انجام تحقیقات بیشتر بر روی سایر گونه‌های بالینی کاندیدا و همچنین، سایر قارچ‌های جداشده از عفونت‌های بالینی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

هرچند اثر مهارکنندگی داروی آمفوتریسین B بر روی گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس نسبت به عصاره‌های سیاهدانه و گزنه بیشتر است، اما این دو عصاره به ویژه عصاره‌ی گزنه، اثرات رضایت‌بخشی بر روی گونه‌های کاندیدایی دارند. با اثبات اثربخشی این عصاره‌ها، می‌توان امیدوار بود که بتوان با استخراج ماده‌ی مؤثره‌ی آن‌ها و انجام تحقیقات بیشتر، به ترکیبات ضد قارچی با عوارض جانبی و هزینه‌ی کمتر دست یافت.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی پزشکی با شماره‌ی ۱۵۸۲-آ و طرح پژوهشی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد با شماره‌ی ۹۷۰۸۸۵ می‌باشد که با کد اخلاق IR.MUMS.Medical.Rec.1398.002 انجام گردید. بدین وسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و کارکنان بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی بیمارستان‌های امام رضا (ع) و قائم (عج) به جهت حمایت‌ها و همکاری در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References

1. Zarei MA, Madani M. The effect of ethanolic extract of Teucrium polium on Candida glabrata colonization in the liver, spleen and kidneys. J Sabzevar Univ Med Sci2018; 25(1): 151-60. [In Persian].
2. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences; 2003.
3. Zaini F, Seyed Ali Mehbod A, Emami M. Comprehensive medical mycolog. 3rd ed. Tehran, Iran: Tehran University Press; 2009. [In Persian].
4. Yang YL, Li SY, Cheng HH, Lo HJ. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of Candida species from 1999 to 2002 in Taiwan. BMC Infect Dis 2005; 5: 99.
5. Sadeghzade Rika P, Ebrahimi K. The Inhibitory effect of the ethanol and methanol extracts of leaf and stem of the rumex alveolatus against the Candida albicans and Rhizopus oryzae. Med J Tabriz Univ Med Sci 2016; 38(3): 72-7. [In Persian].
6. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(5): 337-52.
7. Firouzbakhsh F, Zolfaghari A, Mehrabi Z, Khalesi MK. Invitro antifungal activity of Nettle (Urtica dioica) and Basil (Ocimum basilicum) extracts on Saprolegnia parasitica. Journal of Animal Environment 2015; 7(3): 211-6. [In Persian].
8. Ghaedi M, Naghiha R, Jannesar R, dehghanian N, Mirtamizdoust B, Pezeshkpour V. Antibacterial and antifungal activity of flower extracts of Urtica dioica, Chamaemelum nobile and Salvia officinalis: Effects of $Zn[OH]^2$ nanoparticles and Hp-2-minh on their property. J Ind Eng Chem 2015; 32: 353-9.
9. Moradi P, Amini K. Extraction and Identification of Urtica dioica L Extract and Its Antibacterial and Antifungal Properties. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(151): 74-85.
10. Ziaee T, Moharreri N, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological and toxicological effects of Nigella sativa and its active constituents. J Med Plants 2012; 11(42): 16-42. [In Persian].
11. Arji P, Naseri A, Rakhshandeh H, Najafzadeh M J. Investigation of antifungal activity of methanol and aqueous extracts of walnut (Juglans regia) leaves and peel against candida species. J Birjand Univ Med Sci 2015; 22(2):115-124. [In Persian].
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
13. Akbari F, Naseri A, Fata A, Najafzadeh MJ, Jarahi L, Parian M. The drug susceptibility of aspergillus species isolated from the patients with onychomycosis to itraconazole, voriconazole, and amphotericin B. J Isfahan Med Sch 2020; 38(577): 367-75. . [In Persian].
14. Naseri A, Fata A, Shamsian SAAS. In vitro anti-candidal effects of aqueous and methanolic extracts of walnut (juglansregia) tree fruit peel in comparision with fluconazole. Int J Med Res Health Sci. 2016, 5(6):72-76.
15. Moghim H, Taghipoor S, Shahinfard N, Kheiri S, Panahi R. Antifungal effects of Zataria multiflora and Nigella sativa extracts against Candida albicans. J Herbmed Pharmacol 2015; 4(4): 138-41.
16. Haghighi MHM. Inhibition and destruction effects of

Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioides and Nigella sativa essences on aspergillus cells. J Babol Univ Med Sci 2013; 15(6): 25-35. [In Persian].
17. Gorran A, Salehnia B, Alizadeh HR, Mirzaei A, Farzaneh M. Inhibitory effects of essential oils and extracts of nettle (urtica dioica l.) and mentha piperita on growth and aflatoxin B1 production by Aspergillus flavus. Journal of Agricultural Engineering Research 2015; 16(3): 67-78. [In Persian].
18. Abdullah TA, Khaled AA-K. Antibacterial and antifungal effect of some natural extracts and their potential use as photosensitizers. ESJ 2016; 12(6): 147.
19. Forouzanfar F, Bazzaz BS, Hosseinzadeh H. Black cumin (Nigella sativa) and its constituent (thymoquinone): A review on antimicrobial effects. Iran J Basic Med Sci 2014; 17(12): 929-38.
20. Yiğit D, Yiğit N, Ozgen U. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. Mycoses 2009; 52(2): 135-40.

DOI: 10.22122/jims.v39i618.13860 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Vol. 39, No. 618, 2nd Week, June 2021

Received: 25.01.2021 Accepted: 28.04.2021 Published: 12.06.2021

The Antifungal Effects of Hydroalcoholic Extracts of Nigella Sativa and Urtica Dioica on Fungal Agents in Comparison with Amphotericin B

Azar Pournajafian[1], Ali Naseri[2], Abdolmajid Fata[3], Hasan Rakhshandeh[4], Monavar Afzal-Aghaee[5]

Original Article

Abstract

Background: The emergence of resistant fungal species, as well as relatively high side effects of antifungal drugs, have prompted researchers to develop new methods forcing action against fungi. The aim of present study was to evaluate the antifungal effects of hydroalcoholic extracts of Nigella sativa and Urtica dioica on Candida species isolated from clinical specimens in comparison with amphotericin B.

Methods: In the current study, antifungal effect of hydroalcoholic extracts of Nigella sativa and Urtica dioica, which were prepared by soaking and soxhlet methods, against 11 Candida isolates (Candida albicans and Candida parapsilosis), were measured using broth microdilution method. Candida isolates were exposed to different concentrations of the extracts, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of each extract was determined.

Findings: Both hydroalcoholic extracts of Nigella sativa and Urtica dioica showed antifungal effects against candida isolates. The MIC90 values of soaked and sox let hydroalcoholic extracts of Nigella sativa for Candida albicans and Candida parapsilosis were 25 and 12.5 mg/ml, respectively. Moreover, MIC90 values of soaked and sox let hydroalcoholic extracts of Urtica dioica for the candida species in both methods were 12.5 mg/ml. In addition, MIC90 values of amphotericin B against Candida albicans and Candida parapsilosis were obtained 1.0 and 0.5 µg/ml, respectively.

Conclusion: Although amphotericin B as an effective drug has a better antifungal effect against candida species, hydroalcoholic extracts of Nigella sativa and Urtica dioica also have acceptable antifungal effects on Candida albicans and Candida parapsilosis. Among them, Urtica dioica extract has a better effect than Nigella sativa extract.

Keywords: Nigella sativa; Urtica dioica; Candida albicans; Candida parapsilosis

Citation: Pournajafian A, Naseri A, Fata A, Rakhshandeh H, Afzal-Aghaee M. **The Antifungal Effects of Hydroalcoholic Extracts of Nigella Sativa and Urtica Dioica on Fungal Agents in Comparison with Amphotericin B.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(618): 198-205.

1- MSc Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2- Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Professor, Cutaneous Leishmaniasis Research Center AND Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

5- Associate Professor, Department of Epidemiology, Faculty of Health, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Ali Naseri, Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; Email: naseria@mums.ac.ir