

بررسی اثرات ضد قارچی عصاره آبی-الکلی میوه واکسینیوم آرکتوستافیلوس (سیاه گیل) بر گونه‌های کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا در شرایط آزمایشگاهی

احمد هلاکو^۱، مریم کاظمی^۱، مریم رفیعی راد^{۱*}، مطهره اسکندری^۲

۱- گروه زیست شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

۲- گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

نویسنده مسئول: maryam.rafieirad@iau.ac.ir

مقدمه: کاندیدایازیس طیفی از بیماری‌ها است که شامل عفونت‌های سطحی و مخاطی ساده تا عفونت‌های سیستمیک خطرناک و کشنده می‌باشد. کاندیدا/گلابراتا پس از کاندیدا/آلبیکنس، چهارمین عامل شایع کاندیدایازیس محسوب می‌شود. استفاده بیش از حد از داروهای سنتتیک ضد قارچی منجر به ظهور سویه‌های مقاوم شده است. از سوی دیگر، گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن منابع سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها و متابولیت‌های ثانویه، به عنوان جایگزین‌های ایمن و مقرون‌به‌صرفه برای داروهای شیمیایی مطرح هستند. **هدف:** هدف این مطالعه بررسی اثر ضد قارچی عصاره میوه سیاه گیل بر گونه‌های کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا بود. **روش کار:** میوه سیاه گیل پس از خشک‌شدن، در متانول ۸۵٪ حل شد و عصاره آن از صافی عبور داده شد. سپس اثر عصاره به روش میکرودايلوشن در رقت‌های ۲ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر گونه‌های استاندارد کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا در چاهک‌های میکروپلیت ارزیابی شد. **نتایج:** نتایج نشان داد که عصاره سیاه گیل دارای اثر مهاري بر رشد هر دو گونه کاندیدا است. حداقل غلظت مهاري (MIC) عصاره برای کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا به ترتیب ۳۲ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین، حداقل غلظت کشندگی (MFC) برای کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا به ترتیب ۱۲۵ و ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به اثر مهاري قابل توجه عصاره سیاه گیل بر هر دو گونه کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا، این عصاره می‌تواند به عنوان یک عامل ضد قارچی موثر در شرایط آزمایشگاهی معرفی شود. انجام مطالعات بالینی برای ارزیابی بیشتر اثرات ضد قارچی این عصاره توصیه می‌گردد.

کاندیدایازیس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، عصاره سیاه گیل

مقدمه:

برای درمان عفونت‌های قارچی مورد استفاده قرار گیرند. یکی از گیاهان دارویی مورد توجه، سیاه گیل به نام علمی *Vaccinium arctostaphylos*، گیاهی از خانواده Ericaceae است که به طور گسترده در مناطق جنگلی و کوهستانی اروپا، آسیا و به ویژه گیلان یافت می‌شود. این گیاه به دلیل خواص دارویی و تغذیه‌ای بالا، از دیرباز در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته است. میوه‌های این گیاه به رنگ سیاه یا بنفش تیره بوده و حاوی ترکیبات فعال زیستی متعددی هستند که آن را به یک منبع ارزشمند برای تحقیقات علمی تبدیل کرده‌اند. میوه این گیاه حاوی ترکیبات فنولی به ویژه سیانوزیدها، آنتوسیانین‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه است که می‌توانند در مهار رشد قارچ‌ها مؤثر باشند (5). با توجه به پتانسیل بالای گیاهان دارویی در کنترل عفونت‌های قارچی و نیاز به یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید، این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد قارچی عصاره میوه سیاه گیل به گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* انجام شد.

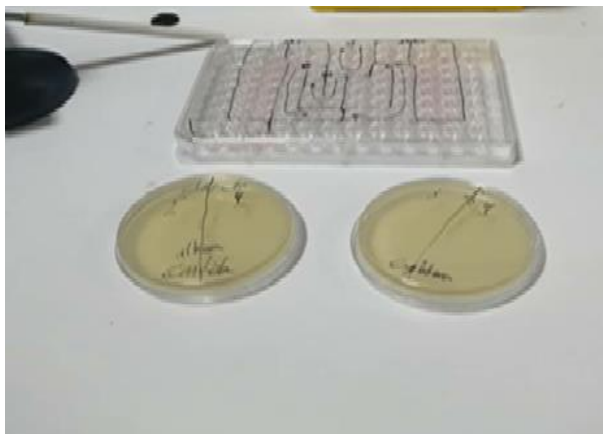
روش کار:

این مطالعه بصورت تجربی است. میوه سیاه گیل به در تابستان ۱۴۰۱ از رویشگاه بومی آن در شمال ایران جمع‌آوری شد. برای افزایش دقت نتایج، از سویه‌های استاندارد و خالص قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* استفاده شد که از سازمان ملی استاندارد و سازمان پژوهش‌ها تهیه شده بودند. جهت ارزیابی حساسیت دارویی قارچ‌ها، از روش میکروالدولشن (ریز رقت) استفاده گردید.

تهیه و آماده‌سازی عصاره گیاه:

کاندیدایزیس یکی از شایع‌ترین عفونت‌های قارچی در انسان است که توسط گونه‌های مختلف جنس *کاندیدا* ایجاد می‌شود. این عفونت‌ها می‌توانند از عفونت‌های سطحی و موضعی (مانند برفک دهانی و عفونت‌های پوستی) تا عفونت‌های سیستمیک و تهاجمی (مانند کاندیدایزیس منتشر و عفونت‌های جریان خون) گسترده باشند. *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) به عنوان شایع‌ترین عامل کاندیدایزیس شناخته می‌شود، اما در سال‌های اخیر، گونه‌های غیرآلبیکنس مانند *کاندیدا گلابراتا* (*Candida glabrata*) نیز به دلیل افزایش مقاومت دارویی و شیوع بیشتر، اهمیت بالایی پیدا کرده‌اند. (1) *کاندیدا گلابراتا* به عنوان چهارمین عامل شایع کاندیدایزیس، به ویژه در بیماران با نقص سیستم ایمنی و افرادی که تحت درمان‌های طولانی‌مدت با داروهای ضد قارچی هستند، مطرح است. (2). استفاده گسترده و گاه بی‌رویه از داروهای ضد قارچی سنتتیک مانند آزول‌ها (مانند فلوکونازول و پلی‌ن‌ها) مانند آمفوتریسین (B) منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به این داروها شده است. مقاومت دارویی در گونه‌های *کاندیدا* نه تنها اثربخشی درمان‌های رایج را کاهش داده، بلکه هزینه‌های درمانی و مدت زمان بستری بیماران را نیز افزایش داده است (۳). این مسئله لزوم یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید و ایمن را بیش از پیش آشکار می‌سازد. گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال زیستی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه، به عنوان منابعی غنی و امیدوارکننده برای توسعه داروهای ضد قارچی طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند (4). این ترکیبات نه تنها دارای خواص ضد میکروبی قوی هستند، بلکه عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند و می‌توانند به عنوان جایگزین‌های ایمن و مقرون‌به‌صرفه

آماده کردن سوسپانسیون نیم مک فارلند میکروبی هر دو مخمر، تهیه استوک عصاره گیاهی و ساخت محیط کشت RPMI-1640 موپس دار بدون بی کربنات، ارزیابی رقت های مختلف عصاره بر مخمر صورت گرفت (۷).



شکل ۱- تهیه و آماده سازی سوسپانسیون با استفاده مستقیم از کلنی (Direct Colony Suspension Method)

رقت سازی عصاره و تلقیح با مخمرها:

برای ارزیابی اثر رقت های مختلف عصاره بر مخمرها به روش میکروداویشن، از پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه ای استفاده شد. چاهک های ۱ تا ۹ برای رقت های مختلف عصاره و چاهک های ۱۰ و ۱۱ به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. ابتدا محیط کشت RPMI موپس دار بدون بی کربنات با سرم فیزیولوژی رقیق شد و ۵۰ میکرولیتر از آن به چاهک های ۱ تا ۹ اضافه گردید. سپس از محلول عصاره ۱ میلی گرم بر میلی لیتر، ۵۰ میکرولیتر به چاهک اول اضافه و با انجام رقت های متوالی، غلظت های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۳، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر ایجاد شد. به چاهک ۱۰ (کنترل مثبت) فقط محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی و به چاهک ۱۱ (کنترل منفی) فقط سوسپانسیون میکروبی

میوه سیاه گیله پس از جمع آوری در معرض هوا خشک و سپس با آسیاب برقی به پودر تبدیل شد. ۱۰۰ گرم از این پودر با ۵۰۰ میلی لیتر متانول ۸۵٪ به روش خیساندن (ماسراسیون) به مدت سه روز در دمای اتاق و همراه با همزدن های متوالی فرآوری شد. پس از این مدت، مخلوط از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۲۲ فیلتر شد تا مواد جامد جدا شوند. عصاره به دست آمده در سینی استریل خشک و به پودر تبدیل شد. این پودر در ظرف شیشه ای دربسته در یخچال نگهداری و برای تهیه غلظت های مختلف مورد استفاده قرار گرفت (۶).

تهیه و آماده سازی استوک عصاره گیاه سیاه گیله

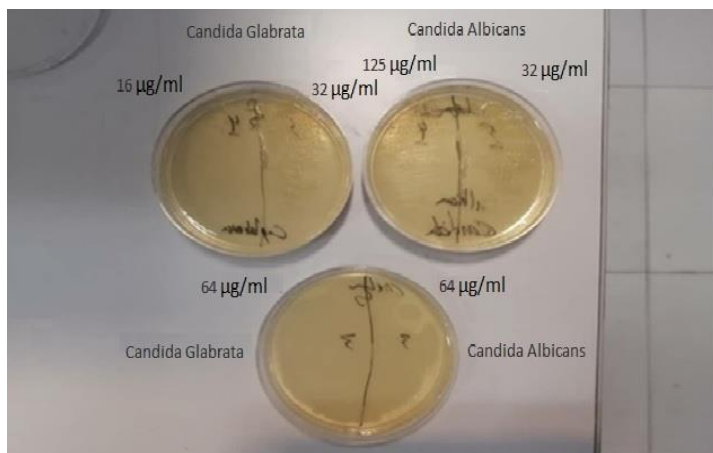
۲ گرم از پودر خشک عصاره گیاه سیاه گیله را در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI - 1640 مخلوط کرده و در حدود ۳ تا ۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده تا پودر در محلول حل شد. ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره بدست آمد که ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از آن توزین شد و وزن آن یادداشت شد که حدود ۰/۸ میلی گرم بود.

تهیه سوبه مخمر

مخمر *کاندیدا آلبیکنس* و *گلبراتا* به صورت لیوفلیزه از سازمان ملی استاندارد تهیه شدند. سپس مقداری از پودر مخمرها را به دو لوله ی آزمایشگاهی که هر کدام حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت سابرو دکستروز آگار بودند، منتقل شدند و به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از ۳ روز رشد مخمرها از لحاظ ایجاد کدورت بررسی شد و به پلیت های حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار منتقل و به صورت خطی کشت داده شدند. بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه قرار داده شدند تا کلنی های مخمرها تشکیل شوند. پس از کشت مخمرها و

آلبیکنس، MIC برابر با ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر و برای کاندیدا گلابراتا، MIC برابر با ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC)، از چاهک‌های مربوط به MIC و رقت‌های بالاتر (۶۴ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای کاندیدا آلبیکنس و ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای کاندیدا گلابراتا) نمونه‌برداری شد و بر روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار (SDA) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند تا حضور یا عدم حضور کلنی‌های زنده مخمر بررسی شود. MFC به‌عنوان کمترین غلظتی که هیچ رشد مخمری مشاهده نشد، تعیین گردید. پس از مشاهده کلنی‌های تشکیل شده در رقت‌های مختلف بر روی پلیت‌ها، حداقل غلظت قارچ کشی یا

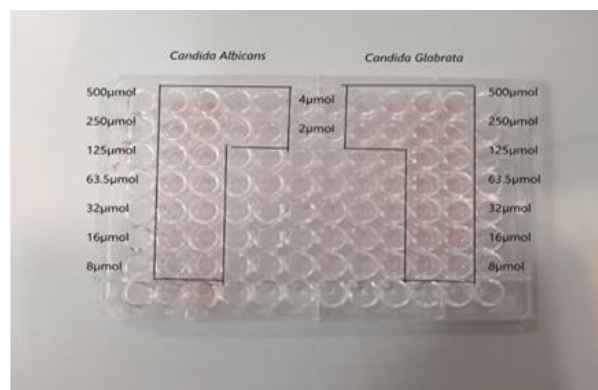
MFC (Minimum fungicidal concentration) بررسی شد و پس از اتمام آزمایش نتایج تجزیه و تحلیل شدند. و با استانداردهای CLSI مقایسه شدند (۸).



شکل ۳- کشت مخمرها در محیط کشت سابرو دکستروز آگار و تشکیل کلنی‌ها

پس از جمع‌آوری اطلاعات مورد نیاز جهت تحلیل یافته‌ها از آزمون T Test استفاده شد.

اضافه شد. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون کاندیدا آلبیکنس به تمام چاهک‌ها، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در کنترل مثبت باید کدورت (رشد مخمر) و در کنترل منفی شفافیت (عدم رشد) مشاهده شد. این فرآیند دو بار تکرار گردید. در سمت دیگر میکرو پلیت تمام مراحل بالا برای گونه کاندیدا گلابراتا انجام داده شد و یک بار دیگر تکرار شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بعد از گذشت این مدت انکوباسیون میزان کدورت محیط‌ها و جذب نوری آنها بوسیله دستگاه پلیت ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد



شکل ۲- پلیت میکروتیتراسیون ۹۶ خانه ای

ارزیابی نتایج و تعیین MIC و MFC

پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تغییرات رشد مخمرها در چاهک‌ها بررسی شد. کدورت چاهک‌ها با چاهک کنترل مثبت (رشد مخمر) و شفافیت با چاهک کنترل منفی (عدم رشد) مقایسه گردید. نتایج بر اساس استانداردهای CLSI (به‌عنوان استاندارد طلایی در ایالات متحده) تحلیل شدند. حداقل غلظت مهاری (MIC) به‌عنوان آخرین چاهکی که هیچ کدورتی (رشدی) مشاهده نشد، تعیین شد. برای کاندیدا

نتایج

بررسی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه سیاه گیله بر کاندیدا آلبیکنس:

یافته‌های این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه سیاه گیله تأثیر متفاوتی بر رشد کاندیدا آلبیکنس دارد. در رقت‌های پایین‌تر (۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، جذب نوری بیشتری مشاهده شد که نشان‌دهنده رشد بیشتر مخمر بود. در مقابل، در رقت‌های بالاتر (۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، جذب نوری کاهش یافت که نشان‌دهنده مهار رشد مخمر بود. حداقل غلظت مهاری (MIC) برای

کاندیدا آلبیکنس ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد، زیرا این کمترین غلظتی بود که رشد مخمر را به‌طور کامل مهار کرد. حداقل غلظت کشندگی (MFC) نیز ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد، زیرا این غلظت باعث کاهش ۹۰ درصدی تشکیل کلنی‌های مخمر شد جدول (۴-۱). نتایج نشان داد که با کاهش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی آن بر رشد مخمر کاهش می‌یابد. این یافته‌ها در دو تکرار آزمایش تأیید شدند و اعداد به‌دست‌آمده بسیار مشابه بودند. این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل عصاره متانولی میوه سیاه گیله به‌عنوان یک عامل ضد قارچی مؤثر علیه کاندیدا آلبیکنس است.

جدول (۴-۱)، تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر قارچ کاندیدا آلبیکنس

چاهک	1	2	3	4	5	6	7	8	9
غلظت (µg/ml)	500	250	125	63.5	32	16	8	4	2
میزان جذب	0.08	0.06	0.06	0.07	0.08	0.2	0.25	0.28	0.3

بررسی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه سیاه گیله بر کاندیدا گلابراتا:

یافته‌های این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه سیاه گیله تأثیر متفاوتی بر رشد کاندیدا گلابراتا دارد. در رقت‌های پایین‌تر (۲، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، جذب نوری بیشتری مشاهده شد که نشان‌دهنده رشد بیشتر مخمر بود. در مقابل، در رقت‌های بالاتر (۱۶، ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، جذب نوری کاهش یافت که نشان‌دهنده مهار رشد مخمر بود. حداقل غلظت مهاری

(MIC) برای کاندیدا گلابراتا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد، زیرا این کمترین غلظتی بود که رشد مخمر را به‌طور کامل مهار کرد. حداقل غلظت کشندگی (MFC) نیز ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد، زیرا این غلظت باعث کاهش ۹۰ درصدی تشکیل کلنی‌های مخمر شد. نتایج نشان داد که با کاهش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی آن بر رشد مخمر کاهش می‌یابد. این یافته‌ها مشابه نتایج به‌دست‌آمده برای کاندیدا آلبیکنس بود و نشان‌دهنده پتانسیل عصاره متانولی میوه سیاه گیله به‌عنوان یک عامل ضد قارچی مؤثر علیه کاندیدا گلابراتا است.

جدول (۴-۲)، تاثیر غلظت های مختلف عصاره بر قارچ کاندیدا گلابراتا

چاهک	1	2	3	4	5	6	7	8	9
غلظت ($\mu\text{g/ml}$)	500	250	125	63.5	32	16	8	4	2
میزان جذب	0.08	0.08	0.06	0.06	0.07	0.07	0.25	0.27	0.3

مقایسه تاثیر عصاره بر مخمرهای کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

MIC90 در رقت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. این نتایج نشان دهنده حساسیت بیشتر کاندیدا گلابراتا نسبت به کاندیدا آلبیکنس به عصاره متانولی میوه سیاه گیل بود، زیرا کاندیدا گلابراتا در غلظت های پایین تر (۱۶ و ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر) مهار و کشته شد.

به طور کلی، این یافته ها نشان می دهد که عصاره متانولی میوه سیاه گیل پتانسیل ضد قارچی قوی تری علیه کاندیدا گلابراتا نسبت به کاندیدا آلبیکنس دارد. این نتایج می تواند در توسعه درمان های طبیعی و ایمن برای عفونت های ناشی از این گونه های قارچی مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی میوه سیاه گیل تاثیر متفاوتی بر دو گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا دارد. برای کاندیدا آلبیکنس، MIC50 (غلظتی که باعث کاهش ۵۰ درصدی رشد کلنی ها می شود) در رقت ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC90 (غلظتی که باعث کاهش ۹۰ درصدی رشد کلنی ها می شود) در رقت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. حداقل غلظت کشندگی (MFC) نیز در رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده گردید. در مورد کاندیدا گلابراتا، MIC50 در رقت ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر و

جدول (۴-۳)، مقایسه MIC و MFC، دو مخمر کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

MFC($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	MIC 90	MIC 50	
125	64	32	کاندیدا آلبیکنس
64	32	16	کاندیدا گلابراتا

تعیین میزان غلظت عصاره گیاه در هر رقت

لیتر از محلول ۸۰۰ ($\mu\text{g/ml}$) می باشد. پس در غلظت ۱/۲ (۵۰۰ ($\mu\text{g/ml}$))، غلظت عصاره ۴۰۰ ($\mu\text{g/ml}$) بدست آمد. بدین ترتیب برای سایر چاهک های تلقیح شده، غلظت عصاره موجود در آن محاسبه شدند. جدول (۴-۴)، غلظت عصاره را در رقت های مختلف نشان می دهد.

از آنجایی که وزن ۱ میلی لیتر از محلول عصاره گیاه تلقیح شده، ۰/۸ میلی گرم بوده است و از طرفی هر میلی لیتر ۱۰۰۰ میکرولیتر می باشد و هر میلی گرم ۱۰۰۰ میکروگرم می باشد بنابر این غلظت عصاره در یک میلی

جدول (۴-۴) تعیین غلظت عصاره میوه سیاه گیله در رقت های مختلف برای کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

غلظت ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
رقت عصاره ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	500	250	125	63.5	32	16	8	4	2
غلظت عصاره موجود در رقت ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.562

نتایج جدول بالا نشان دادند که در کمترین رقت موثر بر مهار مخمرها (MIC)، غلظت عصاره موجود برای کاندیدا آلبیکنس ۲۵ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)، و برای کاندیدا گلابراتا ۱۲/۵ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) می باشد.

مهاری (MIC) برای کاندیدا آلبیکنس ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر و برای کاندیدا گلابراتا ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود. این نتایج نشان دهنده حساسیت بیشتر کاندیدا گلابراتا نسبت به کاندیدا آلبیکنس به عصاره است. این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در ساختار دیواره سلولی، متابولیسم و مکانیسم های مقاومت این دو گونه باشد (۱) کاندیدا گلابراتا به طور کلی نسبت به بسیاری از داروهای ضد قارچی مانند فلوکونازول مقاوم تر است با این حال، در این مطالعه، این گونه نسبت به کاندیدا آلبیکنس حساسیت بیشتری به عصاره متانولی میوه سیاه گیله نشان داد. این یافته ممکن است به دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی خاص در عصاره باشد که به طور انتخابی بر مکانیسم های حیاتی کاندیدا گلابراتا تأثیر می گذارند. مطالعات پیشین نیز نشان داده اند که ترکیبات فنولی و آنتوسیانین های موجود در میوه های خانواده *Ericaceae* (مانند سیاه گیله) دارای خواص ضد میکروبی قوی هستند (۹)

همچنین در کمترین رقت موثر بر مرگ مخمرها (MFC) ، غلظت عصاره موجود برای کاندیدا آلبیکنس ، ۱۰۰ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) و برای کاندیدا گلابراتا ۵۰ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)، میباشد. بنابراین کاندیدا گلابراتا در غلظت پایین تر از کاندیدا آلبیکنس از بین میرود. و میزان عصاره دارویی کمتری برای مهار و مرگ مخمر نیاز است.

بحث

نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات ضد قارچی قابل توجه عصاره متانولی میوه سیاه گیله (*Vaccinium arctostaphylos*) بر دو گونه مهم قارچی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا است. این یافته ها با توجه به افزایش مقاومت دارویی در گونه های کاندیدا و نیاز به یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید و ایمن، از اهمیت بالایی برخوردار هستند. در ادامه، این نتایج در چارچوب مطالعات پیشین و مکانیسم های احتمالی اثر عصاره مورد بحث قرار می گیرند. عصاره متانولی میوه سیاه گیله در این مطالعه به طور معناداری رشد هر دو گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا را مهار کرد. حداقل غلظت

افزایش مقاومت دارویی در گونه‌های قارچی کاندیداها، نیاز به توسعه ترکیبات ضد قارچی جدید را بیش آشکار ساخته است و استفاده از داروهای ضد قارچ در درمان بیماری‌های قارچی می‌تواند منجر به ایجاد مقاومت ضد قارچی شود (۲). عصاره متانولی میوه سیاه گیله به دلیل اثرات ضد قارچی قوی و ایمنی نسبی، می‌تواند به عنوان یک جایگزین طبیعی برای داروهای شیمیایی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. با این حال، انجام مطالعات بالینی برای ارزیابی سمیت، فارماکوکینتیک و اثربخشی این عصاره در مدل‌های حیوانی و انسانی ضروری است. این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی میوه سیاه گیله دارای اثرات ضد قارچی قوی علیه *آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* است. کاندیدا گلابراتا حساسیت بیشتری نسبت به کاندیدا آلبیکنس به این عصاره نشان داد. احتمالاً ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره ممکن است مسئول این اثرات باشند. با توجه به افزایش مقاومت دارویی در گونه‌های کاندیدا، عصاره میوه سیاه گیله می‌تواند به عنوان یک گزینه امیدوارکننده برای توسعه درمان‌های ضد قارچی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره میوه سیاه گیله ممکن است با ایجاد اختلال در ساختار دیواره سلولی و غشای سلولی قارچ، نفوذپذیری غشا را افزایش داده و منجر به مرگ سلولی شوند (۱۰). همچنین، این ترکیبات ممکن است با مهار آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم قارچی، مانند آنزیم‌های مرتبط با سنتز ارگوسترول (جزء ضروری غشای سلولی قارچ)، اثر ضد قارچی خود را اعمال کنند (۱۱؛ ۱۲). علاوه بر این، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره ممکن است با کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌های قارچی، رشد آن‌ها را مهار کنند (۱۳).

مطالعات متعددی اثرات ضد قارچی گیاهان دارویی را بررسی کرده‌اند. به عنوان مثال، عصاره‌های گیاهانی مانند اکالیپتوس، آویشن و مریم‌گلی نیز اثرات ضد قارچی قوی علیه گونه‌های کاندیدا نشان داده‌اند (۱۴؛ ۱۵). در مطالعه‌ای توسط Furletti و همکاران (۲۰۱۱)، عصاره‌های گیاهی مانند گشنیز (*Coriandrum sativum*) فعالیت ضد قارچی قوی علیه کاندیدا آلبیکنس نشان دادند (۱۶). شروع و شدت عفونت قارچی به بار تلقیح، وضعیت ایمنی و مقاومت میزبان بستگی دارد. روغن‌های گیاهی می‌توانند یکی از امیدوارکننده‌ترین نتایج محصولات طبیعی برای مهار قارچ را نشان دهند (۱۷). در واقع، بسیاری از انواع عصاره‌های به دست آمده از گیاهان یا گیاهان مختلف، خواص ضد قارچی شدیدی از خود نشان داده‌اند (۱۷؛ ۱۸). این نتایج با یافته‌های حاضر همخوانی دارد و نشان می‌دهد که ترکیبات گیاهی می‌توانند به عنوان جایگزین‌های طبیعی برای داروهای شیمیایی ضد قارچی مورد استفاده قرار گیرند.

منابع :

۱. Pfaller M.A, Diekema D.J. 2002. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 40:3551-7
۲. Sanglard D. 2016. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med (Lausanne)* 3:11
۳. Cowen L.E, Sanglard D, Howard SJ, Rogers P.D, Perlin D.S. 2014. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5:a019752
۴. Raut J.S, Shinde R.B, Chauhan N.M, Karuppayil S.M. 2013. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling* 29:87-96
۵. Jalal O, Samaneh A, Mehdi B. 2021. A review of the medicinal plant *Vaccinium arctostaphylos* and its applications. *J. Plant Biotechnol.* 16:63-72
۶. Mahmoudi R, Rafieirad M, Goudarzi S. 2018. Effect of Hydroalcoholic Extract of *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss on Motor and Memory Disorders in Animal Model of Parkinson Disease. *Qom Univ. Med. Sci. J.* 12:36-47
۷. Yahyapour ,Anvar S.A.A, Ataee M , AhariH. .۲۰۲۳. ح Isolation and optimization of growth conditions of yeasts with aflatoxin B1 reducing properties from local cheeses in Iran. *J Comp Pathol.* 19:3983-92
۸. Haji Fattahi F, Alirezaei, Somayeh, Goodarzi ,Hossein, Khalesi M.A. 2019. Investigation of antifungal effect of aqueous extract of garlic on *Candida albicans* (INVITRO). *J. Dent. Res.* 16:20-6
۹. Sepehrifar R, Hasanloo T. 2010. Polyphenolics, Flavonoids and Anthocyanins Content and Antioxidant Activity of Qare-Qat (*Vaccinium arctostaphylos* L.) from Different Areas of Iran. *Journal of Medicinal Plants.* 9:66-74
۱۰. Shamilov A.A, Olennikov D.N, Pozdnyakov D.I, Bubenchikova V.N, Garsiya E.R, Larskii M.V. 2022. Caucasian Blueberry: Comparative Study of Phenolic Compounds and Neuroprotective and Antioxidant Potential of *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium arctostaphylos* Leaves. *Life (Basel)* 12
۱۱. Zhou X, Zeng M, Huang F, Qin G, Song Z, Liu F. 2023. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect. *Appl Microbiol Biotechnol.* 107:4471-92
۱۲. Eliaš D, Tóth Hervay N, Gbelská Y. 2024. Ergosterol Biosynthesis and Regulation Impact the Antifungal Resistance and Virulence of *Candida* spp. *Stresses* 4:641-62
۱۳. El Moussaoui A, Jawhari F.Z, Almehdi A.M, Elmsellem H, Fikri

- Benbrahim K, et al. 2019. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens*.L. Bioorg Chem. 93:103337
۱۴. Shafaroudi A.M, Gorji N.E, Nasiri P, Javidnia J, Saravi M.E. 2022. Antifungal Properties of *Zataria multiflora* on *Candida* species: A Systematic Review. JEBIM. 27:2515690X221132272
۱۵. Naeini A.R, Naseri M, Kamalinejad M, Khoshzaban F, Rajabian T, et al. 2011. Study on Anti_ *Candida* Effects of Essential Oil and Extracts of Iranian Medicinal Plants, In vitro. Journal of Medicinal Plants 10:163-72
۱۶. Furletti V.F, Teixeira I.P, Obando-Pereda G, Mardegan R.C, Sartoratto A, et al. 2011. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. eCAM. 2011:985832
۱۷. Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. Food Chem 220:1-8
۱۸. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo V. 2017. Essential Oils and Antifungal Activity. J. Pharm. (Basel) 10

Evaluation of the Antifungal Effects of *Vaccinium arctostaphylos* (Blackberry) Fruit Hydroalcoholic Extract on *Candida albicans* and *Candida glabrata* under Laboratory Conditions

Ahmad Holakou¹, Maryam Kazemi¹, Maryam Rafieirad^{1*}, Motahareh Eskandari²

1- Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran

2-Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

•Corresponding Author: maryam.rafieirad@iau.ac.ir

Abstract

Candidiasis encompasses a spectrum of diseases, ranging from superficial and mucosal infections to severe and life-threatening systemic infections. *Candida glabrata* is the fourth most common cause of candidiasis after *Candida albicans*. The overuse of synthetic antifungal drugs has led to the emergence of resistant strains. On the other hand, medicinal plants, rich in antioxidants and secondary metabolites, are considered safe and cost-effective alternatives to chemical drugs.

This study aimed to investigate the antifungal effects of *Vaccinium arctostaphylos* (blackberry) fruit extract on *Candida albicans* and *Candida glabrata*.

The blackberry fruits were dried, dissolved in 85% methanol, and filtered to obtain the extract. The antifungal activity of the extract was evaluated using the microdilution method at concentrations ranging from 2 to 500 µg/mL against standard strains of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in microplate wells.

The results demonstrated that the extract inhibited the growth of both *Candida* species. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract for *Candida albicans* and *Candida glabrata* was 32 and 16 µg/mL, respectively. Additionally, the minimum fungicidal concentration (MFC) for *Candida albicans* and *Candida glabrata* was 125 and 64 µg/mL, respectively.

Given the significant inhibitory effects of *Vaccinium arctostaphylos* extract on both *Candida albicans* and *Candida glabrata*, this extract can be introduced as an effective antifungal agent under laboratory conditions. Further clinical studies are recommended to evaluate its antifungal potential.

Key Word: Candidiasis, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, Blackberry extract