

بررسی برون تنی اثرات ضدقارچی عصاره‌های تام اندام هوایی گیاه اُرمک کبیر (*Ephedra major* Host) بر روی قارچ میکروسپوروم جیپسئوم

علی میکائیلی^۱، مسعود مدرسی^۲، کورش مظفری^۳

۱. دانشیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات دارورسانی نوین، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (مؤلف

مسئول). تلفن: ۰۸۳-۳۴۲۷۶۴۸۲، mmodarresi@kums.ac.ir

۳. دانشجوی مقطع دکتری، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: درمانوفیتوزیس نوعی عفونت قارچی است که در آن سطوح خارجی بدن انسان و حیوانات توسط درمانوفیت‌ها مورد تهاجم قرار می‌گیرند. استفاده از داروهای ضد درمانوفیت موجود به علت عوارض جانبی و مقاومت‌های دارویی، دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. لذا امروزه گیاهان دارویی بعنوان منابع جدید تهیه داروهای ضدقارچ مطرح هستند. اُرمک کبیر یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد که اثرات ضدقارچی آن علیه برخی از قارچ‌ها گزارش شده است. در این پژوهش اثر ضدقارچی این گیاه علیه قارچ میکروسپوروم جیپسئوم مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: از اندام هوایی خشک شده گیاه، عصاره‌های تام آبی و هیدروالکلی تهیه شد. اثرات ضدقارچی این عصاره‌ها علیه قارچ میکروسپوروم جیپسئوم به دو روش رقیق‌سازی در آگار و انتشار دیسک بررسی گردید. در این پژوهش، از تربینافین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. کشت‌ها در پایان هفته دوم مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج روش رقیق‌سازی در آگار و انتشار دیسک برتر تب بصورت حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و اندازه قطر هاله عدم رشد ثبت گردیدند.

یافته‌ها: در روش رقیق‌سازی در آگار، تنها عصاره آبی با MIC مساوی ۱۰ mg/ml از خود اثر ضدقارچی نشان داد اما در روش انتشار دیسک در کلیه غلظت‌های تهیه شده از هر دو عصاره، مهار رشدی مشاهده نشد. ضمناً MIC تربینافین برای میکروسپوروم جیپسئوم ۰/۵ µg/ml تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که عصاره تام آبی اندام هوایی گیاه اُرمک کبیر دارای فعالیت ضددرمانوفیتی علیه قارچ میکروسپوروم جیپسئوم می‌باشد، اما قدرت اثر این عصاره قابل مقایسه با تربینافین نیست. این احتمال وجود دارد که با خالص‌سازی بیشتر عصاره آبی این گیاه، بتوان ترکیباتی با اثرات ضددرمانوفیتی شاخص بدست آورد.

کلید واژه‌ها: اُرمک کبیر، اندام هوایی، اثرات ضددرمانوفیتی، میکروسپوروم جیپسئوم.

وصول مقاله: ۹۳/۴/۲۴ اصلاحیه نهایی: ۹۳/۱۱/۲۷ پذیرش: ۹۴/۱/۱۷

مقدمه

شیوع عفونتهای قارچی سطحی در چند دهه اخیر افزایش پیدا نموده است، بطوریکه در حال حاضر ۲۵-۲۰ درصد جمعیت جهان متأثر از این عفونت‌ها هستند (۱). درماتوفیتوزیس یا کچلی شایعترین عفونت قارچی پوستی می‌باشد که بوسیله درماتوفیت‌ها ایجاد می‌شود (۵-۲). این بیماری یکی از مسائل مهم درمانی ایران و جهان می‌باشد (۲). از لحاظ بالینی عفونتهای درماتوفیتی عامل بروز هفت نوع کچلی شامل کچلی های سر، بدن، کشاله ران، پا، دست، ریش و ناخن می‌باشند (۶). درماتوفیتوزیس با توجه به علائم و عوارضی که سبب می‌شود همواره برای انسانها مسائلی چون درد و رنج، ناتوانی، اتلاف وقت و هزینه سنگین درمان را به همراه داشته و در حیوانات نیز عفونت‌های ناشی از درماتوفیت‌ها علاوه بر آزار موجودات، خسارات فراوانی را در صنعت دامپروری موجب شده است (۷و۸).

بطورکلی درماتوفیت‌ها به سه جنس *تریکوفیتون*، *میکروسپوروم* و *ایلدروموفیتون* تقسیم‌بندی می‌شوند (۹). درماتوفیت‌ها همچنین بر اساس زیستگاه اصلی خود، به سه دسته خاک‌دوست، حیوان‌دوست و انسان‌دوست طبقه‌بندی شده‌اند. *میکروسپوروم* جیستوم درماتوفیتی خاک‌دوست با انتشار جهانی می‌باشد که در انسان و حیوان کچلی سر، بدن و گاه کچلی پا و کشاله ران را ایجاد می‌نماید (۱۰).

به دلیل اهمیت بهداشتی و اقتصادی درماتوفیتوزیس، پیشگیری از این بیماری و درمان آن امری ضروری بنظر می‌رسد. در گذشته برای درمان درماتوفیتوزیس از درمانهای موضعی از قبیل پمادهای حاوی جیوه، مس، محلول ید، فرآورده‌های حاوی سولفور، اسید سالیسیلیک، بوریک اسید، بنزوتیک اسید، تیمول، اشعه-X (درمان فوری کچلی سر) و ... استفاده می‌شده است (۱۲و۱۱). درحال حاضر برای درمان اشکال مختلف درماتوفیتوزیس از آزول‌ها

(ایمیدازول‌ها و تری‌آزول‌ها)، آلایل آمین‌ها (ترینافین و نفتی فین)، گریزئوفلوین، سیکلوپیروکس، بوتنافین، تولفتات و آمورولفین کمک گرفته می‌شود (۱۳). از میان این داروها، ترینافین بعنوان یکی از مؤثرترین داروهای ضدقارچ مطرح می‌باشد (۱۴). هر چند داروهای جدید، خطرات درمانهای گذشته از قبیل پرتودرمانی (خطر ابتلا به سرطانهای پوستی) را ندارند (۱۵)، اما چالش‌های بسیاری، فراوی این داروها قرار دارد. اغلب اوقات درمان بیماریهای قارچی مشکل است، زیرا قارچها یوکاریوت بوده و دارای ژن‌ها و محصولات ژنی مشابه میزبان‌های انسانی (یوکاریوت) خود می‌باشند که این تشابهات زیاد، سبب تحت تأثیر قرار گرفتن سلولهای بافتهای سالم بیمار توسط داروهای ضدقارچ و ایجاد عوارض جانبی فراوان می‌شود (۱۷و۱۶). در نتیجه برخلاف وجود داروهای ضدباکتری فراوان، تعداد داروهای ضدقارچ محدود می‌باشند (۱۸). داروهای ضدقارچ موجود عوارض جانبی زیاد و بعضاً خطرناک از خود بروز داده و همچنین دارای تداخلات دارویی فراوان می‌باشند (۲۰و۱۹). علاوه براین، درماتوفیتوزیس نسبت به برخی از این داروها مقاومت پیدا نموده (۲۱) و درمان آن اغلب طولانی مدت و پرهزینه است (۲۲). عود عفونت به‌ویژه در کچلی‌های ناخن و پا، هنوز هم به عنوان یک مسأله باقی‌مانده است. شکست درمان کچلی ناخن نیز بسیار شایع است (۲۳). امروزه چند داروی جدید برای درمان درماتوفیتوزیس در دسترس بوده که متعلق به دو خانواده ضدقارچی اصلی یعنی آزول‌ها و آلایل آمین‌ها هستند (۱۳). بنابراین با توجه به مشکلات داروهای موجود از یک طرف و اهمیت بهداشتی و اقتصادی درماتوفیتوزیس از طرف دیگر، راهی جز تحقیق و پژوهش در جهت کشف، شناسایی و ساخت داروهای ضددرماتوفیت که عاری از مشکلات فوق بوده و یا حداقل برخی از مشکلات داروهای موجود را نداشته باشند، پیش روی محققین قرار ندارد. در همین راستا مطالعات متعددی بر

CM55 از شرکت فن آزماگستر ساخت ایران) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بمدت ۲ هفته کشت داده شد. بمنظور تهیه ماده تلقیح، کونیدی‌های رشد یافته بر سطح محیط کشت توسط محلول نرمال سالین استریل جمع‌آوری شده و پس از عبور دادن از فیلتر واتمن شماره ۴۰، به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (با نام APEL مدل PD-303UV ساخت ژاپن) غلظت نهایی سوسپانسیون میکروبی با رقیق-سازی توسط محلول نرمال سالین استریل، در حد $10^6 \times 1/0$ CFU/ml تنظیم گردید.

تهیه عصاره‌های تام از اندام هوایی گیاه

اندام هوایی گیاه *آرمک* کبیر از منطقه چهارزبر واقع در جاده کرمانشاه به اسلام آبادغرب، در خردادماه جمع‌آوری گردید. گیاه جمع‌آوری شده توسط متخصص گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات منابع طبیعی شهرستان کرمانشاه مورد شناسایی قرار گرفت و یک نمونه از گیاه در هرباریوم دانشکده داروسازی کرمانشاه نگهداری شد. اندام هوایی گیاه پس از جمع‌آوری در سایه خشک گردیده و ساقه‌های سبز آن توسط آسیاب برقی پودر شد. برای تهیه عصاره تام آبی، پودر گیاه به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر درحال جوش مخلوط گردید و به مدت یک ساعت بر روی دستگاه همزن مغناطیسی حرارتی (با نام Heidolph مدل MR Hei-Standard ساخت آلمان) در دمای ۹۰-۸۰ درجه سانتیگراد و سرعت چرخش مناسب قرار داده شد. جهت تهیه عصاره تام هیدروالکلی نیز پودر گیاه به نسبت ۱ به ۱۰ با متانول ۸۰٪ مخلوط گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی دستگاه همزن مغناطیسی با سرعت چرخش مناسب عصاره‌گیری شد. عصاره‌های تام بدست آمده پس از صاف شدن، توسط دستگاه روتاری (با نام Heidolph مدل LABOROTA 4000-efficient ساخت آلمان) تحت خلاء و در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتیگراد خشک گردیده و در نهایت عصاره‌های خشک شده در ظروف

روی اثرات ضددرماتوفیتی گیاهان و اجزاء آنها انجام شده است. گیاهان جنس *افدرا* با نام فارسی ریش بز یا *آرمک*، یکی از قدیمی‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی می‌باشند. گونه‌های متعلق به جنس *افدرا* در طب سنتی در درمان ادم، آرتریت، درد مفاصل و استخوان‌ها، تب، لرز و آسم کاربرد داشته و دارای اثرات ضددردی، ضدویروسی، ضدباکتریایی و ... می‌باشند (۲۴). یکی از مهمترین گونه‌های *افدرا*، گونه *افدرا* *ماژور* یا *آرمک* کبیر می‌باشد (۲۵) که اثر ضدقارچی آن در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است. از جمله قارچ‌هایی که این گیاه علیه آنها اثر داشته است، میکروسپوروم *کانیس* و *تریکوفیتون* *مناگروفیتس* می‌باشد (۲۶). اما اثرات ضدقارچی این گیاه بر روی دیگر درماتوفیت‌های مهم و شایع از قبیل میکروسپوروم *جیسنوم* مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به این موضوع و اهمیت عفونت‌های ناشی از درماتوفیت‌ها و نیز مشکلات داروهای کنونی ضددرماتوفیتوزیس، هدف از این پژوهش بررسی اثرات ضدقارچی گیاه *افدرا* *ماژور* علیه میکروسپوروم *جیسنوم* و دستیابی به یک ماده طبیعی با اثرات ضددرماتوفیتی بود.

روش بررسی

این تحقیق از نوع مطالعه تجربی و آزمایشگاهی بوده و شامل مراحل ذیل می‌باشد.

میکروارگانسیم

میکروارگانسیم استفاده شده در این مطالعه، قارچ میکروسپوروم *جیسنوم* بوده است که با کد PTCC5070 از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتریهای صنعتی ایران (تهران-ایران) خریداری گردید.

تهیه ماده تلقیح میکروارگانسیم

میکروارگانسیم خریداری شده، ابتدا در محیط کشت مایکوبایوتیک آگار (حاوی سیکلوهمگزیمید و کلرامفنیکل، از شرکت Quelab کانادا) در داخل انکوباتور (مدل

شیشه‌ای دربسته تا انجام مراحل بعدی پژوهش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های تام

اثرات ضدقارچی عصاره‌های تام گیاه *آرمک* کبیر بر روی قارچ میکروسپوروم جیپسوم به دو روش انتشار دیسک و رقیق‌سازی در آگار مورد بررسی قرار گرفتند.

الف) روش انتشار دیسک

در ابتدای کار کلیه وسایل شیشه‌ای و فلزی مورد استفاده با قرار گرفتن در داخل آون (با نام Memmert مدل UBN 500 ساخت آلمان) با دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد، به مدت یک ساعت استریل گردیدند و تمامی مراحل کار نیز در کنار شعله و تحت شرایط تمیز انجام شد. با توجه به تست پابلوت و اینکه حلال مرسوم دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) با غلظت‌های مناسب برای حل کردن ترکیبات غیرقطبی و قطبی، خود دارای اثرات ضددرماتوفیتی می‌باشد (۲۷)، عصاره‌های تام آبی و هیدروالکلی خشک، به کمک دستگاه اولتراسونیک (با نام POWER SONIC410 مدل LUC-410 ساخت کره جنوبی) و حرارت ملایم در آب مقطر حل شدند. از عصاره خشک آبی پنج غلظت ۱۰٪، ۵٪، ۲/۵٪، ۱٪ و ۰/۵٪ و از عصاره هیدروالکلی پنج غلظت ۵٪، ۲/۵٪، ۱٪، ۰/۵٪ و ۰/۲۵٪ در آب مقطر، تهیه گردید. برای جلوگیری از ورود آلودگی‌های میکروبی به محیط کشت، محلول‌های تهیه شده از فیلتر میکروبی عبور داده شدند. به کمک سمپلر (با نام Eppendorf مدل Reference 2 ساخت آلمان) تحت شرایط تمیز، ۲۵ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده، به روی دیسک‌های کاغذی با قطر ۶/۴ میلیمتر مخصوص مطالعات میکروبی (از شرکت پادتن طب ساخت ایران) منتقل گردید. پس از خشک شدن، دیسک‌ها در ویال‌های استریل جداگانه درب‌دار بسته بندی شده و تا زمان قرار گرفتن بر روی محیط کشت، در یخچال نگهداری شدند. همچنین دیسک‌های محتوی ۲۵ میکرولیتر آب مقطر نیز بعنوان

کنترل منفی (حلال عصاره‌ها) تهیه گردید. در این پژوهش از تربینافین (از شرکت داروسازی تهران شیمی واقع در تهران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای تهیه محلول تربینافین از DMSO (ساخت شرکت Merck آلمان) استفاده شد (۲۸). بدین منظور ابتدا یک محلول استوک از پودر خالص تربینافین با غلظت ۱ mg/ml در DMSO آماده گردید و سپس به کمک آب مقطر، غلظت ۱ μg/ml از تربینافین تهیه شد. از محلول تربینافین تهیه شده، ۲۵ میکرولیتر بر روی دیسک‌های مربوط به تربینافین منتقل گردید. از غلظت مشابه DMSO (۵ μl/ml) در آب مقطر نیز به عنوان کنترل منفی (حلال تربینافین) جهت تهیه دیسک‌های مربوطه استفاده شد. پلیت‌های حاوی محیط کشت خالص منعقد شده در دمای آزمایشگاه، تهیه گردید و دیسک‌های آماده شده در مراحل قبل را با رعایت برچسب‌ها و با استفاده از پنس، در کنار شعله بر روی محیط کشت منتقل شدند. در هر پلیت چهار دیسک قرار داده شد بطوریکه فواصل دیسک‌ها از یکدیگر تقریباً برابر بوده و فضای پلیت‌ها (پلیت‌های یکبار مصرف مخصوص کشت‌های میکروبی با قطر ۶ سانتیمتر از شرکت فرازین کیمیا ساخت ایران) به چهار قسمت نسبتاً مساوی تقسیم بندی شد. از ماده تلقیح میکروارگانیسم، ۱۰۰ میکرولیتر بر روی هر پلیت انتقال داده و بطور یکسان در سطح محیط کشت پخش گردید. پلیت‌ها بمدت ۲ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. در طی این مدت، سطح پلیت‌ها از نظر رویش کلی قارچ کنترل گردید و نتایج به صورت عدم رشد (به شکل هاله عدم رشد در اطراف دیسک) و یا رشد گزارش شدند. نتایج حاصل از روش انتشار دیسک، بر مبنای ایجاد یا عدم ایجاد هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های قرار داده شده بر روی محیط کشت جامد، استوار می‌باشد. براین اساس، ماده‌ای که هاله عدم رشد با قطر بیشتری ایجاد نماید، اثرات ضدقارچی بیشتری

لازم به ذکر است که کلیه مراحل فوق، برای هر نمونه ۳ مرتبه تکرار شد.

روش گردآوری داده‌ها

در هر دو روش مطالعه اثرات ضدقارچی، نتایج در پایان هفته دوم کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش انتشار دیسک، در صورت مشاهده عدم رشد، اندازه قطر دایره عدم رشد اندازه‌گیری شد و نتایج ۳ بار تکرار هر آزمایش، با کمک نرم‌افزار Excel 2007 بصورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه گردید. در روش رقیق‌سازی در آگار، سطح پلیت‌ها از نظر رویش کلی قارچ کنترل شد و کمترین غلظتی از عصاره که مانع از رشد قارچ شده بود، بعنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) آن عصاره بر علیه قارچ مورد مطالعه ثبت گردید (۲۹).

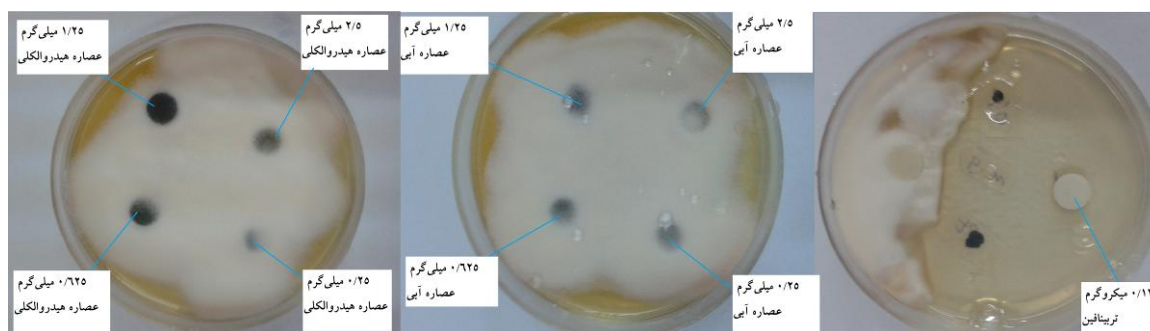
یافته‌ها

نتایج بررسی اثرات ضددرماتوفیتی عصاره‌های تام اندام هوایی گیاه *ارمک* کبیر علیه قارچ میکروسپوروم جیسیسوم در مقایسه با تربینافین به روش انتشار دیسک در شکل ۱ نمایش داده شده است. برطبق این نتایج، پیرامون هیچ‌یک از دیسک‌های حاوی عصاره‌های تام آبی و هیدروالکلی (در غلظت‌های قابل تهیه) هاله عدم رشدی شکل نگرفته است. اما پیرامون دیسک حاوی ۰/۱۲۵ میکروگرم تربینافین هاله عدم رشدی به قطر $4/62 \pm 54$ میلیمتر مشاهده شد. همچنین لازم به ذکر است که حلالهای بکار رفته برای انحلال عصاره‌ها (آب مقطر) و تربینافین (محلول DMSO)، اثرات مهاری بر روی رشد قارچ نداشتند.

داشته و ماده‌ای که هیچ هاله عدم رشدی بوجود نیاورد، فاقد اثرات ضدقارچی می‌باشد. چنانچه هاله عدم رشد در پایان هفته دوم ثابت بماند می‌توان نتیجه گرفت که رشد قارچ مهار شده است. لازم به ذکر است که کلیه مراحل فوق، برای هر نمونه ۳ مرتبه تکرار شد.

ب) روش رقیق‌سازی در آگار

در روش رقیق‌سازی در آگار، از عصاره تام آبی غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی گرم عصاره در میلی لیتر محیط کشت و از عصاره تام هیدروالکلی غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی گرم عصاره در میلی لیتر محیط کشت، تهیه شد. همچنین پلیت‌های کنترل مثبت حاوی تربینافین (با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت) و پلیت‌های کنترل منفی حاوی حلال عصاره‌ها (آب مقطر) و حلال تربینافین (۰/۵ میکرولیتر DMSO در میلی لیتر محیط کشت) تهیه شد. پس از تهیه پلیت‌ها، به همان شیوه مذکور در مرحله انتشار دیسک، ۱۰۰ میکرولیتر از ماده تلقیح میکروارگانیسم، بر روی هر پلیت انتقال داده و بطور یکسان در سطح محیط کشت پخش گردید. پلیت‌ها بمدت ۲ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد کشت داده شدند و درنهایت سطح پلیت‌ها از نظر رویش کلی قارچ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از روش رقیق‌سازی در آگار، بر مبنای تعیین حداقل غلظتی از ماده مورد مطالعه که بتواند باعث مهار رشد میکروارگانیسم در محیط کشت جامد آگار بشود (یعنی حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC)، استوار می‌باشد. لذا بعد از پایان دوره زمانی کشت، مقدار MIC تعیین گردید.



شکل ۱: نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های تام گیاه/ارمک کبیر و تربینافین علیه قارچ میکروسپوروم جیستوم به روش انتشار دیسک

عصاره تام هیدروالکلی در غلظت‌های تهیه شده (و قابل تهیه) هیچگونه اثر ضدقارچی از خود نشان نداد و MIC این عصاره بیشتر از ۱۰ mg/ml در محیط کشت تعیین شد. ضمناً MIC تربینافین برای این قارچ ۰/۵ µg/ml گزارش گردید. لازم به ذکر است که حلالهای بکار رفته برای انحلال عصاره‌ها (آب مقطر) و تربینافین (محلول DMSO)، اثرات مهاری بر روی رشد قارچ نداشتند.

نتایج بررسی اثرات ضددرماتوفیتی عصاره‌های تام اندام هوایی گیاه/ارمک کبیر علیه قارچ میکروسپوروم جیستوم به روش رقیق‌سازی در آگار در جدول ۱ بیان شده است. همچنین در شکل ۲ تصاویری از تأثیرات عصاره آبی بر رشد قارچ آورده شده است. طبق اطلاعات مندرج در جدول ۱ مشخص می‌شود که عصاره آبی با MIC مساوی ۱۰ mg/ml در محیط کشت، علیه قارچ میکروسپوروم جیستوم اثر ضدقارچی از خود نشان داده است درحالی‌که

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های تام گیاه/ارمک کبیر علیه قارچ میکروسپوروم جیستوم به روش رقیق‌سازی در آگار

نوع عصاره تام	غلظت در محیط کشت (mg/ml)	رشد یا عدم رشد قارچ*
عصاره آبی	۱/۲۵	+
	۲/۵	+
	۵	+
	۱۰	-
	۲۰	-
عصاره هیدروالکلی	۰/۶۲۵	+
	۱/۲۵	+
	۲/۵	+
	۵	+
	۱۰	+

* علامت مثبت (+) به معنی رشد قارچ و علامت منفی (-) به معنی عدم رشد قارچ در غلظت مورد نظر می‌باشد (میانگین سه پلیت).



شکل ۲: اثرات ضدقارچی عصاره تام آبی گیاه *آرمک* کبیر علیه میکروسپوروم جیسیئوم در روش رقیق سازی در آگار

بحث

نتایج بدست آمده از دو روش بررسی اثرات ضدقارچی دو عصاره تام، بیانگر آن هستند که هر دو عصاره در روش انتشار دیسک فاقد اثرات ضدقارچی بوده (البته در محدوده مقدار عصاره موجود در دیسک ها) ولی در روش رقیق سازی در آگار، عصاره آبی از خود اثرات ضدقارچی علیه میکروسپوروم جیسیئوم نشان داده است. پس میتوان در مجموع اظهار داشت که عصاره آبی اندام هوایی گیاه *آرمک* کبیر خاصیت ضددرماتوفیتی علیه قارچ مورد مطالعه دارد. همچنین مشخص شد که بدلیل رشد قارچ در غلظت های پایین این عصاره و محیط کشت بدون عصاره، این گیاه بطور وابسته به غلظت باعث مهار رشد قارچ میکروسپوروم جیسیئوم می شود. با مقایسه MIC عصاره آبی *آرمک* کبیر با داروی تربینافین، اختلاف بسیار زیادی در اثرات ضدقارچی آنها مشاهده گردید. در نتیجه، در شرایط آزمایشگاهی عصاره آبی تام گیاه *آرمک* کبیر توانایی رقابت (یا جایگزینی) با تربینافین را ندارد. اما با توجه به داشتن اثر ضدقارچی این عصاره بر روی قارچ میکروسپوروم جیسیئوم و اینکه عصاره مورد استفاده در این مطالعه، عصاره تام بوده و حاوی ترکیبات غیر مؤثره زیادی است، لذا این اختلاف در نتایج به دست آمده برای تربینافین و عصاره آبی *آرمک* کبیر، می تواند مورد انتظار باشد (۱۷). نتایج بررسی اثرات ضدقارچی این گیاه در این طرح با نتایج مطالعات دیگر که همین اثر از گونه های مختلف جنس *فدرا* را مورد بررسی

قرار داده اند، هماهنگی دارد. پناهی و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر ضدقارچی عصاره های متانولی، اتانولی و استونی اندام هوایی گیاه *آرمک* کبیر جمع آوری شده از منطقه البرز را بر روی قارچ های میکروسپوروم کانیس، *تریکوفیتون* *متاگروفیتس* و *کاندیدا آلیکنس* به اثبات رساندند. با توجه به اینکه در آن پژوهش مقادیر MIC براساس مقادیر پودر گیاه بیان شده (۲۶) و در طرح حاضر مقادیر MIC براساس مقادیر عصاره خشک ذکر شده است، مقایسه نتایج آن پژوهش با مطالعه حاضر، عملی و درست نیست. اما برخلاف نتایج پژوهش حاضر، عصاره آبی مورد سنجش توسط پناهی و همکاران فاقد اثر ضدقارچی بود که این خود می تواند توجیهات متعددی داشته باشد. از جمله این توجیهات، اینکه فرآیند جوشاندن در تهیه عصاره آبی در طرح پناهی، میتواند اجزای فعال ضدقارچ را از بین برده باشد (۲۶)، یا اینکه محل برداشت این گونه گیاهی در دو طرح، متفاوت بوده که وجود تفاوت در محل رویش گیاه، خود می تواند بر محتوای شیمیایی گونه ها تأثیرگذار باشد و یا اینکه تفاوت در گونه های قارچی مورد مطالعه وجود دارد و توجیه دیگر آنکه امکان دارد حلال های آلی بکار رفته در تهیه عصاره های غیر آبی طرح پناهی و همکاران، خوب تبخیر نشده باشند و اثر مهاری، مربوط به این حلال ها یا اثر سینرژسم این حلال ها با عصاره ها باشد. در پژوهشی دیگر اثبات گردیده است که عصاره متانولی اندام هوایی و ریشه گیاه *آرمک* کبیر، باعث توقف رشد قارچ *آسپرژیلوس پاراسیتیکوس* شده و بر روی

تولید آفلاتوکسین قارچی اثر مهاری دارد (۳۰). در یک پژوهش Feresin و همکاران اثرات ضد میکروبی چندین گیاه مورد استفاده در طب سنتی آرژانتین از جمله *افدرا برینا* را بر روی تعدادی از قارچها مورد بررسی قرار دادند و در نهایت به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های متانولی، هگزانی و دی‌کلرومتانی گونه مذکور بر علیه قارچهای کریپتوکوکوس *نئوفورمانس*، میکروسپوروم *کانیس*، میکروسپوروم *جیسوم*، *تریکوفیتون* *روبروم*، *تریکوفیتون* *منتاگروفتیس* و *اپیدرموفیتون* *فلوکوزوم* اثری ندارد (۳۱). در طی بررسی فعالیت ضد میکروبی *افدرا آلاتا* در مصر نیز مشخص شده است که در میان عصاره‌های مختلف این گیاه، عصاره استونتریلی قویترین فعالیت ضد میکروبی را داشته و کلیه قارچ‌های مورد بررسی در آن مطالعه (*آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *پنی سیلیوم ایتالیکوم*، *سینسفالاستروم راسموزوم* و *کاندیدا آلیکنس*) را مهار می‌نماید (۳۲). روستائیان و همکاران، فعالیت ضد قارچی عصاره متانولی *افدرا لاریستانیک* و عصاره متانولی *افدار سارکوکاریا* را بررسی نمودند که در نتیجه آن مشخص شد عصاره مذکور از هر دو گیاه، فعالیت ضد قارچی نسبتاً شاخصی را علیه قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *کاندیدا گلابراتا* و *آسپرژیلوس نیجر* نشان می‌دهد (۳۳ و ۳۴). علاوه بر این، پارسایی مهر و همکاران اثرات ضد قارچی کالوس و اندام هوایی سه گونه از جنس *افدرا* (*E. procera*، *E. pachyclada*، *E. strobiliacea*) را بررسی نمودند. طی این تحقیق مشخص گردید که کلیه عصاره‌های متانولی اندام هوایی در مقایسه با محیط کشت کالوس، اثرات ضد قارچی بیشتری دارند. این پژوهش همچنین اثبات نمود که هر سه گونه *افدرا* علیه دو قارچ *آسپرژیلوس نیجر* و *کاندیدا آلیکنس* دارای اثرات مهاری می‌باشند (۳۵). در پژوهشی توسط جمیل و همکاران مشخص شده است که عصاره متانولی ساقه و ریشه *افدرا ژراردیانا* دارای فعالیت

ضد قارچی (هر چند اندک) علیه قارچهای *فوزاریوم مونیلی‌فرم*، *فوزاریوم سولانی*، *آسپرژیلوس نیجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آلترناریا* و *موکور می‌باشد* (۳۶).

با توجه به مطالعات ذکر شده فوق، اثرات ضد قارچی گونه‌های مختلف جنس *افدرا* مشهود می‌باشد. افدها در مناطق وسیعی از جهان پراکنده‌اند و محتوای شیمیایی آنها به نوع گونه، اندام گیاه، زمان برداشت، منطقه جغرافیایی و روش استخراج ترکیبات بستگی دارد، بنابراین به تبع آن اثرات فارماکولوژیکی آنها هم ممکن است متفاوت باشد (۳۷ و ۳۸). در واقع عدم تأثیر ضد قارچی برخی از گونه‌های *افدرا* ممکن است مربوط به محتوای شیمیایی متفاوت گونه‌های *افدرا* و یا حساسیت متفاوت سویه‌های مختلف گونه‌های قارچی باشد (۳۹ و ۴۰). در پژوهش‌های فراوانی اثر ضد قارچی عصاره‌های گیاهان متعدد بر روی قارچ مورد مطالعه در این پژوهش به اثبات رسیده است. گزارش شده است که عصاره متانولی و آبی بولب سیر بر روی میکروسپوروم *جیسوم* اثر مهاری داشته و در این خصوص، عصاره آبی این گیاه بر حسب MIC دارای قدرت اثر کمتری نسبت به عصاره آبی گیاه *آرمک* *کییر می‌باشد* (۴۰). در پژوهش Tra Bi و همکاران مشخص شد که عصاره دی‌کلرومتانی گیاه *Erigeron floribundus* اثر ضد قارچی بسیار بیشتری بر حسب MIC نسبت به عصاره آبی گیاه *آرمک* *کییر* در طرح حاضر علیه قارچ میکروسپوروم *جیسوم* دارد (۴۱). همچنین با مقایسه نتایج طرح حاضر با نتایج پژوهش آویژگان و همکاران مشخص می‌گردد که اثر ضد قارچی عصاره تام آبی گیاه *آرمک* *کییر* بر روی قارچ میکروسپوروم *جیسوم* نسبت به عصاره هیدروالکلی گیاه خوشاریزه بیشتر است (۴۲) که البته در چنین مقایسه‌هایی می‌بایست در نظر داشت که سوش‌های

مختلف یک گونه از قارچ دارای حساسیت‌های مختلفی هستند (۳۹).

باتوجه به عدم وجود همبستگی میان نتایج روش رقت‌سازی در آگار و نتایج روش انتشار دیسک در طرح حاضر، نمی‌توان بر اساس نتایج یک روش، نتایج روش دیگر را پیش‌بینی نمود که البته بیشتر روش رقت‌سازی در آگار، روش مرسوم برای تعیین حساسیت درماتوفیت‌ها می‌باشد (۴۳). در مورد برخی از داروها، همبستگی مناسبی میان نتایج این دو روش وجود دارد و در مورد برخی داروها هم تطابق پایینی در بین آنها مشاهده می‌شود (۲۸ و ۴۴). بنابراین ممکن است یک عصاره در روش انتشار دیسک بر علیه یک قارچ اثر ضدقارچی بیشتری از دیگر قارچ‌ها داشته باشد اما در روش رقیق‌سازی در آگار، اثر ضدقارچی همان عصاره بر همان قارچ از اثر بر دیگر قارچ‌ها کمتر باشد (۴۵). در پژوهش عبدالملکی و همکاران، عصاره آبی نعنای فلفلی در روش رقیق‌سازی در محیط کشت بیشترین اثر ضدقارچی را علیه فوزاریوم / اوکسیزپوروم داشت، درحالی‌که در روش انتشار دیسک، اثر ضدقارچی ضعیفی بر همین قارچ نسبت به دیگر قارچ‌ها از خود نشان داد. در پژوهش مذکور، این نتیجه چنین تفسیر شده است که در روش رقیق‌سازی عصاره با محیط کشت، عصاره در تمام نقاط محیط کشت حضور دارد اما در روش انتشار دیسک بتدریج دارو از دیسک آزاد می‌شود (۴۶). اینکه یک نوع عصاره در روش رقیق‌سازی در آگار اثر ضددرماتوفیتی نشان دهد اما در روش انتشار دیسک اثر ضددرماتوفیتی نداشته باشد و بالعکس، در مطالعات دیگر هم بیان شده است (۴۷). بنابراین نتایج پژوهش حاضر نیز نتایج غریبی نمی‌باشند که در آن، عصاره آبی در روش انتشار دیسک اثر ضدقارچی نداشته اما در روش رقت‌سازی در آگار اثر ضدقارچی از خود نشان داده است. عدم مشاهده هاله عدم رشد برای عصاره آبی گیاه *آرمک* کبیر در روش انتشار دیسک و بروز فعالیت

ضدقارچی از همین عصاره در روش رقت‌سازی در آگار، شاید به این دلیل باشد که عصاره آبی این گیاه توانایی نفوذ و انتشار خوبی در محیط کشت در روش انتشار دیسک را ندارند اما در روش رقت‌سازی در آگار، اختلاط عصاره با محیط کشت بخوبی صورت گرفته و در واقع عصاره در تمام نقاط محیط کشت حضور دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره آبی اندام هوایی گیاه *آرمک* کبیر دارای اثر ضدقارچی علیه قارچ میکروسپوروم جیسیئوم می‌باشد. می‌توان امیدوار بود که با فراکسیون نمودن و خالص‌سازی بیشتر عصاره تام آبی گیاه *آرمک* کبیر، درنهایت فراکسیون‌ها، ترکیبات یا ترکیب ضدقارچ مؤثر و قابل رقابت با تربینافین و دیگر داروهای ضددرماتوفیت بدست آید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کمک مالی و مساعدت معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به انجام رسیده است. ضمن تشکر و سپاس فراوان از این معاونت محترم، لازم به ذکر است که این مقاله، منتج شده از پایان نامه دانشجویی آقای کوروش مظفری جهت اخذ درجه دکتری رشته داروسازی از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.

References

1. Havlickova B, Czaika VA, Fridrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008; 51:2-15.
2. Nanbakhsh H, Diba K, Hazrati Tapeh K. Evaluation of some physico-chemical parameters and fungal contamination of indoor public swimming pools in Urmia in 2001. *Sci J Kurd Univ Med Sci* 2005; 10: 26-35. [In Persian]
3. Das K, Basak S, Ray S. A study on superficial fungal infection from west bengal: A brief report. *J Life Sci* 2009; 1:51-5.
4. Vader Straten MR, Hossain MA, Ghannoum MA. Cutaneous infection dermatophytosis, onychomycosis and tinea versicolor. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17: 87-112.
5. Kannan P, Janaki C, Selvi GS. Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 212-5.
6. Mikaeili A, Mostafaei A, Rahimi M. Frequency of varieties of *Trichophyton verrucosum* in cattle with dermatophytosis in cattle farms of Kermanshah. *Iran Vet J* 2009; 4: 64-69.
7. Shadzi S. Medical mycology. 10th ed. Isfahan: Isfahan Jahade Daneshgahi Publications, 2005: 96.
8. Kirmizigül AH, Gökçe E, Şahin M, Kiziltepe M, Büyük F, Erkiliç EE. Clinical effectiveness of ivermectin on bovine dermatophytosis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18: 523-6.
9. Simpanya MF. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. 2000. [cited 2014 June 21]. Available from: URL: <http://www.dermatophytes.reviberoammicol.com/p001012.pdf>
10. Mikaeili A, editor. Isolation of dermatophytic agents in Kermanshah during 1993-2003. Proceeding of the 10th Congress of the European Confederation of Medical Mycology. 2004 June 17-20, Wroclaw, Poland.
11. Sequeira JH. The varieties of ringworm and their treatment. *Br Med J* 1906; 2:193-6.
12. Snow JS. The management of dermatophytosis. *Mil Surg* 1944; 95:146-51.
13. Gupta AK, Cooper EA. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; 166: 353-67.
14. Nweze EI, Ogbonna CC, Okafor JI. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated from pediatric cases in Nigeria against five antifungals. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2007; 49:293-5.
15. Omidvari S, Mohammadian Panah M, Mosallaei A, Ahmadloo N. Glioblastoma Multiforme thirty-five years after radiotherapy for ringworm of the scalp. *J Med Res* 2004; 2: 64-68.
16. Brooks G, Carroll KC. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Translated by Zaghimi H, Allebuyeh M, Esmaeeli D. 2nd ed. Tehran: Andishe Rafi Publications, 2009: 718.
17. Nasiri Kashani MJ, Falahati M, Motavalian M, Yazdanparast SA, Fateh R. In vitro antifungal activity of shallot extract and its comparison with miconazole. *QUMSJ* 2009;3:13-18. [In Persian]
18. Lotfali A, Falahati M, Foroumadi A, Emami S. Evaluation of antifungal activity of new derivatives of imidazole using colorimetric method. *Razi J Med Sci* 2012; 19:10-16. [In Persian]

19. Antifungals [editorial]. [cited 2013 September 6]. Available from: URL: <http://www.drugs.com/drug-class/antifungals.html>.
20. Antimicrobials [editorial]. [cited 2013 September 17]. Available from: URL: <http://reference.medscape.com/drugs/antimicrobials>.
21. Amirrajab N, Shams-Ghahfarokhi M, Ghajari A, Razzaghi-Abyaneh M. In vitro antifungal activities of griseofulvin and terbinafine against common dermatophytes. *Hakim Res J* 2006; 9:28-33.
22. Aguiar PeresNTD, Albuquerque Maranhao FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol* 2010; 85: 657-67.
23. DeBerker D. Fungal nail disease. *N Engl J Med* 2009; 360: 2108-16.
24. Khalighi-Sigaroodi F, Jarvandi S, Taghizadeh M. Therapeutic indications of medicinal plants. 1st ed. Tehran: Arjmand Press, 2010: 116. [In Persian]
25. Fukushima K. Bioactivity of ephedra: Integrating cytotoxicity assessment with real-time biosensing [dissertation]. Maryland: University of Maryland; 2004.
26. Panahi P, Torabzadeh Khorasani P, Sabokkhar A, Bayat M, Mokhtari A. Antifungal effects of various extracts of Ephedra major host on common fungal pathogens. *Middle East J Sci Res* 2011; 7:413-16.
27. Randhawa MA. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Jpn J Med Mycol* 2006; 47: 313-18.
28. Pakshir K, Bahaedinie L, Rezaei Z, Sodaifi M, Zomorodian K. In vitro activity of six antifungal drugs against clinically important dermatophytes. *Jundishapur J Microbiol* 2009; 2: 158-63. [In Persian]
29. Mota CRA, Miranda KC, Lemos Jde A, Costa CR, Hasimoto e Souza LK, Passos XS, et al. Comparison of in vitro activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 250-54.
30. Bagheri-Gavkosh S, Bigdeli M, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Inhibitory effects of Ephedra major Host on Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin production. *Mycopathologia* 2009; 168: 249–55.
31. Feresin GE, Tapia A, López SN, Zacchino SA. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina. *J Ethnopharmacol* 2001;78:103–7.
32. Ghanem S, El-Magly U. Antimicrobial activity and tentative identification of active compounds from the medicinal Ephedra alata plant. *J Taibah Univ Med Sci* 2008; 3:8-15.
33. Rustaiyan A, Javidnia K, Farjam MH, Mohammadi MK, Mohammadi N. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of the methanolic extracts of Ephedra laristanica. *J Med Plants Res* 2011; 5:5713-17.
34. Rustaiyan A, Javidnia K. Antimicrobial and antioxidant activity of the Ephedra sarcocarpa growing in Iran. *J Med Plant Res* 2011; 5:4251-55.
35. Parsaeimehr A, Sargsyan E. and Javidnia K. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of Ephedra. *Molecules* 2010; 15: 1668-78.
36. Jamil M, ul Haq I, Mirza B, Qayyum M. Isolation of antibacterial compounds from Quercus dilatata L. through bioassay guided fractionation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012; 11: 1-11.

37. Torabzadeh Khorasani P, Panahi P, Sabokbar A, Mokhtari AR. Evaluation of antibacterial effects of aqueous, ethanol and acetone extracts of *Ephedra major* Host against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Iran J Comparative Biopathol* 2010; 6:91-98.
38. Soni MG, Carabin IG, Griffiths JC, Burdock GA. Safety of ephedra: lessons learned. *ToxicolLett* 2004; 150: 97–110.
39. Yazdanparast S, Rahimi H, Farnoodian M. Molecular strain typing of *Trichophyton mentagrophytes* isolated from patients with dermatophytosis by random amplifiedpolymorphic DNA. *RJMS* 2009; 16: 36-42.
40. Ayatollahi Mousavi SA, Yaghmai B, Mehrabian M. The study of the effects of aqueous and methanol extracts of garlic against *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* & *Microsporum gypseum*. *J RafsanjanUniverMed Sci* 2009; 8: 3-10. [In Persian]
41. Tra Bi FH, Koné MW, Kouamé NF. Antifungal activity of *Erigeron floribundus* (Asteraceae) from Côte d'Ivoire, West Africa. *Trop J Pharm Res* 2008; 7: 975-9.
42. Avizhegan M, Saadat M, Nilforooshzadeh MA, Hafizi M. Antifungal effect of extracts *Echinophora platyloba* against some common dermatophytes. *J Med Plants* 2006; 5: 10-16.
43. Nweze EI, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Agar-based disk diffusion assay for susceptibility testing of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3750–3752.
44. Siqueira ER, Ferreira JC, Pedroso RS, Lavrador MA, Candido RC. Dermatophyte susceptibilities to antifungal azole agents tested in vitro by broth macro and microdilution methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50: 1-5.
45. Dhayanithi N1, Kumar TA, Kalaiselvam M, Balasubramanian T, Sivakumar N. Anti-dermatophytic activity of marine sponge, *Sigmadocia carnos* (Dendy) on clinically isolated fungi. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: 635-9.
46. Abdulmaleki M, Bahraminejad S, Salari M, Abasi S, Panjeh Keh N. Evaluation of Effect of antifungal *Mentha piperita* L against plant pathogen fungi. *J Med Plants* 2011; 10: 26-34.
47. Sadeghi Nejad B, Sadhu Deokule S. Anti-dermatophytic activity of *Drynaria quercifolia*. *J Microbiol* 2009; 2: 25-30.