فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۷، جلد ۱۲، شماره ۴، پائیز ۹۸، صفحه۹۵ تا ۱۰۵
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی تاثیر عصاره های هیدرو الکلی برگ های پنیرک، آویشن، گل بنفشه و کاج در روند التیام زخم آلوده به کاندیدا گلابراتا و زخم حاصل از سوختگی درجه دو در موش صحرایی

سیده مریم موسوی نژاد، **شهرزاد نصیری سمنانی**، رسول شکری، رضا شاپوری
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه – مهندسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.Sh.nasiri92@ yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۸/۷/۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از داروهای گیاهی کم عارضه در درمان زخم ها، از درمان سنتی در ترمیم زخم ها و سوختگی های پوستی بسیار رایج است. لذا هدف از این پژوهش بررسی تاثیر عصاره‌های هیدرو الکلی برگ های پنیرک، آویشن، گل بنفشه و کاج در روند التیام زخم آلوده به کاندیدا گلابراتا بر ترمیم زخم سوختگی درجه دو در موش بالغ می باشد.

روش کار: در این تحقیق از ٤٢ راس موش صحرایی هم سن، نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰–۲۵۰ گرم استفاده شد. پس از تعیین MIC و MLC و ایجاد سوختگی درجه ۲، هر گروه از موش ها به ٤ دسته شش تایی تقسیم و در هر گروه درمان با اوسرین، کلوتریمازول، عصاره و بدون تیمار با اوسرین ۵درصد(گروه شاهد)، به مدت ٢٤ روز در دو نوبت در شبانه روز(۸ صبح و ۸ شب) انجام گردید.

یافته ها: نتایج بررسی های MIC و MLC مشخص نمودکه عصاره برگ کاج و پنیرک به ترتیب دارای بیشترین و کم‌ترین خاصیت قارچ کشی قوی هستند. تاثیر عصاره گیاه بر عفونت کاندیدا گلابراتا در زخم مدل های موشی، نمونه جدا شده از موش های تیمار شده با عصاره و داروی کلوتریمازول کم‌تر بر روی محیط کشت MHA رشد کردند.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که مصرف موضعی عصاره سبب تسریع بهبود زخم و سوختگی در موش صحرائی آزمایشگاهی در مدت زمان بسیار کوتاه تری می شود.

واژه های کلیدی: عصاره هیدروالکلی برگ پنیرک آویشن کاج و گل بنفشه، زخم، سوختگی درجه دو، موش صحرایی.

مقدمه

سوختگی ضایعه ای است که در نتیجه تماس مستقیم یا قرار گرفتن در معرض منابع حرارتی، شیمیایی، الکتریکی یا تابشی ایجاد می شود و موقعی پدید می آید که انرژی از یک منبع حرارتی به بافت های بدن منتقل می گردد(۱). سوختگی از بسیاری جهات جزئ بدترین رویدادهایی است که ممکن است فرد تجربه نماید. سوختگی های وسیع صدمات جسمی و روانی قابل توجهی ایجاد می کنند و خسارات مالی فراوانی بر جای می گذارند و موجب رنج و ناراحتی خانواده می شود(۲). از نظر فراوانی در هر کشور یکی از مشکلات عمده بهداشتی است. علیرغم سوختگی قابل پیشگیری بودن، سالیانه موجب مرگ و میر، ناتوانی، کاهش فعالیت های اجتماعی و یا انزوای مطلق افراد زیادی می شود. عفونت-های موضعی و سیستمیک شایع ترین عوارض سوختگی هستند که علت اصلی مرگ و میر، به خصوص در سوختگی های بالای ۲۵ درصد می باشند. عفونت سوختگی همواره یکی از مشکلات عمده بهداشتی و درمانی بوده که با افزایش مدت اقامت بیمار در بیمارستان موجب افزایش مرگ و میر می شود(۳). سوختگی درجه دو علاوه بر اپیدرم، درم را نیز درگیر کرده است و با

تجمع مایع میان اپیدرم و درم تاول هایی تشکیل می دهد. در صورت عفونت این نوع سوختگی ها، تمام ضخامت پوست از بین می رود و پیوند پوست ضروری می-باشد(۳۳، ۱۵). مصرف مکرر داروهای آنتی بیوتیک موضعی استاندارد مانند نیترات نقره به علت نقره احیاء شده منجر به تغییر رنگ دائمی در پوست پس از بهبودی سوختگی درجه دو می شود و مصرف سیلورسولفادیازین جهت مراقبت از زخم ها باعث کاهش تعداد پلاکت ها و نوتروفیل ها می گردد. لذا امروزه به علت آثار شناخته شده جانبی و ناخواسته بسیاری از داروهای سنتتیک، استفاده از مواد گیاهی و طبیعی در درمان مورد توجه قرار دارد. بیشتر از ۸۰ درصد مردم دنیا برای درمان بیماری-های پوستی به پزشکی سنتی وابسته اند(۲۴). جالب توجه است که یک سوم همه داروهای پزشکی سنتی مربوط به بیماری های پوستی می باشد. از جمله مشکلاتی که زخم های ایجاد شده در روی پوست برای فرد به همراه دارند، آلوده شدن زخم ها به یک سری از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، *E.Coli* و عفونت با قارچ کاندیدا آلبیکنس است(۲۱). بیماری کاندیدیازیس بی-شک یکی از مهم ترین و شایع ترین بیماری های قارچی فرصت طلب در انسان است. جنس کاندیدا شامل ۱۵۰ گونه می باشد(۲۳) و عفونت ناشی از آن‌ها به صورت حاد، تحت حاد یا مزمن در پوست، ناخن، مخاط واژن، برونش ریه و دستگاه گوارش دیده می شود. گاهی نیز عفونت منتشر شده و کلیه، ریه، کبد و قلب را گرفتار می‌سازد. واکنش میزبان در برابر بیماری از خارش و التهاب مختصر تا فرم مزمن حاد چرکی یا گرانولوماتوز متغیر است(۲). عواملی نظیرآسیب سطوح مخاطی(به علت شیمی درمانی)، جراحی نوتروپنی، استفاده از آنتی بیوتیک های با طیف وسیع، ایدز، اختلالات نئوپلاستی و شکندگی پوست، خطر ابتلا به عفونت کاندیدایی را افزایش می دهند(۲۹، ۴). این قارچ از عوامل شایع عفونت های بیمارستانی و در بیماران مستعد رتبه چهارم را دارد(۱۳). کاندیدا گلابراتا *Candida glabrata* یکی از شایع ترین گونه های جنس کاندیدا است که به دلیل کسب مقاومت دارویی شناسایی سریع آن در درمان عفونت ها ضروری به نظر می رسد(۲۸). داروی آمفوتریسین B که در درمان کاندیدیاز سیستمی استفاده می شود، بسیار سمی است(۱۱) و با وجود این‌که داروهای ضد قارچی جدیدی شناخته شده می باشد ولی مرگ ناشی از کاندیدیاز هم‌چنان بالا است(۳۰).

- کلوتدیمازول قابل دسترس ترین و پر استفاده-ترین دارو برای درمان عفونت کاندیدایی است(۳۲). باعث افزایش مقاومت دارویی نسبت به این داروها و به دنبال آن افزایش عوارض جانبی داروها شده است(۵). روغن کاج(*Pinus eldarice*) بر روی بسیاری از قارچ‌ها مانند کاندیدا آلبیکنس و بر روی بسیاری از ویروس ها مانند هرپس سیمپلکس تایپ ۲ و ویروس آنفولانزا و برروی برخی از باکتری ها مانند استافیلوکوکوس اورئوس، سراشیا، سالمونلا، شیگلا، استرپتوکوکوس پایوژنز اثر کشندگی دارد(۱۲). به دلیل داشتن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی پنیرک(*Malva sylvestri*) خواص آنتی رادیکالی بوده و قادر به مهار اکسیداسیون می باشد و ترکیبات فلاونوئیدی سبب قدرت بالای مهارکنندگی رادیکال DPPH را داراست(۲۲). خواص دارویی گل بنفشه(*Viola odorata*) مربوط به پروتئین های چند حلقه ای دارای حدود ۳۰ اسید آمینه می باشد(۷). ترکیبات سیتوتوکسیک نظیر(Cycloviolacin02, Varva,Varvf) در این گیاه شناسایی شده که خواص ضد سرطانی دارد(۲۰). هم‌چنین می توان به ترکیبات فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای، آلکالوئیدها، استروئید، ساپونین و تانن در این گیاه اشاره کرد(۱۶). اسانس آویشن(*Thymus vulgaris*) از جمله ده اسانس معروف

است که دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی، آنتی اکسیدان نگهدارنده طبیعی غذا و تأخیر دهنده پیری پستانداران می باشد و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد(۲۶، ۱۷). تیمول و کارواکرول ار اجزای اصلی اسانس های خانواده نعناعیان هستند. این دو ترکیب از نظر شیمیایی بسیار به هم شبیه هستند و فقط جایگاه گروه هیدروکسیل در آن‌ها متفاوت است. تیمول و کارواکرول از اجزای ضدمیکروبی بسیار موثر در اسانس‌ها هستند. اثر ضد میکروبی آن‌ها به دلیل نفوذپذیر نمودن غشای سلول توسط آن‌ها است که می توانند به کاتیون‌های سطح غشا کلاته شده و فعالیت های حیاتی را مختل کنند(۱۷). هدف از این مطالعه و تحقیق، بررسی اثر عصاره های هیدروالکلی برگ گیاهان کاج، گل بنفشه، پنیرک و آویشن بر روی کاندیدا گلابرتا است که درمواقع مثبت بودن و آزمایش های مورد نیاز و تأییدی می توان از گیاهان ذکر شده به جای آنتی بیوتیک ها مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در دو مرحله انجام گردید. جامعه مورد مطالعه در مرحله اول شامل مخمر کاندیدا گلابراتا کشت شده بر روی محیط های کشت اختصاصی و در مرحله دوم شامل موش های آزمایشگاهی آلوده شده با این کاندیدا بود

تهیه سویه میکروب

مخمر کاندیدا گلابراتا از سایت علمی، صنعتی و پژوهشی ایران به صورت لیوفلیزه خریداری شد. پودر مخمر با افزودن ۱ میلی لیتر محیط کشت MHB(مولر هینتون براث) در لوله های حاوی محیط کشت MHB منتقل و به مدت ۳ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از ۳ روز، رشد مخمرها را از لحاظ ایجاد کدورت بررسی و به پلیت های حاوی محیط کشت MHA(مولر هینتون آگار) منتقل و به صورت خطی کشت داده شد.

حیوانات آزمایشگاهی

موش ها پس از تهیه از دانشکده علوم پزشکی زنجان به اتاق حیوانات مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان منتقل و به منظور سازگاری با شرایط جدید آزمایشگاهی به مدت ۴-۲ روز نگه‌داری شدند. در طی مطالعه، موش ها با آب و غذای استاندارد و کافی، تغذیه و در شرایط متعارف آزمایشگاهی شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲±۲۴ سانتی گراد و رطوبت حدود ۵۲ درصد نگهداری شدند(۲۶). دراین مطالعه از ۸۵ موش سوری ماده بالغ ۸-۶ هفته‌ای با وزن تقریبی ۵±۲۵ گرم که باردار و شیرده نبودند استفاده شد.موش ها در ۴ گروه ۲۰ تایی و یک گروه ۵ تایی(جهت تعیین عمق سوختگی در روز اول کشته شد) به صورت تصادفی تقسیم بندی و در موش-های هر کدام از گروه ها زخم سوختگی به روش مشابهی انجام شد. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید.

تهیه عصاره

در این پژوهش پس از جمع آوری و شناسایی و خشک نمودن گیاهان مورد نظر(کاج، گل بنفشه، آویشن و پنیرک)، ابتدا گیاهان را خشک و پودر نموده و به روش سوکسوله عصاره های هیدرو الکلی آن تهیه گردید(۲۵، ۱۹، ۱۶، ۱۵).

تعیین حداقل غلظت مهار کننده از رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی از رشد(MLC) عصاره ها

برای هر کدام از عصاره های گیاهان ۱۱ لوله به صورت جداگانه قرار داده شد. سوسپانسیون قارچ با غلظت نهایی $۱/۵\times۱۰^{۵}$ CFU/ml) (نیم مک فارلند) تهیه و به لوله ها همراه با محیط مولر هینتون براث اضافه و بعد از رقت سازی عصاره ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گذاشته گردید. بعد از زمان مقرر از هر لوله روی محیط

کشت نوترینت آگار کشت داده و بعد از گرما گذاری در دمای ۲۷ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت، کم-ترین غلظتی از عصاره ها که قارچ در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی مورد مطالعه قرار گرفت(۳۱).

بررسی اثر ضد میکروبی و التیام بخشی عفونت ناشی ازسوختگی کاندیدا در مدل حیوانی

تضعیف سیستم ایمنی و القای عفونت

جهت ایجاد عفونت کاندیدیایی، ابتدا باید سیستم ایمنی موش ها تضعیف گردد. برای این منظور از تزریق داخل صفاقی داروی سیکلوفسفامید استفاده شد به این صورت که به موش ها در ۴ روز اول، مقدار ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در روز پنجم به مقدار ۱۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم تزریق گردید. پس از توزین، حیوانات با استفاده از تیوپنتال ۴۰ میلی گرم بر کیلو گرم به روش داخل صفاقی بیهوش و جهت ایجاد سوختگی درجه ۲ سانتی گراد، ابتدا موهای ناحیه پشت گردن موش ها کاملاً تراشیده، سپس به وسیله سکه گداخته شده توسط حرارت به مدت ۳-۴ ثانیه در محل تراشیدگی(به قطر ۱ سانتی متر) قرار داده شد. حیوانات پس از به هوش آمدن در قفسه های انفرادی کاملاً تمیز و ضد عفونی شده نگهداری شدند(۳۱). روز بعد از سوختگی با استفاده از سوآپ، با مخمر کاندیدا گلابراتا محل سوختگی آلوده شد. بعد از ۳ تا ۵ روز محل سوختگی را از لحاظ تشکیل عفونت کاندیدیایی، زخم های زرد رنگ همراه با ترشحات چرکی مورد بررسی قرار گرفت. از روز صفر(روز ایجاد سوختگی) هر کدام از گروه های مورد مطالعه مورد مداخله قرار گرفتند. برای تهیه پماد حاوی عصاره جهت تیمار موش ها، مقدارعصاره‌های گیاهی برابر با غلظت MLC آن‌ها در هر گرم از پماد یوسرین اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت استراحت دادن به حیوانات، محل سوختگی با تلقیح سوسپانسیون قارچ برابر با کدورت ۰/۵ مک فارلند عفونی سازی و از روز بعد درمان برای گروه ها برای گروه های مربوطه به مدت ۵ روز(روزی ۲مرتبه و هر بار برابر ۰/۵ گرم از پماد) شروع شد(۲۵). سطح زخم در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از ایجاد زخم اندازه گیری سطح زخم مشخص گردید. با استفاده از فرمول زیر درصد زخم و درصد بهبودی ارزیابی شد.

درصد زخم=۱۰۰× سطح زخم در روز اول/سطح زخم در روز مورد نظر

در روز چهارم بعد از شروع درمان تا بیست و یکم، جهت شمارش تعداد قارچ مورد نظر در زخم، با استفاده از سوآپ استریل از روی زخم نمونه برداری انجام گرفت و سوآپ ها در داخل لوله های حاوی ۵ میلی لیتر تریپتی کیس سوی براث به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سیلیسیوس نگهداری شدند. سپس از هر لوله روی پلیت حاوی محیط برد پارکر کشت و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سیلیسیوس قرار داده شد و تعداد کلنی های رشد یافته بر روی محیط مورد بررسی و شمارش قرار گرفت(۲۵).

آزمون آماری

نتایج حاصل از کشت قارچ در حیوانات آلوده گزارش و بررسی اختلاف معنی دار بین نتایج گروه‌های حیوانی با آزمون LSD و ANOVA One way در سطح معنی دار $P<0/05$ انجام گرفت.

نتایج

نتایج تعیین حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهار رشد برای عصاره های تهیه شده

بر اساس نتایج حاصله از بررسی های MIC و MLC عصاره های هیدروالکلی برگ کاج، گل بنفشه، آویشن و پنیرک بر کاندیدا گلابراتا مشخص شدکه عصاره برگ کاج و پنیرک به ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین خاصیت قارچ کشی قوی هستند. نتایج نشان داد که عصاره گیاهان آویشن، پنیرک، کاج و بنفشه به ترتیب

در غلظت های ۱۰/۸۷، ۲۱/۶۶، ۱/۵۶ و ۱۳/۱۷ میکرو گرم بر میلی لیتر باعث مرگ مخمر کاندیدا گلابراتا می‌گردد(جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- نتایج بررسی رشد کاندیدا گلابراتا در مجاورت غلظت های مختلف عصاره گیاهان کاج تهرانی، آویشن، گل بنفشه و پنیرک. چاهک های ۷ و ۸، چاهک های کنترل(فاقد عصاره) هستند. غلظت عصاره گیاهان بر حسب میکروگرم در میلی لیتر است.

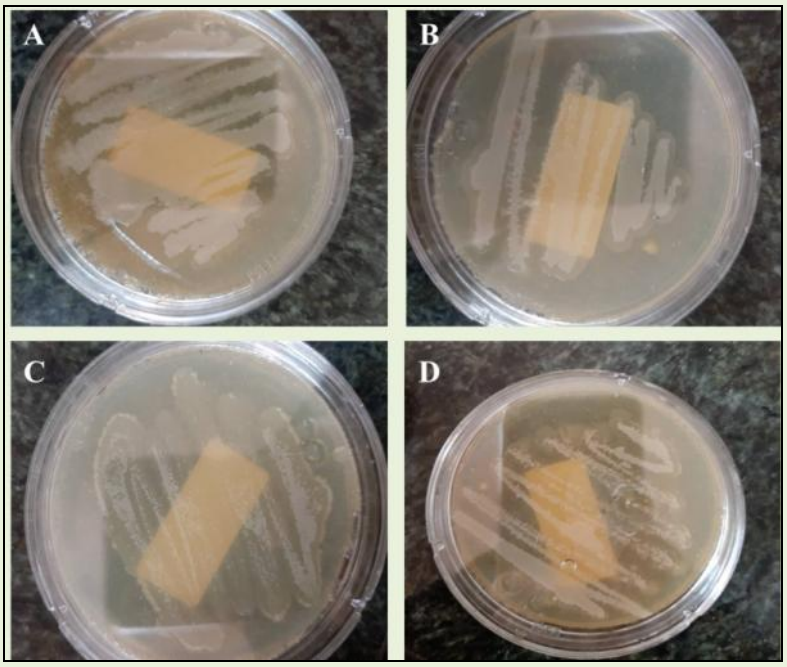
		چاهک ۸	چاهک ۷	رقت ٦	رقت ٥	رقت ٤	رقت ۳	رقت ۲	رقت ۱
	عصاره	کنترل	کنترل	۳۱/۲۵	٦۲/٥	۱۲٥	۲٥۰	٥۰۰	۱۰۰۰
آویشن	غلظت عصاره	–	–	۰/٦۸	۱/۳٥	۲/۷۱	٥/۴۳	۱۰/۸۷	۲۱/۷٥
	کدورت	+	+	+	+	+	–	–	–
پنیرک	غلظت عصاره	–	–	۰/٦۷	۱/۳۰	۲/۷۱	٥/۴۱	۱۰/۸۳	۲۱/٦٦
	کدورت	+	+	+	+	+	+	–	–
کاج	غلظت عصاره	–	–	۰/۳۹	۰/۷۸	۱/٥٦	۳/۱۲	٦/۲٥	۱۲/٥
	کدورت	+	+	+	–	–	–	–	–
بنفشه	غلظت عصاره	–	–	۰/۸۲	۱/٦۴	۳/۲۹	٦/٥۸	۱۳/۱۷	۲٦/۳۳
	کدورت	+	+	+	+	+	–	–	–

جدول ۲-MIC و MLC عصاره گیاهان آویشن، پنیرک، کاج و بنفشه بر روی کاندیدا گالبراتا

عصاره	MIC (µg/ml)	MLC (µg/ml)
آویشن	٥/٤۳	۱۰/۸۷
پنیرک	۱۰/۸۳	۲۱/٦٦
بنفشه	٦/٥۸	۱۳/۱۷
کاج	۰/۷۸	۱/٥٦

تاثیر تیمار باعصاره گیاه بر روی کاندیدا گلابراتا در مدل های موشی

در ابتدای مطالعه میانگین مساحت زخم های ایجاد شده در گروه های یوسرین، کلوتریمازول، عصاره، بدون تیمار یکسان بود. ولی در روزهای ۷ به بعد تفاوت معنی داری در تیمارهای مختلف مشاهده شده است. تیمار مقایسه کلی نشان داد که بررسی تاثیر عصاره گیاه بر عفونت کاندیدا گلابراتا در زخم مدل های موشی نشان داد که از بین گروه‌های تیمار، کلونی های کاندیدیایی حاصل از نمونه جدا شده از موش های تیمار شده با عصاره و داروی کلوتریمازول کم‌تر بر روی محیط کشت MHA رشد کردند در حالی که رشد این کلونی‌ها از نمونه های موش‌های تیمار شده با یوسرین و موش‌های تیمار نشده، بیشتر بود(جدول ۳ و شکل ۱). در طول زمان انجام پروسه تیمار مدل های موشی با عصاره گیاهان و کلوتریمازول، برخی از موش ها مردند(جدول ۴).



شکل ۱-نتایج رشد کاندیدا گلابراتا جدا شده از محل زخم مدل های موشی بیماری.

نتایج کشت نمونه های جدا شده از موش‌های گروه‌های مورد مطالعه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار نشان داد که از بین ۴ گروه، کلونی های کم-تری از کاندیدا بر روی محیط کشت رشد کردند که نمونه آن‌ها از موش‌های تیمار شده با داروی کلوتریمازول(C)، عصاره گیاه(D) جدا شده بود. A: نمونه جدا شده از موش تیمار نشده، B: نمونه جدا شده از موش تیمار شده با یوسرین.

جدول۳- اثر تیمار های مختلف بر میانگین و انحراف معیار بر قطر زخم ترمیم نشده و تعداد کلنی های رشد یافته بر روی زخم ناشی سوختگی در مدل حیوانی

گروه	روز مطالعه	مساحت برحسب میلی متر مربع	درصد بهبودی
درمان با پماد حاوی عصاره ها	۰	۶۷/۰۵±۱۰/۹۱	۰
	۷	۵۹/۵۷±۱۵/۸۳	۳۰/۳۴±۴/۱۵
	۱۴	۳۰/۵۶±۴/۱۲	۴۷/۶۴±۹/۳۶
	۲۱	۴/۵۲±۱/۷۴	۸۹/۲۴±۵/۲۶
درمان با پماد حاوی کلوتریمازول	۰	۶۷/۰۵±۱۰/۹۱	۰
	۷	۵۸/۴۲±۱۱/۳۲	۱۵/۱۳±۶/۱۳
	۱۴	۲۸/۳۴±۵/۹۳	
	۲۱	۲/۹۷±۲/۰۸	
کنترل و بدون درمان	۰	۶۷/۰۵±۱۰/۹۱	۰
	۷		
	۱۴		
	۲۱		
درمان با یوسرین	۰	۶۷/۰۵±۱۰/۹۱	۰
	۷		
	۱۴		
	۲۱		

جدول٤- اثر تیمار های مختلف بر میانگین تعداد کلنی های رشد یافته بر روی زخم ناشی سوختگی در مدل حیوانی

ردیف	نام گروه	میانگین
گروه اول	درمان با پماد حاوی عصاره ها	۱۶۶/۵×۱۰^{۳}
گروه دوم	درمان با پماد حاوی کلوتریمازول	۱۱۲×۱۰^{۳}
گروه سوم	کنترل و بدون درمان	۲۶۱× ۱۰^{۴}
گروه چهارم	درمان با یوسرین	۱۹۹× ۱۰^{۴}

نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه های سوم(کنترل و بدون درمان) می باشد($p <$ ۰/۰۵).

جدول ٥-درصد ماندگاری موش ها در تیمار های مختلف پس از اتمام پژوهش

هر گروه دارای ۶ موش با ۳ تکرار می باشد

گروه موشی	بدون تیمار	تیمار باعصاره گیاهی	تیمار با کلوتریمازول	تیمار با یوسرین
	٪۵۰	٪۷۵	٪۵۰	٪۲۵

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اثرات ضد کاندیدایی عصاره گیاهان کاج، گل بنفشه، پنیرک و آویشن بر روی کاندیدا گلابراتا در شرایط آزمایشگاهی و در مدل‌های موشی عفونت این کاندیدا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره هر چهار گیاه پنیرک، آویشن، کاج و بنفشه باعث مهار رشد و مرگ مخمر کاندیدا گلابراتا در شرایط آزمایشگاهی می گردد. کم‌ترین و بیش‌ترین شاخص حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC) از بین عصاره این چهار گیاه به ترتیب مربوط به گیاهان کاج و پنیرک بود. هم‌چنین کم‌ترین و بیش‌ترین شاخص حداقل غلظت کشندگی(MLC) نیز مربوط به عصاره این دو گیاه به ترتیب برابر ۱/۵۶ و ۲۱/۶۶ میکروگرم در میلی لیتر بود. نتایج آزمایشات انجام شده بر روی مدل حیوانی نیز حاکی از اثرات ضد کاندیدیایی عصاره این گیاهان داشت. کم‌تر مطالعه ایی در زمینه بررسی اثرات ضد قارچی گیاهان آویشن، پنیرک، کاج تهرانی و گل بنفشه بر روی کاندیدا گلابراتا انجام شده است. با این وجود تاثیرات ضد قارچی گیاهان دیگر بر روی این کاندیدا بررسی شده که به دلیل تفاوت در نوع گیاه، نتایج آن‌ها به صورت دقیق قابل مقایسه با نتایج مطالعه حاضر نیست. Taheri و همکاران در سال ۲۰۱۸(۳۱) با بررسی اثر ضد قارچی عصاره های آبی و الکلی گیاه بادرنجبویه را روی کاندیدا گلابراتا نشان دادند که هر دو نوع عصاره این گیاه دارای خواص ضد قارچی می باشد. هرچند که بین این دو نوع عصاره بادرنجبویه از لحاظ اثرات تفاوت معناداری وجود نداشت. طبق نتایج این مطالعه ، عصاره گیاهان آویشن، پنیرک، کاج تهرانی و بنفشه نیز دارای خواص ضد کاندیدا گلابراتا هستند. و از بین آن ها، گیاه کاج بیشتر از سه گیاه دیگر این خواص را دارا می باشد. میرآبادی و همکاران در سال ۲۰۱۷(۳) MIC و MLC اسانس روغنی گیاه سیر کاندیدا گلابراتا را به ترتیب برابر ۰/۶ و ۰/۸ میکروگرم در میلی لیتر گزارش کردند. در مطالعه حاضر نیز این شاخص ها برای عصاره درخت کاج به ترتیب برابر با ۰/۷۸ و ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر برآورد گردید. همان طور که مشاهده می شود تفاوت چندانی بین نتایج این دو مطالعه از این نظر وجود ندارد. Nabipour و Dousti در سال ۲۰۱۸(۱۰) اثرات ضدقارچی عصاره های مختلف گیاه Onosma Chlorotricum بر قارچ‌های کاندیدا گلابراتا بررسی کرده و مقدار MIC عصاره N-هگزانی این گیاه را برابر با ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و MLC را برابر ۶۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر گزارش دادند. در حالی که بیشترین MIC و MLC چهار گیاه مورد بررسی در مطالعه حاضر، مربوط به گیاه پنیرک بود که به ترتیب برابر با ۱۰/۸۳ و ۲۱/۶۶ میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه

شد. بنابراین به نظر می رسد که عصاره چهار گیاه آویشن، پنیرک، کاج و بنفشه نسبت به عصاره گیاه مرزن جوش اثرات بهتری در برابر کاندیدا گلابراتا دارد. تحقیق سپیده اکبری در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار نشان داد که عصاره تام متانولی آویشن توانایی مهار رشد استرین های مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس را نیز دارا می باشد. با این حال عصاره تام متانولی آویشن نیز در مقادیر MIC و MFC بسیار بالاتر در مقایسه با استرین‌های حساس به فلوکونازول موجب مهار رشد استرین های مقاوم به فلوکونازول گردید(۱). این نتایج نشان می دهد که بین مقاومت کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول و مقاومت آن نسبت به اثرات ضد قارچی گیاه آویشن ارتباط مستقیمی برقرار است این احتمال وجود دارد که این گیاه با مکانیسمی مشابه داروی فلوکونازول منجر به مهار رشد کاندیدا آلبیکنس می شود و نهایتاً این گیاه به عنوان یک ترکیب ضدقارچی می تواند مورد استفاده کاربردی قرار گیرد(۱). تحقیق دیگری توسط خان و همکاران روی ۱۲۴ عصاره گیاهی که در آفریقای غربی برای درمان بکار می‌رفته انجام شده است که ۳۹٪ از این گیاهان مانع رشد قارچ‌های تریکوفایتون منتاگروفیتیس و کاندیدا آلبیکنس شده اند و از بین آن ها گیاهان *Harrisonia abyssinia* و *Solanum inconum* دارای بیشترین اثر ضد قارچی بوده‌اند(۲۷). در اردن فعالیت ضد کاندیدایی عصاره متانولی ۱۹ گیاه اردن در برابر کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزه ای بررسی شد. بیشتر عصاره-های متانولی گیاهان اثر ضد کاندیدایی نشان دادند(۸). در بررسی انجام شده روی گیاه پنیرک مشخص شد که این گیاه باعث افزایش تعداد مونوسیت ها در موش آلوده به کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با گروه شاهد میشود به این ترتیب ایمنی در حیوان ایجاد می کند(۱۴). تحقیقات حشمتی و همکاران، ندیمی و همکاران، بهزادی و همکاران، اربابی و همکاران آثار ضد کاندیدایی بسیاری گیاهان از جمله پنیرک، سماق، توکریم پولیوم و آویشن علیه کاندیداها را نشان داد.کارامان تاثیر مهاری اسانس به دست آمده از بخش هوایی آویشن بر رشد کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالس و ساکاروهایسز سرویزیه را تایید نمود(۱۸). *Onosma chlorotricum* اثرات مهاری بهتری در برابر کاندیدا گلابراتا دارد.

منابع

۱–اکبری، سپیده. ۱۳۸۵. بررسی اثرات ضد قارچی عصاره-های گیاهی آویشن(*Thymus vulgaris L.*) و مرزنجوش (*Origanum vulgare L.*) علیه ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس مقاوم و حساس به فلوکونازول، فصلنامه گیاهان دارویی، صص ۵۳–۶۲.

۲–زارعی، م.، مدنی، ا. ۱۳۹۷. تاثیر عصاره اتانولی گیاه توکریوم پولیوم بر کلونیزاسیون کاندیدا گلابراتا در کبد و طحال و کلیه ها. مجله علمی–پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ۲۵(۱): ۱۵۱–۱۶۵.

۳–میرآبادی، آ.، قمی، د. ۱۳۹۷. ارزیابی اثرات ضد قارچی اسانس روغنی گیاه سیر (*Allium sstadium*) بر کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه بیولوژی کاربردی، ۷(۲۸) ۱۱–۱۹.

4.Bineshian, F.(2015). Identification of Candida species using MP65 gene and evaluation of the Candida albicans MP65 gene expression in BALB/C Mice. Jundishapur journal of microbiology, 8(5);134-141.

5.Bergner P. (2001).Treatment garlic. London, UK: Thorsons; 2001.36-45.

6.Choi.J,Kim.W., P. J.y.,Chrong.H.S. (2016). The beneficial effects of *Pinus densiflora* needls on skin health. Biotechnol.Lett, 44(2); 208-217.

7.Craik, D.J. (1999). Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. Journal of molecular biology, 294(5);1336-1327.

8.Darwish, RM., Aburgia, TA. (2011). Antimicrobial activity of some medicinal plants against different candida species. Jordan Journal of Pharmaceutical Science. 1; 70-80.
9.Dauqan, E.MA., Thamer, F.h., Naji, Kh. M., Alshaibi, Y. (2017). Different extraction methods and antioxidant properties of thyme(*Thymus vulganis* L.) herb. International journal of chemical Science, 1(2);110-116.
10. Dousti, B. (2018). Comparison of the antifungal effects of various extracts of *Onosma chlorotricum* on *Candida albicans* and *Candida glaberata* with two antibiotics fluconazole and nystatin. Yafte, 20(1); 54-62.
11. Dhuley, J.N. (1999). This article has been retracted *Hamycin treatment* of candidiasis in normal and diabetic rats. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 26(2); 175-180.
12. Edmondson, M. (2011). Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonisation of MRSA positive wounds and its influence on wound healing. Biotechnol.Lett., 24(3);142-151.
13. Fraser, V.J. (1992). Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. Clinical Infectious Diseases, 15(3); 414-421.
14. Hajyani, S., Modaresi, M., Madani, M. (2015). Effect of Malva sylvestris L. extract on blood cell parameters in mice with *Candida albicans* infection. Der Pharma Chemica, 7(5); 302-305.
15. Ghalem, B. R., Mohamed, B. (2009). Essential oil from gum of *Pistacia atlantica* Desf. screening of antimicrobial activity. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 3(3); 087-091.
16. Gautam, S.S., Kumar,S. (2012). The antibacterial and phytochemical aspects of *Viola odorata* Linn. extracts against respiratory tract pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 82(4); 567-572.
17. Gustafsson, E. (2009). Mathematical modelling of the regulation of spa (protein A) transcription in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology, 299(1); 65-74.
18. Karaman, S., Digrak, M. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of tymus revolutus celak from turkey. J.Ehnopharamacology, 76; 183-186.
19. Kovalik. A.O., Biselto, P. (2014). Effects of an orabase for mulation with ethanolic exctra of *Malva sylvestris* L. in oral wound healing in rats. Journal of Medicinal Food, 1-4.
20. Lindholm, P. (2002). Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents 1 PL and UG contributed equally to this manuscript. Molecular cancer therapeutics, 1(6); 365-369.
21. Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E. (1994). Effects of planting time and mineral fertilization on *Pep permint* essential oil composition and its biological activity. Flovour and Fregrance Journal. 9(3); 125-129.
22. Mustafa, A., Ali, M. (2011). New steroidal lactones and homo mono terpenic glucoside from fruits of *Malva sylvestris* L. J Acta Pol Pharm, 68(3); 393-401.
23. Mousavi, S.A. (2007). Rapid molecular diagnosis for-candida species using *PCR-RFLP*. Biotechnology, **6**(4); 583-587.
24. Nikzad, H., Atlasi, M. A., Naseri Esfahani, A.H., Naderian, H., Nikzad, M. (2010). Effect of *Arnebia* leaf on the healing process of rat's second degree burn Feyz. Journal of Kashan University of Medical Sciences, 14(2); 99-106.
25. Panah, H., Bigdeli, M.R., Esmaili, M.A. (2018). Inhibitory effect of *Viola odorata* exteract on tumor growth and metastasis in 4T1 breast cancer model. IJPR., 17(1); 276-291.
26. Roberts, I., F. Saunders., Boulnois, G. (1989). Bacterial capsules and interactions with complement and phagocytes, Portland Press Limited.
27. Sawhney, AN., Khan, MR., Ndalio, G., Nkunya, M.H.H., Wevers, H. (1987). Studies on the rationale of African traditional medicine. Pak. J. Sci. Ind. Res., 21(5-6); 193-6.
28. Seneviratne, C.J. (2010). Proteomics of drug resistance in Candida glabrata biofilms. Proteomics, 10(7); 1444-1454.
29. Shoham, S., Levitz, S.M. (2005). The immune response to fungal infections. British journal of haematology, 129(5); 569-582.
30. Stuyt, R.J. (2004). Recombinant interleukin-18 protects against disseminated *Candida albicans* infection in mice. The Journal of infectious diseases, 189(8); 1524-1527.
31. Taheri, J.B. (2018). Study of aqueous and alcoholic extract of the *Melissa officinalis* effect on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. Journal Mil Med, 19(5); 505-512.
32. Vacheva-Dobrevski, R., Kovachev, S., Nacheva, A., Stoev, S., Vasilev, N. (2003). Comparative study of itraconazole and fluconazole therapy in vaginal candidosis. Akush Ginekol, 43(1); 20-3.
33. Tohidi, M., Khayami, M., Nejati, V., Meftahizade, H. (2011). Evaluation of antibacterial activity and wound healing of

Pistacia atlantica and *Pistacia khinjuk*. Journal of Medicinal Plants Research, 5(17); 4310-4314.

.

Investing effect of Malva , Thymus , Viola and Pinus, Extracts on *Candida Glabrata* in the In vitro and Animal model.

S. M. Moosavinejad,**Sh. Nasiri Semnani**., R.Shokri., R.Shapouri
Department of Microbiology , Faculty of Basic and medical Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran**. Sh.nasiri92@yahoo.com**

Received:2019.23. 9 **Accepted: 2019.22.10**

Abstract

Inroduction & Objective: The skin infected wound and wounds caused by burn are very epidemic in society, and these kind wounds rate treatment in effective to alleviate the patint, applying the herbal drugs with less complications to treat the wounds. Considering this significance , surveying Investing effect of Malva , Thymus , Viola and Pinus, Extracts on *Candida Glabrata* in the In vitro and Animal model.

Material and Method: In this study, hydroalcholic extracts of Malva , Thymus , Viola and Pinus were prepared in the laboratory. Then, the MIC and MLC of the extract were determined by dilution method in the broth. In the study of the animal model, the bacteria were first inoculated with a concentration of (5×106CFU/ML) to the wound site on Syrian mice. After 24 hours, an ointment prepared with MLC concentration was prepared from extracts was used to treat burns and infections with *Candida Glabrata*. In the animal model, the extracts of have antimicrobial activity against growth of *Candida Glabrata*.

Results: In this study, The MIC and MLC of the extracts model, the microbia were first inoculated with a concentration of (5×10^6CFU/ML) to the wound site on Syrian mice. After 24 hours, an ointment prepared with MBC concentration was prepared from extracts of the nettle, watercress and burdock root for 1 g of silver sulfadiazine and was used to treat burns and infections with *Candida Glabrata*. In the animal model, the extracts antimicrobial activity against growth of *Candida Glabrata*. In this case, the extract of Pinus and Viola have growth inhibitory *Candida Glabrata* activity stronger than Malva , Thymus extract.

Conclusion: According to the findings of this study, it can be concluded that the extract of these 4 plants on an animal model has antimicrobial and healing effects on *Candida Glabrata*. It can be used as an anti-inflammatory agent orointment microbia to be raised.

Keywords: Malva , Thymus , Viola and Pinus extracts , Second degree burn *Candida glabrata*, Mouse.