بررسی فیتوشیمیایی و آنتی کاندیدیایی اسانس گیاه *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas. در مراحل مختلف رشد گیاه در استان لرستان

عبدالناصر محمدی*[۱]، حمزه امیری[۲]، حامد خدایاری[۱]، علی زارعی[۳]، داریوش اقبالی[۳]، فریده آذربانی[۱]

[۱]استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

[۲]دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

[۳]کارشناس‌ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۲۱

چکیده

در این مطالعه ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه آویشن .*Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas و خواص ضد قارچی آن علیه گونه‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krosei* مورد بررسی قرار گرفت. گیاه مورد نظر در سه مرحله نموی از فروردین تا تیرماه سال ۱۳۹۱، از منطقه جغرافیایی دره سید واقع در روستای چمشک جنوب خرم‌آباد (استان لرستان) جمع‌آوری و اسانس آن به روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر استخراج گردید. ترکیبات موجود در اسانس در مرحله گلدهی به وسیله کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی و خواص ضد قارچی اسانس در سه مرحله نموی با استفاده از روش میکرودایلوشن، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) تعیین گردید. نتایج نشان داد که در مرحله گلدهی، مهمترین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه شامل: تیمول (٤۲/٦ درصد) و کارواکرول (۳۲/۳۳ درصد) بوده که MIC و MFC آن برای گونه‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krosei* به‌ترتیب ۰/۱۲۵ تا ۰/۲۵ و ۰/۲۵ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. از آنجایی که اسانس گیاه در هر سه مرحله، علیه هر ۳ گونه از *Candida*، اثر بازدارندگی خوبی از خود نشان داد، لذا می‌توان از آن به عنوان یک اسانس موثر علیه این گروه از قارچ‌ها استفاده کرد و با مطالعات بیشتر جایگزین داروهای ضد قارچی شیمیایی نمود.

واژه‌های کلیدی: آویشن. *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas، آنتی کاندیدیازیس، اسانس، استان لرستان

*نویسنده مسئول: khodayari.h@lu.ac.ir

مقدمه

جنس آویشن (*Thymus* L.) متعلق به تیره نعناع Lamiaceae از مشهورترین گیاهان اسانس‌دار است. گونه *Thymus eriocalyx* در استان‌های کردستان، کرمانشاه، مرکزی، همدان و لرستان می‌روید و در خارج از ایران در شمال کشور عراق نیز گزارش شده است (Kalvandi, 2012). مطالعات فیتوشیمیایی نشان می‌دهد که تمام گونه‌های آویشن غنی از ترکیبات فرار روغنی و ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول می‌باشند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰٤ توسط رسولیان و همکاران انجام شد، مهم‌ترین ترکیب جدا شده از آنالیز اسانس گیاه*Thymus eriocalyx* شامل تیمول بود که ٦٤/۳ درصد کل ترکیبات را تشکیل داد (Rasooli *et al.,* 2011). سفیدکن و عسگری از آنالیز اسانس آویشن کوهی ۲۵ ترکیب جدا کردند که کارواکرول ٤۱/٤ درصد و تیمول ۱۹/۵ درصد ترکیبات را تشکیل دادند (Sefidkon *et al.*, 2002). در بررسی دیگری که در ترکیه بر روی آنالیز اسانس گونه‌های آویشن انجام شد، تیمول بیشترین ترکیب اسانس این گیاهان را تشکیل داد (Azaz *et al.,* 2004). از طرفی از اسانس این گیاهان برای دردهای روماتیسمی، گزش حشرات، کشیدگی عضلات، سرفه‌های مزمن و ناراحتی‌های ریوی، سردی معده و روده و شکم استفاده می‌شود و خاصیت ضد باکتریایی و ضدقارچی دارند (Sefidkon, 2002). اسانس‌ها و ترکیبات تشکیل‌دهنده این گیاهان فعالیت‌های ضدقارچی موثری را در شرایط In vitro و In vivo از خود نشان داده و به‌طور وسیعی علیه گونه‌های کاندیدا، آسپرژیلوس و تریکوفیتون استفاده شده‌اند (Mota, 2012). کاندیدیازیس یک عفونت قارچی ناشی از گونه‌های کاندیدا می‌باشد، در سال‌های اخیر به‌طور چشمگیری افزایش یافته است.*Candida albicans* شایع‌ترین عامل بوده و مسئول بیش از ۹۰ درصد عفونت‌های کاندیدیازیس می‌باشد (Douglas, 2003; Edwards, 1995). *Candida albicans* چهارمین عاملی است که از عفونت‌های خونی بیماران بستری در بیمارستان جدا می‌شود (Eggimann *et al.,* 2003) و به‌عنوان یک مخمر فرصت طلب در افراد مستعد از قبیل مبتلایان به ایدز، دیابت، مصرف‌کنندگان آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف و افرادی که پیوند عضو دریافت نموده‌اند ایجاد عفونت می‌کند و گاهی با سپتی سمی‌های کشنده همراه است (Menon, 2001). در خانم‌ها یکی از عوامل مهم واژینیت‌های قارچی است که با داروهای فعلی ریشه کن نمی‌شود (Avijgan *et al.,* 2006). امروزه در درمان عفونت‌های کاندیدایی از داروهای مختلف از قبیل داروهای گروه آزول (فلوکلونازول)، داروهای پل ان (نیستاتین) و اکینوکاندین (کاسپوفانژین) استفاده می‌شود. اما بررسی‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف *Candida* نسبت به داروهای ضدقارچی از خود مقاومت نشان داده و داروهایی مانند فلوکونازول که کاربرد وسیعی در درمان عفونت‌های قارچی به صورت جلدی و خوراکی دارد، دارای اثر سمی و عوارض جانبی زیادی می‌باشد (Gualco *et al.,* 2007; Saag *et al.,* 2000; He *et al.,* 1994; Fan-Havard *et al.,* 1991; Boken *et al.,* 1993; White *et al.,* 1994; Troillet *et al.,* 1993).

بنابراین نیاز به عوامل ضدقارچی جدیدی می‌باشد که دارای کمترین اثرات سیتوتوکسیسیتی و عوارض جانبی باشند که این عوامل عمدتا از اسانس و عصاره گیاهان به‌دست می‌آیند. این عوامل دارای فعالیت بیولوژیکی ضدقارچی و ضدباکتریایی در in vitro و in vivo بوده که ناشی از ترکیبات فنلیک و ترپنوئید می‌باشد و توجه محققین و پژوهشگران را به خود جلب نموده‌اند و به نظر می‌رسد که محل اثر اسانس‌های این گیاهان محل‌های هدف جدیدی غیر از محل هدف داروهای فعلی باشد که قارچ‌ها نسبت

به آنها مقاوم شده‌اند به این ترتیب می‌توان از بروز مقاومت‌های دارویی جدید جلوگیری نمود (Bonjar, 2004; Li *et al.*, 2005; Conner, 1993).

مطالعه حاضر با هدف شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده و بررسی اثرات ضد قارچی اسانس *Thymus eriocalyx* علیه گونه‌های مخمری شامل *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krosei* به روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن صورت گرفت. به دنبال آن حداقل غلظت مهار کننده قارچ (MIC)[2] و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC)[3] اسانس گیاه علیه گونه‌های *Candida* به روش میکرودایلوشن و (NCCLSM27-A) تعیین گردید (NCCLS document, 2002).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه گیاه: گونه *Thymus eriocalyx* از منطقه جغرافیایی دره سید واقع درروستای چمشک جنوب خرم‌آباد از فروردین تا تیرماه سال ۱۳۹۱ در مراحل مختلف رویشی قبل از گلدهی، زمان گلدهی و بعد از گلدهی جمع‌آوری و مورد شناسایی قرار گرفت. بعد از شناسایی، اقدامات بعدی شامل خشک کردن و آماده‌کردن نمونه‌ها جهت اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر و آنالیز مواد مؤثره با گاز کروماتوگرافی انجام شد.

اسانس‌گیری: تهیه اسانس به روش تقطیر با آب و بخار انجام گرفت. مقدار ۱۰۰ گرم از تمام بخش‌های گیاه (گل، ساقه و برگ) خشک و پاک شده را با استفاده از آسیاب برقی خرد و گیاه پودر شده را به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس‌گیری (کلونجر مدل دارونامه بریتانیا) ریخته و به آن ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جریان آب سرد مبرد برقرار و بالن ژوژه درون هیتر برقی دستگاه قرار گرفت. دستگاه روشن و اجازه داده شد تا مدت دو ساعت فرایند تقطیر انجام شود.

آنالیز اسانس‌ها: جهت آنالیز و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. اسانس در شرایط مشابه و یکسان به دستگاه تزریق شد تا نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده آن‌ها مشخص شود. دستگاه GC از مدل Agilent 6890 و دستگاه MS از مدل Agilent 5973 با ستونی به‌طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent ۵۹۷۳ با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت.

بررسی اثر ضد قارچی: به منظور تعیین حساسیت عوامل قارچی نسبت به اسانس گیاه از مخمرهای بیماریزای *Candida albicans* سوش استاندارد PTCC:5027، *Candida glabrata* سوش استاندارد PTCC: 5297 و *Candida kruzei* سوش استاندارد PTCC: 5295 استفاده گردید.

رقت سازی: مقدار ۱۲۸ میکرولیتر از اسانس گیاه *Thymus eriocalyx* در یک میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا استوک استریل اسانس تهیه شد. سپس رقت‌های متوالی از استوک (۲۵٦، ۱۲۸، ٦٤، ۳۲، ۱٦، ۸، ٤، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰٦ و ۰/۰۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر) تهیه

1-Minimum Inhibition Concentration
2-Minimum fungicidal Concentration

گردید و دیسک‌های بلانک استریل با قطر ٦/٤ میلی‌متر را با ۳۰ میکرولیتر از غلظت تهیه شده از اسانس آغشته و خشک شدند.

روش دیسک دیفیوژن: در روش دیسک دیفیوژن ابتدا قارچ‌ها برروی محیط سابورودکستروزآگار کشت داده و به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون اسپور قارچی تهیه گردید، این سوسپانسیون از رشد کشت‌های ۲٤ تا ٤۸ ساعت اسپور مخمرها در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. سپس عناصر قارچی با استفاده از لام نئوبار شمارش و غلظتی معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ اسپور در میلی‌لیتر به‌دست آمد. اسپورهای قارچ با سواپ استریل برروی محیط کشت سابورو دکستروز آگار پخش شد. دیسک‌های آغشته به اسانس‌گیاهان برروی محیط کشت داخل پلیت قرار داده شد، دیسک آغشته به فلوکونازول نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با اندازه‌گیری قطرهاله ایجاد شده به تفسیرنتایج آزمایش اقدام گردید (NCCLS document, 2002).

روش میکرودیلوشن: در روش میکرودیلوشن که از میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای استفاده شد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط سابورودکستروز براث به گودهای ردیف افقی اضافه شد، سپس به گوده اول هر ردیف افقی ۱۰۰ میکرولیتر اسانس که در حلال دی‌متیل سولفوکساید حل شده بود، اضافه و با انتقال به گوده های بعدی رقت‌های متوالی از اسانس تهیه گردید، پس از آن از سوسپانسیون سلولی که حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ اسپور در هر میلی‌لیتر بود به گودهها تلقیح شد. دو ردیف آخر میکروپلیت مربوط به شاهد مثبت و منفی بود. شاهد مثبت حاوی محیط کشت، حلال دی‌متیل سولفوکساید و اسپور قارچ، شاهد منفی حاوی محیط کشت و حلال دی‌متیل سولفوکساید بدون اسپور قارچ بود. از غلظت‌های مختلف فلوکونازول نیز به‌عنوان شاهد ضد قارچ استفاده شد. در مرحله آخر پلیت‌ها به مدت٤۸ ساعت در حرارت ۳۰ درجه قرار داده شدند، با بررسی گودهها و ایجاد و یا عدم ایجاد کدورت و با کشت گودهها بروی محیط کشت سابورودکستروزآگار نسبت به تعیین MIC و MFC قارچ‌ها اقدام گردید. باتوجه به کدورت ایجاد شده در اثر رشد میکروارگانیسم در گودههای میکروپلیت و انتقال ۵۰ میکرولیتر از محتوای گودهها به سابورودکستروزآگار مقدار MIC تعیین شد به‌طوری‌که گوده قبل از اولین گودهای که کدورت در آن مشاهده گردید به عنوان MIC در نظرگرفته شد. آخرین گودهای که با انتقال ۵۰ میکرولیتر از محتویات گوده فاقد کدوزت در محیط سابورودکستروزآگار هیچ گونه کلنی مخمری در آن رشد نکرد به عنوان MFC (حداقل غلظتی که سبب مرگ قارچ می‌شود) در نظر گرفته شد (NCCL document, 2002).

آنالیز آماری: پس از گردآوری اطلاعات بر پایه اصول آماری، جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس بر روی گونه‌های *Candida* از تکنیک‌های آماری شامل آزمون آنالیز واریانس ANOVA (با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16) و تست دنت (Dunnett) استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی اختلاف میانگین اسانس‌ها محاسبه گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز و اثرات ضد قارچی اسانس *Thymus eriocalyx* برروی گونه‌های کاندیدا: آنالیز *Th. eriocalyx* در مرحله گلدهی باعث شناسایی ۳٦ ترکیب شده که مهمترین آنها شامل تیمول (٤۲/٦ درصد)، کارواکرول (۳۲/۳۳ درصد) و سیمول (٤/۰٤ درصد) بود که در مجموع ۷۸/۹۸ درصد کل ترکیبات را تشکیل دادند (جدول ۱). اثرات ضدقارچی اسانس

به‌دست آمده از گونه *Th. eriocalyx* با روش دیسک دیفیوژن نشان داد که اسانس این گیاه برروی گونه‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krusei* به‌ترتیب تا غلظت‌های ۱۶، ۳۲ و۳۲ میکروگرم در میلی لیتر اثر مهاری خوبی دارد. بررسی اثرات غلظت‌های مختلف گیاه در محدوده ۱۲۸– ۰/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از روش میکرودایلوشن بر رشد سه گونه کاندیدا نشان داد که اسانس این گیاه قادر به مهار رشد تا غلظت ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. MIC اسانس این گیاه به‌ترتیب برای گونه‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. Krusei* ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۲۵ و MFC ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۱- معرفی ترکیب‌های شیمیایی اسانس گونه *Thymus eriocalyx* در مرحله گلدهی

ردیف	نام ترکیب	RI	درصد
۱	tricyclene	۹۰۹	۰/۰۱
۲	α-thujene	۹۱۶	۰/۹۲
۳	α-pinene	۹۲۶	۰/۴۵
٤	comphene	۹۶۱	۰/۲۳
٥	sabinene	۹۷۰	۰/۱۱
٦	β-pinene	۹۶۷	۰/۱۴
۷	3-octanone	۹۸۰	۰/۶۳
۸	1-octen-3-ol	۹۷۷	۰/۰۷
۹	β-myrcene	۹۹۲	۱/۱۹
۱۰	3-Octanol	۹۸۸	۰/۰۵
۱۱	Phellandrene	۱۰۰۰	۰/۱۷
۱۲	α-terpinene	۱۰۲۳	۱/۲۲
۱۳	cymol		۳/۲۶
۱٤	1.8-cineole	۱۰۰۹	۰/۶۰
۱٥	limonene	۱۰۲٥	۰/۱۸
۱٦	β-ocimene Y	۱۰۳۹	۰/۰۶
۱۷	γ-terpinene	۱۰۲۶	۱۰/۸۶
۱۸	cis-sabinene hydrate	۱۰۶۹	۰/۳۱
۱۹	3-nonanone	۹۰۳	۰/۰۴
۲۰	α-terpinolene	۱۰۸۹	۰/۰۷
۲۱	cis-β-Terpineol	۱۱۴۴	۰/۱۰
۲۲	linalool	۱۰۹۸	۰/۲۶
۲۳	trans-Sabinene hydrate	۱۰۶۴	۰/۰۱
۲٤	borneol	۱۱۶۶	۰/۷٥
۲٥	4-terpineol	۱۱۸۷	۰/۴۸
۲٦	carvacrol methyl ether	۱۲۴۲	۰/۰۳
۲۷	thymol	۱۲۶۷	۱۶/۴۳
۲۸	carvacrol	۱۲۹۹	۵۲/۳۴
۲۹	thymyl acetate	۱۳۵۱	۰/۰۵

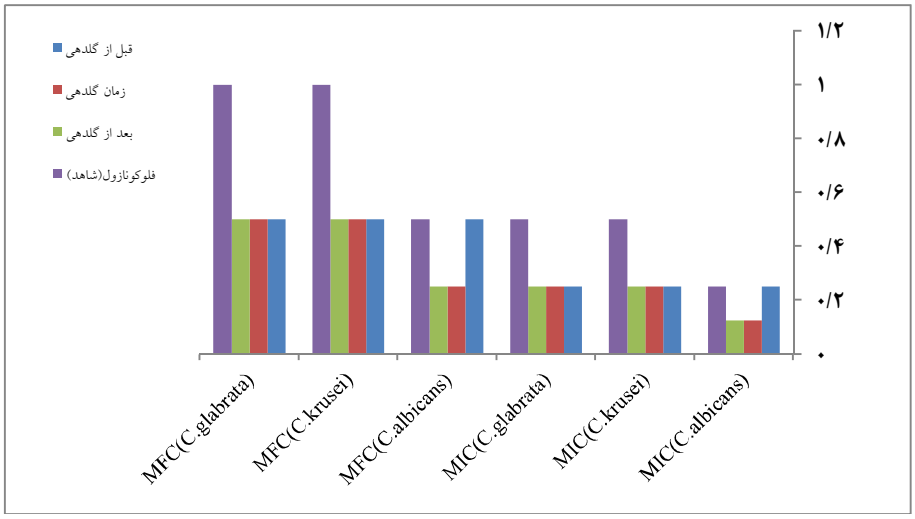
ادامه جدول ۱-

۳۰	eugenol	۱۳۵۱	۰/۰۲
۳۱	carvacryl acetate	۱۳۵۸	۰/۱۱
۳۲	α-Ylagene	۱۳۶۸	۰/۰۱
۳۳	β-Bourbonene	۱۳۸۲	۰/۰۳
۳٤	trans-Caryophyllene	۱۴۱۴	۱/۸۳
۳۵	α-caryophyllene	۱۴۱۴	۰/۰۷
۳٦	germacrene D	۱۴۷۹	۰/۴۲
۳۸	bicyclogermacrene	۱۴۹۲	۰/۲۶
۳۹	β-Bisabolene	۱۵۱۱	۰/۶۴
٤۰	delta-Cadinene	۱۵۲۶	۰/۰۵
٤۱	cis-alpha-Bisabolene	۱۵۱۷	۰/۷۳
٤۲	neryl acetate	۱۳۶۰	۰/۰۱
٤۳	spathulene	۱۵۸۹	۰/۱۹
٤٤	caryophyllene Oxide	۵۹۶	۰/۲۰
٤۵	farnesol	۱۷۸۵	۰/۰۴

جدول ۲- نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثرات ضدقارچی اسانس *Thymus eriocalyx* برروی گونه‌های کاندیدا

گونه قارچی	اسانس	محدوده غلظت (میکروگرم/ میلی‌لیتر)	میانگین MIC	میانگین MFC
Candida albicans	قبل از گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{A}	۰/۵ ±۰/۰۵
	زمان گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۱۲۵ ±۰/۰۰۵^{B}	۰/۲۵ ±۰/۰۱
	بعد از گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۱۲۵ ±۰/۰۰۵^{B}	۰/۲۵ ±۰/۰۱
	فلوکونازل(شاهد)	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{A}	۰/۵ ±۰/۰۵
Candida krusei	قبل از گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{B}	۰/۵ ±۰/۰۵
	زمان گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{B}	۰/۵ ±۰/۰۵
	بعد از گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{B}	۰/۵ ±۰/۰۵
	فلوکونازل(شاهد)	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۵ ±۰/۰۵^{A}	۱ ±۰/۱
Candida glabrata	قبل از گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{B}	۰/۵ ±۰/۰۵
	زمان گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{B}	۰/۵ ±۰/۰۵
	بعد از گلدهی	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۲۵ ±۰/۰۱^{B}	۰/۵ ±۰/۰۵
	فلوکونازل(شاهد)	٦٤ - ۰/۰۳	۰/۵ ±۰/۰۵^{A}	۱ ±۰/۱

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داد که بین میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus eriocalyx* در غلظت‌های مختلف برروی گونه‌های *Candida*در مقایسه با شاهد فلوکونازول در سطح احتمال ۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۱). میانگین غلظت اسانس*Thymus eriocalyx* در مراحل قبل گلدهی، زمان گلدهی، بعد از گلدهی در مقایسه با شاهد برروی سه گونه *Candida* با هم مقایسه گردید. بیشترین میزان MIC و MFC مربوط به *Candida albicans* بوده از طرفی اسانس این گیاه در زمان گلدهی و بعد از گلدهی بیشترین اثر ضد قارچی را برروی گونه‌های *Candida* داشته است (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus eriocalyx* در مراحل مختلف برروی گونه‌های کاندیدا

بحث

افزایش عفونت‌های قارچی ناشی از قارچ‌های بیماری زا و فرصت‌طلب، به ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی از اوایل دهه ۹۰، به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان مطرح شده است. پاتوژن‌های فرصت طلب مهم مانند *Candida albicans* در این میان نقش بسزایی دارند (Kantarcioglu & Yucel, 2002). اما سایر گونه‌های *Candida* نیز در بیماران با نقص سیستم ایمنی مانند بیماران مبتلا به ایدز، سرطان و بیماران پیوندی باعث ایجاد عفونت‌های سیستمیک می‌شوند و گونه‌های *Candida* به‌عنوان چهارمین عامل عفونت‌های خونی بیماران بستری در بیمارستان مطرح شده‌اند که مسؤول تقریباً ٤٠ درصد موارد مرگ و میر می‌باشند (Anaissie *et al.*, 2003).

در مطالعه حاضر تاثیر مهاری اسانس *eriocalyx Th.* در سه مرحله نموی علیه گونه‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krusei* مورد بررسی قرار گرفت و ترکیبات موجود در اسانس این گیاه توسط روش کروماتوگرافی‌گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف جرمی شناسایی شد. مطالعات گذشته و مطالعه ما نشان می‌دهد تیمول و کارواکرول در گیاه *Thymus eriocalyx* مهم‌ترین و فراوانترین ترکیبات شیمیایی می‌باشند (Salguerio *et al.*, 1997a; Azaz *et al.*, 2004; Habibi *et al.*, 2006; Rustaiyan *et al.*, 2002). کارواکرول و تیمول دارای طیف وسیعی از اثرات ضدمیکروبی و ضد قارچی بوده، این مواد فعالیت ATPase را مهارکرده و نفوذپذیری غیراختصاصی غشای سلول قارچی را افزایش می‌دهند. علاوه براین کارواکرول با افزایش نفوذپذیری غشاء، قارچ‌ها را نسبت به سایر مواد ضدقارچی حساس و آسیب‌پذیر می‌سازد (Helander *et al.*, 1998). براساس نتایج حاصل از بررسی‌های ضد قارچی، تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس *Thymus eriocalyx* در مراحل مختلف رویش بر میزان رشد گونه‌های *Candida* در این مطالعه از نظر آماری (آنالیز واریانس) معنی‌دار ($P< ۰/۰۰۰۱$) بود که بیانگر این مطلب است که با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد گونه‌های کاندیدای مورد مطالعه کاهش می‌یابد (جدول ۱). مطالعاتی که در گذشته برروی اسانس بدست آمده از گونه‌های آویشن انجام شده، فعالیت‌های ضد قارچی وسیع این گیاهان را نشان

می‌دهد، به‌طوری‌که اسانس بدست آمده از *Thymus eriocalyx* فعالیت‌های ضد قارچی قوی علیه آسپرژیلوس پارازیتیکوس از خود بروز می‌کند (Rasooli *et al.*, 2005). رسولی و همکاران فعالیت اسانس *Thymus eriocalyx* علیه آسپرژیلوس نایجر را مورد مطالعه قرار دادند نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس این گونه گیاهی در غلظت ppm ۱۲۵ مانع رشد آسپرژیلوس نایجر شد (Rasooli *et al.*, 2006). در تحقیقی توسط نائینی و همکاران اسانس‌ها و عصاره‌های ۵۰ گیاه دارویی ایران روی سویه‌ای استاندارد کاندیدا آلبیکنس انجام شد و نتایج مثبت ارزیابی و اکثر گونه‌های گیاهی خاصیت ضد کاندیدایی قوی از خود نشان دادند (Naini *et al.*, 2011). در چندین مطالعه دیگر اثرات ضد کاندیدایی تعدادی از گیاهان از جمله اسطوخودوس، آویشن شیرازی، آویشن کوهی، مرزه، نعناع و زیره سبز با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این گیاهان اثرات ضدکاندیدایی بسیار قوی دارند از خود نشان دادند و بین اسانس این گیاهان با شاهد یک رابطه معنی‌دار به‌دست آمد (Farzaneh *et al.*, 2006؛ Zarei *et al.*, 2006؛ Naini *et al.*, 2011).

در تحقیق ما نیز مقایسه میانگین اسانس *Thymus eriocalyx* با شاهد (فلوکونازول) نشان دهنده اثرات ضد کاندیدایی قوی اسانس گونه مورد مطالعه بوده که با مطالعات گذشته مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که توسط حقیقی و همکاران با اسانس آویشن باغی، جعفری، زیره سبز، زیره سیاه و شاهد فلوکونازول برروی *Candida albicans* انجام شده MIC آنها به‌ترتیب ۲۵، ۷۲، ٤۱۲، ۱۳۰ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد (Haghighi *et al.*, 2011). در تحقیق حاضر MIC اسانس *Thymus eriocalyx* بر روی *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krusei* به‌ترتیب ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و ۰/۲۵MFC، ۰/۵، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد که در مقایسه با شاهد فلوکونازول (۰/۲۵MIC تا ۰/۵ و MFC ۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) نشان دهنده اثر بسیار خوب اسانس این گونه از آویشن برروی گونه‌های *Candida* در مقایسه با مطالعه انجام شده توسط حقیقی و همکاران می‌باشد (جدول و نمودار، ۲). نتایج حاصل از بررسی خواص ضد قارچی اسانس مورد بررسی و مقایسه میانگین‌ها در این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس گیاهان مذکور علیه هر سه گونه مخمری آزمایش شده اثرات بازدارندگی قابل توجهی داشته و در مقایسه با شاهد ضدقارچی فلوکونازول مورد استفاده موثرتر بوده‌اند. مقایسه میانگین اثرات ضد قارچی *Thymus eriocalyx* در سه مرحله قبل از گلدهی، زمان گلدهی و بعد از گلدهی بررسی شد و نتایج نشان داد که میانگین اثرات ضد کاندیدایی اسانس در هر سه مرحله نموی موثر بوده و از نظر آماری معنی‌دار بودند.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عمده ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس *Thymus eriocalyx* مانند سایر گونه‌های جنس آویشن، تیمول و کارواکرول می‌باشد و اثرات ضدقارچی این گونه نیز احتمالا به‌دلیل وجود تیمول و سایر ترکیبات ترپنوئید موجود در اسانس می‌باشد. هرچند مطالعاتی در مورد اثرات ضد قارچی گیاهان دارویی در گذشته انجام شده ولی مطالعه حاضر به‌علت نتایج خوب MIC و MFC در مقایسه با داروهای ضد قارچی (فلوکونازول) و مطالعات انجام شده در گذشته از مزایای بهتری برخوردار می‌باشد. این مطالعه در راستای حل مشکلاتی چون اثرات جانبی داروهای ضدقارچی شیمیایی و جایگزینی آن‌ها با داروهای

ضدقارچی گیاهی جهت‌گیری شد. از آنجا که اسانس‌های جدا شده از *Thymus eriocalyx* بر همه گونه‌های *Candida* به کار رفته در این مطالعه اثر بازدارندگی خوبی داشتند، لذا می‌توان از آن‌ها به‌عنوان اسانس‌های موثر بر علیه این گروه از قارچ‌ها استفاده نمود اما خاصیت ضدقارچی این اسانس در شرایط In vivo نیاز به بررسی بیشتری دارد و باید در مورد اثرات دما، pH، مواد داخل بدن موجود زنده بر روی آن و همچنین ایجاد مقاومت دارویی در برابر این اسانس‌ها مطالعات بیشتری صورت گیرد.

منابع

1. Anaissie, E.J., Mc Ginnis, M.R., and Pfaller, M.A. 2003. Clinical Mycology. UK: Mosby, pp: 195-96.
2. Avijgan, M., Saadat, M., Nilforoshzadeh, MA., and Hafizi, M. 2006. Antifungal effect of *Echinophora platyloba's* extract against *Candida albicans*. Iranian. Journal of Pharmacological search, 4: 285-9.
3. Azaz, A.D., Irtem, H.A., Kurkcuoglu, M. and Baser, K.H.C. 2004. Composition and the *in vitro* Antimicrobial activities of the essential oils of some *Thymus* species. *Z. Naturforsch*, 59c: 75-80.
4. Boken, D.J., Swindells, S., and Rinaldi, M.G. 1993. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. Clinical Infectious Diseases, 17(6): 1018-21.
5. Bonjar, S. 2004. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. J. Ethnopharmacol, 94: 301–5.
6. Conner, D.E. 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidson P,Branen AL, eds. Antimicrobials in Foods. New York: Marcel Dekker, 441–68.
7. Douglas, LJ. 2003. *Candida biofilms* and their role in infection. Trends Microbiol. 11: 30-6.
8. Edwards, JE. 1995. Candida species. In: Mandell, Douglas, Bennett, editors. Principles and practice of infectious diseases. New York, USA: Churchill Livingstone, 2289-301.
9. Eggimann, P., Garbino, J., and Pittet D. 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. Lancet Infect Dis, 3: 772-85.
10. Fan-Havard, P., Capano, D., Smith, S.M., Mangia, A., and Eng, R.H. 1991. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. Antimicrob Agents, 35(11): 2302.
11. Farzaneh, M. 2006. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens – commun *Agric. Apple Biol Sci*, 71 (3): 1327 - 33.
12. Gualco, L., Debbia, E.A., Bandettini, R., Pescetto, L., Cavallero, A., and Ossi, MC. 2007. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. International Journal of Antimicrobial Agents, 29(2):179-84.
13. Habibi, H., Mazaheri, N., Fakhr-Tabatabaee, M., and Bigdeli, M. 2006. Effect of altitude on essential oil and components in wild thyme (*Thymus kotschyanus* Boiss.) Taleghan region. Pajouhesh & Sazandegi, 73: 2-10
14. Haghighi, F., Rodbarmohammadi, SH., Soleimani, N., and Sattari, M. 2011. Evaluation of antifungal activity of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Petroselinum crispum*, *Cuminum cymin*um and *Cuminum cymin*um on *Candida albicans* in comparison with Fluconazole. Modarres Journal of Medical Sciences: Pathology of Life, 14(1): 29-35.
15. He, X., Tibbali, R.N., Zarins, L.T., Bradly, S.F., Sangeorzan, J.A. and Kaffman, C.A. 1994. Resistance in oropharingeal *Candida albicans* strains isolated from patients infected with human immunodeficiency virus. Antimicrob Agents Chemother, 38(6): 2495-7.
16. Helander, I., Alokomi, H., Latvakal, K., and Sandholm, M. 1998. Characterization of the action of essential oil components on Gram negative bacteria. J agriculture and Food Chemistry, 46: 3590-95.
17. Kalvandi, R., Atri, M., Jamzad, Z., and Safikhani, K. 2012. Taxonomic study of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas. in Iran with emphasis on Floristic marker and using special station method. Taxonomy and Biosystematics. 10: 63-76.
18. Kantarcioglu, A.S., and Yucel, A. 2002. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strain among *Candida albicans* isolated from immune compromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. Rev Iberoam Mycol., 19(1): 44-48.
19. Li, H., Qing, C., Zhang, Y., and Zhao, Z. 2005. Screening for endophytic fungi with anti-tumour and antifungal activities from

Chinese medicinal plants. World J. Microbial Biotechnol., 21: 1515–21.

20.Menon, T., Umamaheswari K., Kumarasamy, N., Solomon, S., and Thyagarajan, SP. 2001. Efficacy of fluconazole and it raconazole in the treatment of oral Candidiasis in HIV patients. Acta Trop, 80(2): 151-4.

21.Mota, K.S.L., Pereira, F.O., Oliveira, W.A., Lima, I.O., and Lima, E.O. 2012. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. Essential oil and its constituent phytochemical against rhizopus oryzae: Interaction with ergosterol," Molecules, 17: 14418-14433.

22.Naini, A., Naseri, M., Kamal Nejad, M., and Khosh zaban, F. 2011. Effects of essential oils and extracts50 herbal standard strains of *Candida albicans* in vitro. Journal of Medicinal Plants, 2: 38.

23.NCCLS document M27-A2. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clin Lab Standards Inst., 22(19): 1-29.

24.Rasooli, I. and Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. Phytochemistry, 66: 2852-2856.

25.Rasooli, I., Rezaei, M.B., and Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of Aspergillus niger by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlock. Food Control, 17: 359–364.

26.Rustaiyan, A., Masoudi, S., and Monfared, A. 2002. Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. Planta Medica, 66:197 – 8.

27.Saag, M., Van der Host, C., and Powderly, W.G. 2000. Refractory Mucosal Candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. Clinical Infectious Diseases, 30: 749-56.

28.Salguerio, L.R., Vila, R., Tomi, F., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. Canigueral, S., Casanova, J., Cunha, A. P., and Azadet, J. 1997a. Competition and variability of the essential oil of *Thymus caespitius* From Portugal. Photochemistry, 45: 307-311.

29.Sefidkon F. and Askari F. 2002. Essential Oil Composition of 5 *Thymus* species. Research Institute of Forests and Rangelands. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research, 12: 29 - 51.

30.Sefidkon F. and Rahimi-Bidgoli A. 2003. Quantitative and qualitative variation of essential oil of *Thymus kotschyanus* by different methods of distillation and stage of plant growth. Research Institute of Forests and Rangelands. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research. 15: 1-22.

31.Troillet, N., Durussel, C., Bille, J., Glaouse , M.P., and Chave, J.P. 1993. Correlation between in vitro susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistance oropharyngeal Candidiasis in HIV-infected patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 12:911-5.

32.White, A., Goetz, M.B., 1994. Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. Clinical Infectious Diseases, 19(4): 687-92.

33.Zarei, A., Dabbagh, M., and Fouladi, Z. 2006. In-vitro anticandida activity of *Zataria multiflora* Boiss. *eCAM*, 1 – 3.