بررسی مکانیسم اثر عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* بر غشاء *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا*

نسیم غیور نجف آبادی[۱]، محبوبه مدنی[۲*]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- استادیار، دکترای قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

یافته / دوره بیست و یکم / شماره ۱ / بهار ۹۸ / مسلسل ۷۹

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۱۰/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۱/۱۳

مقدمه: کاندیدیازیس بیماری قارچی شایع است که به وسیله ی گونه های مختلف جنس *کاندیدا* ایجاد می شود و قسمت های مختلف بدن را درگیر می نماید. این عفونت ها با توجه به وضعیت سیستم ایمنی میزبان می تواند در حد مهلک پیش روند. به دنبال پیشرفت علم و اهمیت بخش سلامت در جوامع، استفاده از داروهای شیمیایی افزایش یافته است و با توجه به عوارض جانبی، قیمت بالا و مراحل پیچیده ی تولید داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته اند. هدف این مطالعه بررسی مکانیسم اثر عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* بر غشاء برخی گونه های *کاندیدا* است.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره متانولی ساقه و برگ گیاه *رومکس آلوئولاتوس* با روش سوکسله تهیه شد. سپس اثر ضد قارچی عصاره متانولی با روش انتشار در چاهک و MIC تعیین شد. به منظور مقایسه مکانیسم اثر این گیاه با آمفوتریسین B، مقدار گلوکز با دستگاه اتوآنالیزور، سدیم و پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتری و اسیدآمینه با روش HPLC در محیط حاوی عصاره گیاه و قارچ تعیین شد.

یافته‌ها: بیشترین قطر هاله عدم رشد مخمر *کاندیدا* توسط عصاره متانولی در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج نشان داد که میانگین غلظت سدیم، پتاسیم و گلوکز در گونه های مختلف *کاندیدا* بر اثر عصاره متانولی در مقایسه با آمفوتریسین B تغییر معناداری دارد. بیشترین اسیدآمینه های آزاد شده گلوتامین، تره اونین و آلانین بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: این عصاره گیاهی مکانیسم مشابهی با مکانیسم آمفوتریسین B دارد و می تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی با عوارض جانبی بالا شود. هرچند بررسی عوارض جانبی احتمالی گیاه باید انجام شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره متانولی، *Rumex alveolatus*، SEM، HPLC، *candida*

*آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده زیست شناسی، گروه میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: *mmadani66@gmail.com*

مقدمه

گونه های *کاندیدا* یکی از شایع ترین عوامل بیماری قارچ های فرصت طلب در انسان است و باعث عفونت به صورت حاد، تحت حاد یا مزمن در پوست ،ناخن، مخاط واژن، برونش، ریه و دستگاه گوارش می شود. گاهی نیز منتشر می گردد و کلیه، ریه، کبد، قلب و غیره را گرفتار می سازد. میزان واکنش میزبان در برابر بیماری از یک خارش و التهاب مختصر تا فرم مزمن، حاد چرکی یا گرانولوماتوز در تغییر است (۱). گونه های *کاندیدا* به عنوان چهارمین عامل عفونت های خونی بیماران بستری در بیمارستان ها مطرح شده اند که مسئول تقریبا ۴۰ ٪ موارد مرگ ومیر در بیمارستان های آمریکا می باشند (۲). این قارچ ها در افراد با سیستم ایمنیِ تضعیف شده مثلا در افراد مبتلا به ایدز، سرطان، پیوند مغز استخوان و یا پیوند اعضاء باعث ایدز، سرطان، پیوند مغز استخوان و یا پیوند اعضاء باعث عفونتهای منجر به مرگ ومیر می شود. حاملگی، داروی ضد حاملگی، درمان آنتی بیوتیکی، دیابت، تماس دراز مدت پوست با آب، درمان با استروئید موضعی، برخی از بیماری های غدد و عوامل دخیل در ایجاد ضعف ایمنی سلولی ممکن است باعث شوند که این مخمر ها، بیماری زا گردد (۲). به دنبال پیشرفت علم و اهمیت بخش سلامت در جوامع، استفاده از داروها افزایش یافته است و با توجه به عوارض جانبی، قیمت بالا و مراحل پیچیده ی تولید داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته اند. قدمت استفاده از گیاهان دارویی به سال ها پیش و متناسب با قدمت تمدن بر می گردد. گیاه درمانی شاخه ای از طب سنتی است که در کشورهای با سابقه ای مثل ایران که غنی از گنجینه ی گیاهان مختلف بومی است تا یک قرن پیش و قبل از پیدایش داروهای سنتتیک نقش اصلی را در درمان بیماری ها داشته است. تحقیقات زیادی روی گیاهان انجام شده تا اثرات درمانی آن ها به اثبات برسد، اما بسیاری از گیاهان نیز وجود دارد که بدون هیچ سابقه ی علمی از آن ها به صورت سنتی استفاده می گردد (۳). مواد موثره گیاهان دارویی دو نوع هستند: اول مواد حاصل از سوخت و ساز اولیه یا مواد مورد نیاز و حیاتی، که در همه ی گیاهان سبز با عمل فتوسنتز به وجود می آیند. نوع دوم مواد حاصل از سوخت و ساز ثانویه که در اثر جذب ازت توسط گیاه تولید می شوند. این تولیدات ظاهرا" اغلب برای گیاه بدون فایده هستند ولی برعکس اثرات درمانی آن ها قابل توجه است.گیاهان توانایی نامحدود برای سنتز ترکیبات آروماتیک دارند، بیشتر این مواد از ترکیبات فنلی و یا مشتقات آن ها هستند. این ترکیبات متابولیت های ثانویه گیاهان هستند (۴). آمفوتریسین B آنتی بیوتیک پلی ان است که پس از شش دهه هنوز هم بعنوان استاندارد طلایی درمان عفونتهای سیستمیک قارچی ناشی از *آسپرژیلوس*، *کاندیداآلبیکنس*، *کریپتوکوک*، *هیستوپلاسما* و *موکور* مورد استفاده قرار گرفته و بطور وسیع برای درمان عفونت های قارچی سیستمیک بعد از پیوند، ایدز، بیماری های ویروسی، انگلی، پریونی و نیز شیمی درمانی بکار برده می شود در اغلب موارد برای دارو درمانی اولیه، قبل از تجویز یک آزول به کار می رود (۵). آمفوتریسین B باوجود اینکه درمانی استاندارد برای عفونت های جدی مربوط به گونه های *کاندیدا* محسوب می شود، ولی ممکن است با سمّیت قابل توجهی همانند سمّیت کلیوی همراه باشد (۶). دفع این دارو اغلب از طریق متابولیسم آهسته کبدی است؛ نیمه عمر در حدود ۲ هفته می باشد. مقدار اندکی از دارو از راه ادرار دفع می شود و تعدیل دوز فقط در اختلال کلیوی شدید لازم است (۷). گونه های *رومکس* متعلق به خانواده ی *پلی گوناسه* (علف هفت بند) است. تیره *پلی گوناسه*،۳۰ جنس و در حدود ۶۰۰ گونه دارد که ۱۰۰ گونه ی آن در جنس گیاه *رومکس (ترشک)*، ۱۸۰ گونه

آن در جنس پلی گونوم (علف هفت بند) است. انتشار این تیره در مناطق سرد نیمکره شمالی است. ۹ جنس و بیش از ۷۷ گونه ی این تیره تقریبا در تمامی فلات ایران به طور پراکنده انتشار دارند (۸). ترشک گیاهی شبیه اسفناج بوده و بومی قاره اروپا است. به طور وحشی در چمن زارها، کشت زارها، کنار رودخانه ها و جاده ها رشد میکند. کربوهیدرات ها، فیبر، چربی، پروتئین، ویتامین B1، B2 و B3 ویتامین C، کلسیم، آهن، پتاسیم و روی از جمله ترکیبات این گیاه هستند. این گیاه عملکرد قلب و کبد و معده را تقویت می کند (۹). رومکس گیاهی یک ساله، دوساله یا چند ساله و پایا با برگ های متناوب و گل های مجتمع در خوشه هستند. ریشه ها راست، بعضی اوقات دارای ساقه های ریشه مانند زیرزمینی، ساقه ها راست و گل ها، نر و ماده یا دو پایه است. جنس رومکس در ایران بیشتر از ۲۴ گونه دارد که در نواحی غربی، ارتفاعات البرز در اطراف تهران، کردستان، قصرشیرین، کرمانشاه و بیشتر ارتفاعات زاگرس، آذربایجان، خراسان، لرستان، مازندران و بلوچستان می رویند (۸). از دوران باستان، گونه های ترشک به خوبی برای استفاده در طب سنتی به دلیل تاثیرگذاری درمانی و فعالیت بیولوژیکی مختلفشان شناخته شده بودند. امروزه هم بخش های زیرزمینی و هم قسمت های هوایی برخی ترشک ها عموماً در انواع مختلفی از روش های درمان بیماری مورد استفاده قرار می گیرند (۱۰). اجزاء شیمیایی اصلی رومکس آلوئولاتوس آنتراکوئینون ها و فلاونوئیدها است (۱۱). از جمله کاربردها و مصارف درمانی خانواده رومکس می توان به فعالیت های روان درمانی، آنتی اکسیدانت، سیتوتوکسیک، ضدباروری، ضدالتهابی، آنتی میکروبیالی، ضداسهال، ضدتوموری، قابض یا بندآورنده ی خون و آنتی درماتیت، ادرار آور و ضدویروسی اشاره کرد. از رومکس آلوئولاتوس می توان به عنوان پادزهری برای گزنه، تصفیه کننده، قابض، درمان گلودرد و درمان دمل ها و سوختگی ها استفاده کرد (۱۲). عصاره های میوه های رومکس کریسپوس مخصوصاً در بیمارستان های کودکان به خاطر عمل باکتریواستاتیکی و ضد اسهالی خفیفشان پذیرفته شده و به کار برده می شود (۱۰). رومکس سیپریوس برای درمان بیماری های پوستی از جمله درماتوفیتوزها و فعالیت آنتی باکتریال بر ضد استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین دارد. همچنین مشخص شده است که این گونه دارای ماکزیمم سمیت بر ضد آسپرژیلوس سالینا و فعالیت آنتی ویروسی بر ضد HIV از طریق ممانعت از ریورس ترانس کریپتاز می باشد (۱۳). عصاره متانولی برگ، ریشه و ساقه *رومکس هاستاتوس* دارای اثرات بیولوژیکی زیادی از آنتی اکسیدان، ضد انعقاد، ضد اسهال و سیتوتوکسیک می باشد. این گیاه دارای اجزای مهم شیمیایی از جمله آنتراکینون ها، تانن ها و فلاونوئیدها می باشد. همچنین *رومکس نپالنسیس* گونه ی دیگری از خانواده ی ترشکیان است که دارای اثرات مختلفی از جمله ضدقارچی و ضدباکتریایی است و همچنین دارای سمیت متوسط می باشد. تحقیقات نشان داده است از گیاهانی مانند *رومکس دنتاتوس*، *رومکس کریسپوس* و *رومکس ابتوسیفولیس* به عنوان داروهای جایگزین برای درمان آبسه، دردهای روماتیسمی، نقرس و درد های قاعدگی و به عنوان داروهای سنتی در شرایطی مانند اسهال، خارش های پوستی و هموروئید می توان استفاده نمود (۱۴).

مواد و روش‌ها

هدف از این مطالعه، بررسی مکانیسم اثر عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* بر غشاء گونه های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* و مقایسه نتایج آن با محلول آمفوتریسین B در شرایط آزمایشگاهی بود. این مطالعه تجربی _آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انجام شد. در اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ مقداری از گیاه *رومکس*

آلوئولاتوس شامل ساقه، برگ و گل از مرکز تحقیقات آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان خریداری شد. تمام قسمت های گیاه شامل برگ، شاخه و گل به طور کامل چند بار با آب شستشو داده شد. بعد از حذف کامل آب، قسمت های مختلف به طور جداگانه در دمای اطاق و در سایه خشک شدند. سپس قسمت های خشک شده گیاه توسط آسیاب برقی پودر گردید. عصاره گیری از گیاه *رومکس آلوئولاتوس* به روش سوکسله انجام شد. به این منظور ۳۰ گرم از ساقه و برگ پودر شده، در ۱۰۰ میلی لیتر حلال اتانول ۹۶ درصد و متانول خالص به طور جداگانه قرار داده شد. سپس ارلن های حاوی گیاه و حلال مورد نظر روی شیکر قرار داده شد و به روش سوکسله عصاره گیری انجام شد. عصاره های الکلی به دست آمده را با استفاده از کاغذ صافی، صاف کرده سپس در هوای آزاد در دمای اطاق قرار داده تا الکل اضافی تبخیر شود و عصاره ی خالص به دست آید. پس از خشک شدن عصاره ها در مجاورت هوا، عصاره های الکلی تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردید. نمونه های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC2747)، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (ATCC90018) و *کاندیدا گلابراتا* (ATCC90030) از دانشگاه تهران تهیه گردید. در شرایط کاملاً استریل از قارچ مورد نظر بر روی پلیت های حاوی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت تازه تهیه شد و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس یک کلنی خالص از قارچ مورد نظر را انتخاب کرده و در یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون قارچی تهیه شد. این سوسپانسیون قارچی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه شد، سپس به وسیله ی دستگاه اسپکتروفتومتر سوسپانسیون قارچی دارای 1×10^7 سلول مخمر در هر میلی لیتر تهیه و از آن جهت انجام تست ها استفاده شد. برای تهیه محلول عصاره متانولی یک گرم از هر عصاره ی خشک شده را جداگانه توزین نموده و به لوله آزمایش استریل حاوی ۴ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید ۱۰٪ اضافه شد، بدین ترتیب غلظت ۲۵۰میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. سپس رقت های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵میلی گرم بر میلی لیتر از هر یک از عصاره ها تهیه شد. جهت مقایسه اثر عصاره متانولی و تاثیر ضد قارچی آن، اثر آن ها با آمفوتریسین B مقایسه شد. بنابراین از آمفوتریسین B محلولی در دی متیل سولفوکساید تهیه شد و رقت های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت سپس برای سوسپانسیون قارچی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. بعد از اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به لوله ها، آن ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. پس از طی این زمان، کدورت لوله ها و رشد قارچ ها در مقایسه با کنترل و به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. لوله ی با کمترین غلظت عصاره که فاقد رشد قارچ بود و کدورتی در آن مشاهده نشده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. به منظور اندازه گیری میزان سدیم و پتاسیم در نمونه ها از دستگاه فلیم فتومتر استفاده گردید. ۱۰میلی لیتر آب مقطر استریل را داخل لوله آزمایش درپیچ دار ریخته سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول قارچی حاوی عصاره به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن آب مقطر و محلول قارچی، نمونه برای اندازه گیری و خوانش سدیم و پتاسیم توسط فلیم فتومتر آماده شد. اساس کلی این تست اولاً حالت صفر کردن دستگاه است و حالت دوم، کالیبراسیون می باشد. برای صفر کردن دستگاه از آب مقطر استریل استفاده می شود. مرحله ی کالیبراسیون زمانی است که نمونه ی استاندارد برای کالیبر به دستگاه داده می شود و استاندارد این نمونه برای پتاسیم ۴/۹ میلی مول در لیتر و برای سدیم ۱۴۴ میلی مول در لیتر می باشد. برای اطمینان از وجود

اسیدآمینه در نمونه ها از تست اولیه ی نین هیدرین استفاده گردید. ۲-۱ سی سی محلول قارچی حاوی عصاره را با چند قطره از محلول نین هیدرین مخلوط کرده و سپس به مدت ۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. رنگ ارغوانی محلول نشان دهنده ی وجود اسید آمینه در محلول قارچی حاوی عصاره است و رنگ زرد نشان دهنده ی وجود پرولین می باشد. سپس تمام نمونه های حاوی اسیدآمینه را، جهت انجام HPLC و اندازه گیری اسید آمینه آماده شدند. از دستگاه HPLC مدل AZURA Knauer، آلمان استفاده شد. دتکتور مورد استفاده UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر، دمای انجام آزمایش دمای اتاق و سیستم ایزوکراتیک، فاز متحرک با سرعت جریان حلال ۱ میلی متر بر دقیقه استفاده شد. در این روش از هر نمونه ۳ بار تزریق شد. برای بررسی نمونه ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ابتدا در محیط کشت سابورودکستروز آگار، بر روی پلیت یک چاهک به قطر ۶ میلی متر ایجاد گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره های متانولی به هر چاهک اضافه شد. به کمک سواپ استریل نمونه کاندیداها با کدورتی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند به صورت کشت چمنی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، هاله ممانعت از رشد مشاهده گردید. سپس پلیت ها جهت بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به دانشکده فنی دانشگاه تهران منتقل شدند.

آنالیز آماری

پس از جمع آوری داده ها، تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید. به منظور مقایسه مقادیر قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف عصاره متانولی، مقادیر سدیم، پتاسیم و گلوکز از آزمون کراسکال والیس و آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی استفاده شد. سطح معنی دار آزمون ($P<۰/۰۵$) جهت تفسیر داده ها مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* علیه سه قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* نشان می دهند که غلظت ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای *کاندیدا آلبیکنس* و غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* اثر بازدارندگی دارد.

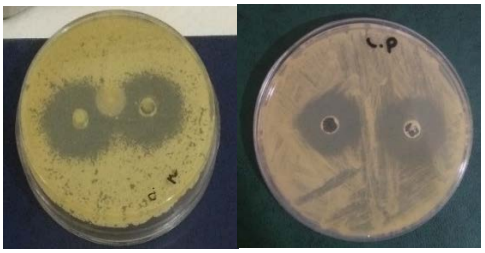
در روش انتشار در چاهک، قطر هاله های عدم رشد اطراف چاهک های حاوی غلظت های مختلف عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* برای هر قارچ اندازه گیری شد که در جدول ۱ آمده است. بر اساس نتایج جدول ۱، در هر سه *کاندیدا* میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد با افزایش غلظت افزایش داشته است. میانگین قطر هاله در چهار غلظت عصاره نسبت به کنترل منفی بزرگتر و نسبت به کنترل مثبت کوچکتر بوده است. در هر سه *کاندیدا* اختلاف معناداری بین قطر هاله‌ی عدم رشد در غلظت‌های مختلف و کنترل مثبت و منفی مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی نشان داد که مقدار قطر هاله در کنترل مثبت نسبت به چهار غلظت عصاره بطور معناداری بیشتر و در کنترل منفی نسبت به چهار غلظت عصاره بطور معناداری کمتر بوده است ($p<۰/۰۵$). همچنین در مقایسه‌ی دوتایی بین غلظت‌ها مشخص شد که با افزایش غلظت عصاره مقدار قطر هاله‌ی عدم رشد بطور معناداری افزایش داشته است ($p<۰/۰۵$). نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی نشان داد که در غلظت‌های ۳۱/۲۵ تا ۱۲۵ قطر هاله عدم رشد در *کاندیدا آلبیکنس* بطور معناداری بیشتر از *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بوده

است (p<۰/۰۵). و قطر هاله‌ی عدم رشد در *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* تفاوت معناداری نداشته است (p>۰/۰۵). ولی در غلظت ۲۵۰ mg/ml، قطر هاله عدم رشد در *کاندیدا آلبیکنس* بطور معناداری بیشتر از *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (p<۰/۰۵) و قطر هاله‌ی عدم رشد در *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بطور معناداری بیشتر از قطر هاله در *کاندیدا گلابراتا* بوده است (p<۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱. قطر هاله های عدم رشد عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* به روش چاهک (بر حسب میلی متر)

کاندیدا غلظت	*کاندیدا آلبیکنس* M±SD	*کاندیدا پاراپسیلوزیس* M±SD	*کاندیدا گلابراتا* M±SD
۳۱/۲۵	۷/۱۸±۰/۲۱	۵/۹۶±۰/۲۱	۳/۷۶±۰/۳۰
۶۲/۵	۱۰/۶۷±.۰/۸	۹/۴۰±۰/۵	۸/۳۶±۰/۴۶
۱۲۵	۱۲/۴۹±۰/۴۶	۱۱/۳۳±۰/۵۰	۱۰/۶۷±۰/۴۹
۲۵۰	۱۵/۲۴±.۰/۵۳	۱۴/۶۵±۰/۳۹	۱۲/۱۶±۰/۲۶
کنترل مثبت	۳۸/۱۳±۰/۳۳	۴۵/۰۷±۰/۲۵	۳۴/۳۵±۰/۳۷
کنترل منفی	۰۰±.۰۰	۰۰±.۰۰	۰۰±.۰۰

در این روش آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و آمفوتریسین B به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند (شکل۱).



الف: *کاندیدا آلبیکنس* ب: *کاندیدا پاراپسیلوزیس*

ج: *کاندیدا گلابراتا*

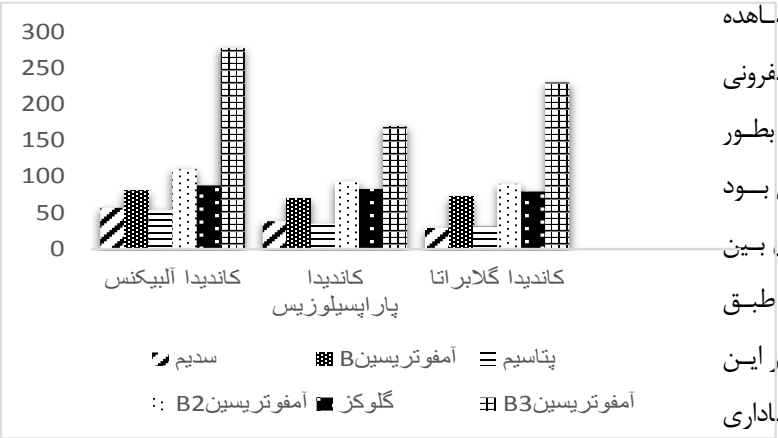
شکل۱. اثر ممانعتی غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی رومکس آلوئولاتوس برعلیه گونه های کاندیدا به روش چاهک

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار مقدار سدیم، پتاسیم و گلوکز در عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* علیه *کاندیدا آلبیکنس*، *پاراپسیلوزیس* و *گلابراتا*

کاندیدا	*کاندیدا آلبیکنس* M±SD	*کاندیدا پاراپسیلوزیس* M±SD	*کاندیدا گلابراتا* M±SD
سدیم	۵۷±۲/۶۵	۳۸/۳۳±۹/۴۵	۲۹/۰۰±۱/۷۳
آمفوتریسین B	۸۰/۵۰±۰۰	۷۰/۲۰±۰۰	۷۲/۳۰±۰۰
پتاسیم	۵۴/۰۰±۲/۰۰	۳۵/۰۰±۰۰	۳۰/۶۷±۲/۳۱
آمفوتریسین B	۱۱۰/۳۰±۰۰	۹۳/۵۰±۰۰	۹۰/۲۰±۰۰
گلوکز	۸۷/۶۷±۳/۵۱	۸۳/۰۰±۵/۵۷	۷۹/۳۳±۴/۷۳
آمفوتریسین B	۲۷۷/۶۰±۰۰	۱۷۰/۲۰±۰۰	۲۳۰/۵۰±۰۰

بر اساس نتایج جدول۲، در هر سه *کاندیدا* مقدار سدیم در عصاره متانولی نسبت به آمفوتریسین B کمتر بوده است. براساس نتایج آزمون کراسکال والیس، در *کاندیدا آلبیکنس* (p=۰/۰۲۴) و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (p=۰/۰۲۳) اختلاف معناداری بین مقدار سدیم در سه گروه مشاهده شد. طبق نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی در هر دو *کاندیدا*، مقدار سدیم در آمفوتریسین B بطور معناداری بیشتر از مقدار آن در عصاره‌های متانولی بود (p<۰/۰۵). در *کاندیدا گلابراتا* نیز اختلاف معناداری بین مقدار سدیم در سه گروه مشاهده شد (p=۰/۰۳۵). طبق نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی مقدار سدیم در آمفوتریسین B بطور معناداری بیشتر از مقدار آن در عصاره متانولی بود (p<۰/۰۵). طبق نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی مقدار سدیم در *کاندیدا آلبیکنس* بطور معناداری بیشتر از *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* بود (p<۰/۰۵). در عصاره متانولی اختلاف معناداری در مقدار سدیم بین سه *کاندیدا* در سطح خطای پنج درصد مشاهده شد (p=۰/۰۶۱). شواهدی بر وجود تفاوت معنادار در سطح خطای ده درصد و بیشتر بودن مقدار سدیم در *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به *کاندیدا پاراپسیلوزیس و گلابراتا* مشاهده می‌شود (p<۰/۱). در هر سه *کاندیدا* مقدار پتاسیم در عصاره متانولی نسبت به آمفوتریسین B کمتر بوده است. در *کاندیدا آلبیکنس* (p=۰/۰۳۹) و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (p=۰/۰۴۹)

اختلاف معناداری بین مقدار پتاسیم در سه گروه مشاهده شد. طبق نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی در هر دو *کاندیدا*، مقدار پتاسیم در آمفوتریسین B بطور معناداری بیشتر از مقدار آن در عصاره متانولی بود (p<۰/۰۵). در *کاندیدا گلابراتا* نیز اختلاف معناداری بین مقدار پتاسیم در سه گروه مشاهده شد (p=۰/۰۲۳). طبق نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی در این *کاندیدا*، مقدار پتاسیم در آمفوتریسین B بطور معناداری بیشتر از مقدار آن در عصاره‌های متانولی بود (p<۰/۰۵). در عصاره‌ی متانولی اختلاف معناداری بین مقدار پتاسیم در سه *کاندیدا* مشاهده شد (p=۰/۰۲۳). طبق نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی مقدار پتاسیم در *کاندیدا آلبیکنس* بطور معناداری بیشتر از *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* بود (p<۰/۰۵). بعلاوه مقدار پتاسیم در *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بطور معناداری بیشتر از مقدار آن در *کاندیدا گلابراتا* مشاهده شد (p<۰/۰۵). در هر سه *کاندیدا* مقدار گلوکز در عصاره متانولی نسبت به آمفوتریسین B کمتر بوده است. در *کاندیدا آلبیکنس* (p=۰/۰۲۴) و *کاندیدا گلابراتا* (p=۰/۰۲۴) اختلاف معناداری بین مقدار گلوکز در سه گروه مشاهده شد. طبق نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی در هر دو *کاندیدا*، مقدار گلوکز در آمفوتریسین B بطور معناداری بیشتر از مقدار آن در عصاره متانولی بود (p<۰/۰۵). در *کاندیدا پاراپسیلوزیس* نیز اختلاف معناداری بین مقدار گلوکز در سه گروه مشاهده شد (p=۰/۰۴۵). شواهدی بر وجود تفاوت معنادار در سطح خطای ده درصد و کمتر بودن مقدار گلوکز در *کاندیدا پاراپسیلوزیس* نسبت به *کاندیدا آلبیکنس* و *گلابراتا* مشاهده شد (p<۰/۱).در عصاره متانولی اختلاف معناداری در مقدار گلوکز بین سه *کاندیدا* در سطح خطای پنج درصد مشاهده نشد (p=۰/۱۰۹) (جدول۲).



نمودار۱ میانگین و انحراف معیار مقدار سدیم، پتاسیم و گلوکز در عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* علیه *کاندیدا آلبیکنس*، *پاراپسیلوزیس* و *گلابراتا*

جهت بررسی فراوانی اسیدهای آمینه در نمونه ها از روش اولیه تست نین هیدرین و HPLC استفاده شد. غلظت تمامی اسیدهای آمینه از گروه های *کاندیدا* در عصاره متانولی *رومکس آلوئولاتوس* در برابر آمفوتریسین B گزارش گردید. در تمامی غلظت ها بیشترین اسیدآمینه ی جدا شده مربوط به اسیدآمینه های گلوتامین، تره اونین و آلانین بود. (جدول ۳، ۴ و ۵).

جدول ۳. مقایسه غلظت های اسیدهای آمینه درعصاره متانولی حاوی *کاندیدا پاراپسیلوزیس* در مقایسه با محلول آمفوتریسین B حاوی *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (µmol/L)

نمونه / نوع اسیدآمینه	عصاره متانولی بدون شاهد	عصاره متانولی(شاهد)	عصاره متانولی و *کاندیدا پاراپسیلوزیس*	آمفوتریسین B و *کاندیدا پاراپسیلوزیس*
آسپارتیک اسید	۳۶	۱۹	۵۵	۲۱۶
گلوتامیک اسید	۳۶	۲۵	۶۱	۳۶۳
آسپارژین	۸۲	۶۵	۱۴۷	۲۱۴
هیستیدین	۱۳	۷	۲۰	۴۸
سرین	۷۰	۵۰	۱۲۰	۲۶۱
گلوتامین	۶۳۰	۵۳۲	۱۱۶۲	۱۱۳۲
آرژنین	۲۶	۱۲	۳۸	۱۵۹
گلیسین	۴۰	۲۲	۶۲	۷۳
تره اونین	۲۰۷	۱۹	۲۲۶	۲۳۰
آلانین	۲۲۰	۱۵۱	۳۷۱	۵۴۴
تیروزین	۳۱	۲۲	۵۳	۱۴۹
متیونین	۲۵	۲۲	۴۷	۱۵۶
والین	۱۵۲	۱۳۳	۲۸۵	۳۱۰
فنیل	۴۰	۳۱	۷۱	۲۳۰

آلانین				
ایزولوسین	۶۴	۵۰	۱۱۴	۲۱۴
لوسین	۶۳	۵۲	۱۱۵	۲۷۱
اورنیتین	۱۳۰	۶۳	۱۹۳	۲۳۳
لیزین	۴۶	۷۵	۱۲۱	۲۳۳

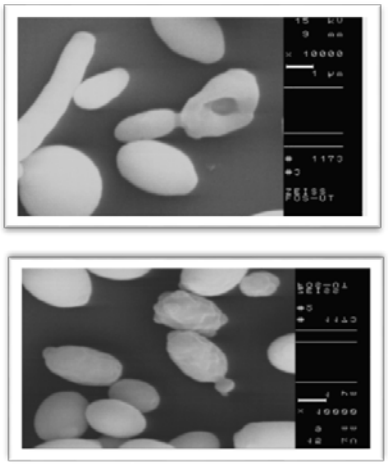
جدول ۴. مقایسه غلظت های اسیدهای آمینه درعصاره متانولی حاوی *کاندیدا گلابراتا*در مقایسه با محلول آمفوتریسین B حاوی *کاندیدا گلابراتا* (µmol/L)

نمونه / نوع اسیدآمینه	عصاره متانولی بدون شاهد	عصاره متانولی(شاهد)	عصاره متانولی و *کاندیدا گلابراتا*	آمفوتریسین B و *کاندیدا گلابراتا*
آسپارتیک اسید	۵۵	۱۹	۷۴	۲۱۶
گلوتامیک اسید	۲۹	۲۵	۵۴	۳۷۶
آسپارژین	۷۲	۶۵	۱۳۷	۲۰۹
هیستیدین	۱۶	۷	۲۳	۵۸
سرین	۶۹	۵۰	۱۱۹	۲۶۹
گلوتامین	۵۴۷	۵۳۲	۱۰۷۹	۱۱۰۰
آرژنین	۲۷	۱۲	۳۹	۱۷۹
گلیسین	۴۰	۲۲	۶۲	۸۶
تره اونین	۲۳۲	۱۹	۲۵۱	۲۵۹
آلانین	۱۹۹	۱۵۱	۳۵۰	۲۸۵
تیروزین	۳۲	۲۲	۵۴	۱۶۲
متیونین	۲۷	۲۲	۴۹	۱۶۹
والین	۱۳۷	۱۳۳	۲۷۰	۳۵۷
فنیل آلانین	۳۷	۳۱	۶۸	۱۱۵
ایزولوسین	۵۹	۵۰	۱۰۹	۲۰۳
لوسین	۵۹	۵۲	۱۱۱	۱۳۵
اورنیتین	۱۲۱	۶۳	۱۸۴	۱۷۰
لیزین	۱۱۵	۷۵	۱۹۰	۲۸۶

جدول ۵. مقایسه غلظت های اسیدهای آمینه درعصاره متانولی حاوی *کاندید ا آلبیکنس*در مقایسه با محلول آمفوتریسین B حاوی *کاندید ا آلبیکنس* (µmol/L)

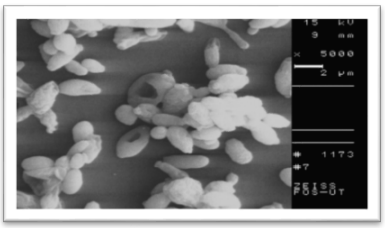
نمونه نوع اسیدآمینه	عصاره متانولی بدون شاهد	عصاره متانولی(شاهد)	عصاره متانولی و *کاندیدا آلبیکنس*	آمفوتریسین B و *کاندیدا آلبیکنس*
آسپارتیک اسید	۴۹	۱۹	۶۸	۲۳۷
گلوتامیک اسید	۲۸	۲۵	۵۳	۳۴۳
آسپارژین	۱۵۰	۶۵	۲۱۵	۲۲۳
هیستیدین	۱۳	۷	۲۰	۵۵
سرین	۵۶	۵۰	۱۰۶	۲۷۳
گلوتامین	۵۷۳	۵۳۲	۱۱۰۵	۱۱۲۵
آرژنین	۱۵	۱۲	۲۷	۱۶۹
گلیسین	۳۸	۲۲	۶۰	۸۷
تره اونین	۲۶۲	۱۹	۲۸۱	۲۷۳
آلانین	۱۵۵	۱۵۱	۳۰۶	۲۸۵
تیروزین	۴۶	۲۲	۶۸	۱۴۹
متیونین	۴۶	۲۲	۶۸	۹۹
والین	۲۷	۱۳۳	۱۶۰	۳۰۶
فنیل آلانین	۷۱	۳۱	۱۰۲	۲۴۴
ایزولوسین	۱۰۱	۵۰	۱۵۱	۲۳۳
لوسین	۱۲۰	۵۲	۱۷۲	۲۶۳
اورنیتین	۱۲۷	۶۳	۱۹۰	۲۶۷
لیزین	۸۲	۷۵	۱۵۷	۲۵۲

در تایید یافته های اولیه که تصور میشد عصاره ی متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* باعث تغییرات ساختار غشاء و افزایش نفوذپذیری غشاء سلول قارچ های مورد نظر می شود، نمونه هایی از هاله ی عدم رشد تشکیل شده اطراف چاهک های ایجاد شده بر روی محیط کشت سابارودکستروز آگار، جهت بررسی خصوصیات سطحی سلول قارچ توسط میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) مشاهده شد. نتایج بدین شرح می باشد. همانطور که در شکل های۲ مشاهده می شود عصاره ها باعث چروکیدگی سطح سلول و ایجاد سوراخ در مخمر شده است. پراکندگی سلول های مخمری نیز مشاهده می شود. شکل ۳ آسیب وارده بر مخمر را توسط آمفوتریسین B نشان می دهد. چروکیدگی و سوراخ شدن به مقدار بیشتر مشاهده می شود، ولی همچنان سلول ها به صورت متراکم قرار دارند.



شکل۲. نمایی از سلول های مخمری کاندیدا گلابراتا با ابعاد µ۲ و بزرگ نمایی ۳۰۰۰۰و۵۰۰۰ (تاثیر غلظت ۵۰۰m نانومتر و

۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس*)



شکل۳: نمایی از سلول های مخمری *کاندیدا گلابراتا* با ابعاد µ۲mو بزرگ نمایی ۵۰۰۰ تاثیر آمفوتریسین B بر *کاندیدا گلابراتا*

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که عصاره متانولی *رومکس آلوئولاتوس* اثر مهاری بر رشد ایزوله های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* مورد نظر دارد. حداقل غلظت مهاری عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* بر روی*کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* به ترتیب ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از روش انتشار در چاهک در تحقیق حاضر عصاره ی متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* قطر هاله ممانعت از رشد قابل قبولی را ایجاد نمود که نشان دهنده ی اثر مهار کنندگی عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* می باشد. در عصاره متانولی، قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۵۰ تا ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر علیه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *پاراپسیلوزیس* مشاهده شد و در همه ی موارد با کاهش غلظت، قطر هاله ممانعت از رشد کاهش داشت. به منظور مقایسه مقادیر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف عصاره متانولی علیه کاندیدا *آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* از آزمون کراسکال والیس استفاده شد و در هر سه نمونه *کاندیدا* تفاوت معناداری بین قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف مشاهده گردید (P<۰/۰۵). واتنب در سال ۱۹۹۶ گزارش کرد که فلاونوئیدها و فلاونول ها اثر ضد میکروبی دارند. این اثر احتمالا" ناشی از ترکیب پروتئین های خارج سلولی و یا تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و یا ایجاد اختلال در غشاء سلول میکروارگانیسم ها است (۱۵). در مطالعه ی حاضر احتمال می رود خاصیت ضد *کاندیدایی* گیاه *رومکس آلوئولاتوس* هم به دلیل حضور ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره باشد که با تاثیر بر غشاء سلولی مخمر باعث از بین رفتن و مرگ هر سه نوع *کاندیدا* می شود. پینتو در سال ۲۰۰۶ گزارش کرد که شواهدی وجود دارد که نشان می دهد عصاره ها اثرات ضد قارچی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می کنند. بررسی های صورت گرفته در خصوص مکانیسم عمل عصاره ها اثبات نموده است که این ترکیبات نفوذ پذیری غشاء را افزایش می دهند. اجزای عصاره با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آن را تحت تاثیر قرار می دهند و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد. به نظر می رسد عصاره های گیاهی مانند سایر پلی ان های ضدقارچ با تشکیل پیوند با ارگسترول در غشاء سلول قارچ یک کانال غشایی ایجاد می کند که موجب نشت یون های تک ظرفیتی از عرض غشاء شده است (۱۶). با مقایسه نتایج حاصل از مطالعه پینتو و بر اساس نتایج حاصل از اندازه گیری سدیم، پتاسیم، گلوکز و اسیدآمینه در این پروژه ی تحقیقاتی، میتوان نظریه ی پینتو را در خصوص مکانیسم عمل عصاره ها در ارتباط با افزایش نفوذ پذیری غشاء که در سال ۲۰۰۶ ارائه نموده تایید کرد. پورعمادی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بذر گیاه *رومکس کیپریوس* را به روش GC/MS مورد بررسی قرار دادند. یافته ها نشان داد، مهمترین و بیشترین ترکیبات شیمیایی جدا شده عبارتند از: ۱و۲-بنزن دی کربوکسیلیک اسید، دی ایزو استیل استر و ۱-۴ سیکلو هگزادین است که مقدار آن ها به ترتیب برابر است با ۲۵/۲۴، ۱۹/۱و ۱۴/۸ درصد. وجود ترکیبات فنولی در بذر

این گیاه با خاصیت ضد باکتریایی این گیاه ارتباط مستقیم دارد (۱۷). خاصیت ضد میکروبی گیاهان خانواده *رومکس*، عموما" به دلیل وجود ترکیبات فنولی، ساپونین، فلاونوئیدهای موجود در ساختار آن ها است و برخی از این عوامل روی غشاء پلاسمایی یا روی مهار آنزیم های ساختاری غشاء سلولی میکروارگانیسم ها موثر است و می تواند خواص ضد میکروبی خود را اعمال نمایند (۱۸). در تحقیق حاضر میتوان نظریه ی حقیقی که در سال ۱۳۹۰ ارائه شده است را با تصاویر گرفته شده از میکروسکوپ الکترونی رویشی تایید کرد. کومار و همکاران در سال ۲۰۱۱ اعلام کردند که عصاره متانولی برگ های گیاه *رومکس نپالنسیس* بر علیه باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلای*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس سرئوس* و قارچ های *کاندیدا آلبیکنس*، *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* قدرت مهارکنندگی دارد و قطر ناحیه ی ممانعت از رشد به ترتیب ۹/۰، ۱۲/۰، ۰/۰، ۸/۱۰ ، ۱۰/۰، ۱۰/۰و۱۱/۰ میلی متر است (۱۹). در تحقیق حاضر عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* نیز فعالیت مهار کنندگی بر علیه *کاندیدا آلبیکنس* ، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* را نشان داد که با نتایج کومار و همکاران مشابهت دارد. کیم و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM نحوه ی تاثیر داروهای ضدقارچی فلوسیتوزین و آمفوتریسین B را نشان دادند. با مقایسه نحوه عملکرد و مهار این داروها با عصاره های گیاهی مشخص شد که هر دو عمل یکسانی دارند. با توجه به عوارض سنگین داروهای ضد قارچی شیمیایی برای بیماران و نیز مکانیسم عمل مشابه داروهای گیاهی با این داروها، شاید در آینده ای نه چندان دور این داروهای مضر برای انسان با داروهای گیاهی سازگار با فیزیولوژی انسان جایگزین شوند (۲۰). در تحقیق حاضر تاثیر عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* بر روی *کاندیدا گلابراتا* توسط میکروسکوپ الکترونی SEM تایید و به وضوح تخریب دیواره سلولی و ایجاد چروکیدگی و سوراخ در *کاندیدا گلابراتا* در مواجهه با عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* مشاهده شد. رائو و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که خانواده *رومکس* دارای درصد بالایی از ساپونین ها هستند، لذا احتمال می رود ساپونین موجود در گیاه *رومکس آلوئولاتوس* از طریق واکنش با استرول های قارچ باعث تجمع مولکول های استرول دور هم شده در نتیجه سوراخ هایی در غشاء ایجاد می شود که از طریق آن سیتوپلاسم به بیرون نشت می کند و باعث از بین رفتن قارچ ها می شود (۲۱). در تحقیق حاضر تغییراتی که عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* بر قارچ *کاندیدا گلابراتا* ایجاد کرده و در نهایت سبب مهار رشد آن ها شده بود با تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM تایید نمود. صادق زاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب هاله عدم رشد ۱۲/۵و ۲۰/۶۷ میلی متر بود (۲۲). در پروژه ی تحقیقاتی حاضر، غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی *رومکس آلوئولاتوس* هاله عدم رشد بر علیه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* به ترتیب برابر با ۱۵/۲۴، ۱۳/۲۰ و ۱۲/۱۶ بود. یکی از مواردی که ممکن است در اختلاف نتایج موثر باشد، می توان به نوع سوش قارچ مورد مطالعه و اختلافات ژنتیکی احتمالی آن ها با یکدیگر اشاره نمود. این اختلافات در سطح ژن می تواند باعث بروز فنوتیپ های مختلف در آن ها شود، بنابراین نوع سوش مورد استفاده در پژوهش های مختلف می تواند یکی از عوامل تاثیرگذار در اختلاف نتایج باشد (۲۳). مرادی در سال ۲۰۱۵ بر روی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* مطالعه ای داشت که نشان داد در این گیاه ترکیباتی مانند فلاونوئیدها و گلیکوزیدها

و قندهای احیاء کننده و آنتراکینون و تانن و آلکالوئیدها وجود دارد (۲۴). بر همین اساس در تحقیق حاضر می توان تاثیر گذاری عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* بر روی *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* را وجود متابولیت های ثانویه ای که در پژوهش مرادی اعلام شده است دانست. مطابق تحقیقات صورت گرفته پلی فنل ها از جمله تانن ها، آنتراکینون ها و ترکیبات فلاونوئیدی دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی بر روی میکروارگانیسم های مختلف می باشند. نورصباغی در سال ۲۰۱۶ گزارش کرد که با توجه به اسید اگزالیک موجود در گیاه *ترشک* استفاده زیاد و مداوم آن می تواند باعث تولید سنگ کلیه و مثانه شود. همچنین این گیاه با افزایش تولید ادرار در پایین آوردن وزن بدن موثر است که این کاهش وزن در بیماری های انگلی باعث مرگ و میر حیوانات می شود. هر چند گیاه *رومکس آلوئولاتوس* فعالیت ضد *کاندیدایی* را بر علیه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* نشان داد ولی با توجه به خطر ایجاد سنگ کلیه و مثانه که توسط نورصباغی در مورد *ترشک* بیان شد، باید تحقیق بیشتری از نظر بالینی صورت پذیرد (۹).

با توجه به مطالعات ذکر شده گیاه *رومکس آلوئولاتوس* دارای خاصیت ضد قارچی می باشند اما تا به حال بر روی مکانیسم اثرات ضدقارچی این گیاه هیچ مطالعه ای صورت نگرفته است، لذا بررسی مکانیسم اثر عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* برعلیه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* برای اولین بار در جهان انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت عصاره گیاه مورد بررسی، قطر هاله عدم رشد افزایش می یابد. این روند تاثیر بر روی گونه های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* حکایت از این دارد که عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* دارای اثر ضدقارچی بر روی گونه های مختلف *کاندیدا* می باشد. در این مطالعه میزان بالای غلظت سدیم و پتاسیم در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر می توان این توجیه را به کار برد که به نظر می رسد از این غلظت به بالا قارچ رشدش را از دست می دهد و به آرامی به سوی مرگ پیش می رود و باعث افزایش در خروج سدیم و پتاسیم از دیواره ی سلولی قارچ و افزایش غلظت سدیم و پتاسیم در محیط می شود. پس عصاره متانولی گیاه *رومکس آلوئولاتوس* تاثیر به سزایی بر روی گونه های مختلف *کاندیدا* دارند. با توجه به افزایش وجود اسیدآمینه، سدیم، پتاسیم و گلوکز در محلول های مورد بررسی به نظر می رسد، عصاره ها مکانیسم مشابهی با مکانیسم اثر آمفوتریسین B دارد. می توان مکانیسم اثر عصاره متانولی گیاه مدنظر را چنین بیان کرد که این عصاره بر روی غشاء سلولی قارچ اثر گذاشته به نحوی که باعث تشکیل فرورفتگی های کاسه ای شکل و چین خوردگی هایی در سطح داخلی غشاء می شود و نفوذپذیری غشاء را افزایش داده و باعث نشت یون های تک ظرفیتی از عرض غشاء می شود. تخریب دیواره ی سلولی قارچ منجر به نشت محتویات سلولی به خارج و در نتیجه مرگ سلول قارچی می شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره ی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به انجام رسیده است و دارای کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۴۱۰۱۰ می باشد. بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از جناب آقای دکتر خلیلیان و پرسنل گرامی آزمایشگاه دکتر خلیلیان به دلیل همکاری و یاری رساندن در انجام این تحقیق ابراز می دارم.

References

1. Shadzi SH. Medical mycology. Esfahan university press. 2010; 43-59.
2. behzadi rad A, salehi sirjani M, madani M. In vitro inhibitory effects of Rhus Coriaria aqueous and alcoholic extracts on Candida Albicans. Complementary Medicine Journal of faculty of Nursing & Midwifery. 2015; 5(1): 1105-1205.
3. Aminian N, Dehghan P, Chadeganipuor M, Sajadi E, Yazdi M. Antifungal Effect of Echinophora Platyloba Essence against the Candida Species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis, Compared with Fluconazole. J Isfahan Med Sch 2014; 32(30): 1646-58.
4. Ramawat KG, Merillon JM.. Biotechnology; Secondary Metabolites .2007. 2 nd edition: Scien Publisher , NH, USA,586.
5. Freiesleben S, Jäger A. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms–a review. Medicinal and Aromatic Plants. 2014; 3(2):1-6.
6. Soltani H, Salouti M, Shokri R. The Antifungal Effect of Silver, Copper Nanoparticles, and Their Combination and in combination with Amphotericin B against Candida albicans In Vitro and in Animal Model. Qom University of Medical Sciences Journal. 2018; 11(12): 17-24.
7. Ghazizadeh K. Anti fungal drugs & flight. EBNESINA- Journal of Medical. 2007; 10 (1): 5-50.
8. Ghahreman A. Plant systematics: cormophytes of Iran. Tehran: Iran University Press 720p.
9. Nursabaghi F, Abedinzade M, Jalallou N. Evaluation the effect of Rumex alcoholic extract against cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major in Balb/c mice. Razi Journal of Medical Sciences. 2016; 23(148): 28-35.
10. Wegiera M, Kosikowska U, Malm A, Smolarz H. Antimicrobial activity of the extracts from fruits of Rumex L. species. Open Life Sciences. 2011; 6(6): 1036-1043.
11. Muhammad T, Hassan M, Sohail IR, Ijaz F, Gul F, Asma MA, Hassan S, Ahmad Z. In-vitro Antibacterial Study of Stem Extract of Rumex dentatus Against Different Bacterial Pathogenic Strains. J Agric Environ Sci. 2014; 14(3): 199-202.
12. Mohammadi-Sichani M, Sadeghzadeh P, Madani M. Evaluation of Antibacterial Activity of Extract of Rumex alveollatus Leaf against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2013; 15(6): 58-61.
13. Husein AI, Al-Nuri MA, Zatar NA, Jondi W, Ali-Shtayeh MS. Isolation and antifungal evaluation of Rumex cyprius Murb Extracts. Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 2012; 6(6): 547-555.
14. Tonny TS, Sultana S, Siddika F. Study on medicinal uses of Persicaria and Rumex species of polygonaceae family. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2017; 6(6): 587-600.
15. Watanbe H, Miyaji C, Makino M, Abo T. Therapeutic effects of glycyrrhizin in mice infected with LP-BM5 murine retrovirus and mechanisms involved in the prevention

of disease progression. Biotherapy. 1996; 9(4): 200-209.

16. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. Journal of medical microbiology. 2006; 55(10): 1367-1377.
17. Pouremadi F, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. Antibacterial Activity of Rumex cyprius Seeds Against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Majallah-i Dānishgāh-i ʻUlūm-i Pizishkī-i Qum. 2017; 11(2):56-65.
18. Haghighi F, Roudbar Mohammadi S, Soleimani N, Sattari M. Evaluation of antifungal activity of essential oils of Thymus vulgaris, Petroselinum Crispum, Cuminum cyminum and Bunium persicum on candida albicans in comparison with Fluconazole. Pathobiology Research. 2011; 14(1): 29-35.
19. Kumar SU, Lincy Joseph L, George MA, Bharti VI. Antimicrobial activity of methanolic extracts of Rumex nepalensis leaves. Int J Pharm Pharm Sci. 2011; 3(4): 240-242.
20. Kim KS, Kim YS, Han I, Kim MH, Jung MH, Park HK. Quantitative and qualitative analyses of the cell death process in Candida albicans treated by antifungal agents. PLoS One. 2011 ;6(12): 28-176.
21. Rao KN, Ch S, Banji D. A study on the nutraceuticals from the genus Rumex. 2011; 3(1): 76-88.
22. Rika PS, Ebrahimi K. The Inhibitory Effect of the Ethanol and Methanol Extracts Of Leaf and Stem of the Rumex Alveolatus against the Candida Albicans and Rhizopus Oryzae. Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki va Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz. 2016;38(3):72-77.
23. Falahati M, Fateh R, Sharifynia S, Kanani A, Memar AR, Hashem Dabbaghiyan F. Anticandidal effects of shallot extracts against chronic candidiasis agents. Razi Journal of Medical Sciences. 2012; 19(100): 22-28.
24. Moradi A, Ebrahimipour G, Karkhane M, Marzban A. Surveying the Antioxidant and the Antimicrobial Effects of Aqueous and Ethanolic Extract of Rumex Alveollatus L. on In-vitro Indicator Microorganisms. Journal of Fasa University of Medical Sciences/Majallah-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki-i Fasa. 2015; 4(4): 23-30.

The mechanism of action of methanolic extract of *Rumex alveolatus* on the membranes of *Candida albicans, Candida paraposilosis* and *Candida glabratata*

Ghayour Najafabadi N[1], Madani M[2]

1. MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Assistant Professor, PhD in Mycology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, mmadani66@gmail.com

Received: *10 Jan 2019* Accepted: *2 Feb 2019*

Abstract

***Background*:** Candidiasis is a common fungal disease that is caused by different species of genital herpes and involves various parts of the body. These infections can be fatal in light of the host's immune status. Following the advancement of science and the importance of the health sector in societies, the use of chemical drugs has increased. However, due to side effects, high prices and the complex process of production of chemical drugs, medicinal plants have been considered as possible treatments. The aim of this study was to investigate the mechanism of action of methanolic extract of *Rumex alveolatus* on membranes of some *Candida* species.

Materials and Methods: First, the methanolic extracts of the stem and leaves of *Roumex alveolatus* were prepared by the Soxhlet method. The antifungal effect of methanolic extract was determined by the Wells and MIC method. In order to compare the mechanism of the effect of this plant with amphotericin B, the glucose value was determined by an autoanalyzer, sodium and potassium levels using a flame photometer apparatus, and amino acids were identified by HPLC in a medium containing extract of plant and *candida*.

Results: The highest diameter of zone of inhibition of *Candida* yeast was methanol extract at a concentration of 250 mg / ml. The results showed that the mean concentration of sodium, potassium and glucose in different species of *Candida* was significantly different from that of methanol extract compared to amphotericin B. Most of the free amino acids were glutamine, threonine, and alanine.

Conclusion: This herbal extract has a mechanism similar to that of amphotericin B and could be a suitable alternative for high-dose chemical drugs. However, the potential side effects of the plant need to be checked.

Keywords: Methanolic Extract, *Rumex alveolatus*, SEM, HPLC, *Candida*

Citation: Ghayour Najafabadi N, Madani M. The mechanism of action of methanolic extract of Rumex alveolatus on the membranes of Candida albicans, Candida paraposilosis and Candida glabratata. Yafte. 2019; 21(1):75-88.