Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم - شماره ۸۲
شهریور ۱۳۸۸

وصول: ۸۷/۱۲/۱۸
آخرین اصلاحات: ۸۸/۳/۵
پذیرش: ۸۸/۶/۱۶

بررسی اثرات ضدکاندیدایی و ایمونومدولاتوری اسانس و عصاره‌های گیاه رازیانه (Foeniculum Vulgare Mill) در شرایط آزمایشگاهی (In Vitro)

نویسندگان: دکتر علیرضا نائینی[۱]، دکتر علیرضا خسروی*[۲]، دکتر حسن تاجبخش[۳]، دکتر طوبی غضنفری[۴]، و دکتر رویا یارائی[۴]

۱. استادیار گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد
۲. استاد مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۳. استاد میکرب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۴. دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

نویسنده مسئول: *E-mail: khosravi@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: دانه رازیانه در طب سنتی به طور وسیعی استفاده شده و در غذا مصرف فراوانی دارد. در کتب طب سنتی از تخم رازیانه به عنوان چاشنی در غذا، بادشکن، ضدمیکرب و ضدانگل نام برده شده است. با توجه به ویژگی‌هایی رازیانه، اثرات ضدکاندیدایی عصاره‌های آبی، الکلی، استونی و اسانس دانه رازیانه روی مخمر کاندیداآلبیکنس و همچنین با توجه به نقش ماکروفاژها در ایمنی ذاتی، اثرات عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی دانه رازیانه برروی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: برای بررسی اثرات ضدکاندیدایی اسانس و عصاره‌های دانه رازیانه از روش دیسک‌گذاری و آزمایش رقیق‌سازی در براث استفاده شد. برای سنجش اثرات ایمونومدولاتوری عصاره های دانه رازیانه از آزمایش‌های MTT، NO و برای بررسی کشندگی مخمر کاندیدا آلبیکنس توسط ماکروفاژ صفاقی موش از آزمایش‌هایNBT و کشندگی (Killing) استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فعالیت ضد کاندیدایی اسانس دانه رازیانه قوی بوده و اثرات ضدکاندیدایی آن (MIC و MFC) به‌ترتیب ۳۰۰ و ۳۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر است. از طرفی تولید نیتریک‌اکساید در ماکروفاژهای صفاقی که با عصاره استونی رازیانه در غلظت ۱۰mg/ml تیمار شده بودند، افزایش معناداری نشان داد ($P<0/02$). همچنین تولید ROS (Reactive Oxygen Species) در محیط دارای عصارهٔ استونی رازیانه افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<0/001$). بررسی کشندگی نیز نشان داد که ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml افزایش فعالیت ضدکاندیدایی بیشتری نسبت به گروه کنترل داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که اسانس رازیانه دارای اثرات ضدکاندیدایی قوی است. از طرفی با توجه به اثرات ایمونومدولاتوری عصارهٔ استونی رازیانه بر تحریک ماکروفاژهای صفاقی موش و تولید نیتریک‌اکساید و ROS و کشندگی کاندیدا آلبیکنس، لازم است تا مطالعات بیشتری بر روی مدل های حیوانی و انسانی جهت روشن شدن ترکیبات موثر آن بر بیماری کاندیدیازیس صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: رازیانه، کاندیدا آلبیکنس، ایمو نو مدولاتور

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

مقدمه

رازیانه یا بادیان سبز با نام علمی Foeniculum Vulgare Mill متعلق به گیاهی است علفی دو یا چند ساله ازخانواده چتریان (Umbelliferae) به ارتفاع تا دو متر دارای برگ‌هایی با بریدگی‌های زیاد، به‌طوری که به صورت نخی شکل درآمده‌اند. همهٔ قسمت‌های گیاه معطر بوده و قسمت مورد استفادهٔ گیاه معمولاً میوه یا دانه‌های کوچک آن است [۱].

دانهٔ رازیانه در طب سنتی به عنوان ضدنفخ معروف است و به عنوان طعم‌دهنده در شکلات، لیکورها، دارو و غذا مصرف می‌شود [۱و۲]. اثرات مهم آن عبارتند از ضدنفخ، ضداسپاسم، آنتی‌سپتیک، خلط‌آور، قاعده‌آور و در طب عوام به عنوان زیاد کنندهٔ شیر مصرف دارد [۲]. مصرف این گیاه در حد دارویی دارای عارضه نبوده، اما مصرف بیش از حد آن ممکن است باعث استفراغ یا حساسیت فوری شود [۲].

میوه‌ها یا همان دانهٔ رازیانه حاوی دو تا شش درصد اسانس بوده که مهم‌ترین ترکیبات آن شامل پنجاه تا هشتاد درصد ترانس آنتول (Trans Anethol)، لیمونن (Limonene) پنج درصد و فنچون (Fenchone) هشت درصد است [۲]. رازیانه از نظر طبیعت طبق نظر حکمای طب سنتی، گرم و خشک بوده و خواص آن در مجموع بازکنندهٔ گرفتگی‌ها، انسداد مجاری سینه، کبد، طحال، کلیه و مثانه است. همچنین در کتب طب سنتی گفته شده که تخم رازیانه محرک و مقوی معده و بادشکن و قاعده‌آور است و روغن تخم آن خاصیت کرم‌کشی و ضدانگلی دارد [۱].

در دهه‌های اخیر، عفونت‌های ناشی از قارچ فرصت‌طلب کاندیدا که گونه‌های مختلف آن مانند کاندیدا آلبیکنس باعث ایجاد آن می‌شود، از افزایش چشمگیری در میزان بروز بیماری برخوردار شده‌اند [۳و۴]. محدودیت‌هایی در درمان بیماری‌های قارچی از قبیل تعداد کم و گران بودن داروهای ضدقارچی، عوارض جانبی آن‌ها و نیز مقاومت دارویی یا کاهش حساسیت قارچ‌ها به این داروها موجب شده تا توجه پژوهشگران به جست و جو در رابطه با داروهای ضدقارچی جدید به‌خصوص گیاهان دارویی معطوف شود [۶و۵].

کاندیدیازیس بدون شک یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های قارچی فرصت‌طلب در انسان است که به‌صورت حاد، تحت حاد و مزمن در پوست، ناخن، مخاط واژن، ریه و دستگاه گوارش یا به‌صورت سیستمیک همراه یا سپتی‌سمی، اندوکاردیت و مننژیت مشاهده می‌شود. مهم‌ترین عامل بیماری، مخمر کاندیدا آلبیکنس است که ساکن طبیعی دستگاه گوارش، مخاط دهان و واژن بوده و در شرایط مستعد می‌تواند ایجاد بیماری کند [۳و۴]. بیمارانی که برای درمان کورتون‌تراپی، شیمی درمانی و آنتی‌بیوتیک تراپی می‌شوند افرادی هستند که در معرض خطر کاندیدیازیس منتشره هستند [۷].

ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی بر ضدعفونت‌های قارچی پاتوژن است. ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها از جمله سلول‌هایی هستند که در پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی نقش بسیار مهمی را بر عهده دارند و سلول‌های اجرایی مهمی برای تخریب عوامل مهاجم هستند. ماکروفاژهای فعال می‌توانند با ترشح انواع مدیاتورها سبب فعال شدن سلول‌های B و T شوند. نیتریک اکساید (NO) از جمله مواد فعالی است که از ماکروفاژهای فعال شده، ترشح می‌شود. NO می‌تواند به تنهایی یا همراه با سایر عوامل با مکانیسم‌های مختلفی سبب از بین بردن سلول‌های مهاجم شود [۸]. ماکروفاژها نقش مهمی در دفاع ایمنی ذاتی بر علیه عفونت‌های کاندیدایی به‌خصوص کاندیدیازیس منتشره دارند [۷].

در این مطالعه با توجه به ویژگی‌هایی که برای رازیانه عنوان شد، اثرات ضدکاندیدایی عصاره‌های آبی، الکلی، استونی و اسانس دانهٔ رازیانه روی مخمر کاندیدا آلبیکنس و همچنین با توجه به نقش ماکروفاژها در ایمنی ذاتی، اثرات عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی دانهٔ رازیانه روی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نحوه جمع‌آوری گیاه

دانهٔ گیاه رازیانه شیرین زیر نظر کارشناس هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی از عطاری معتبر خریداری شد.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

سویهٔ استاندارد قارچ

قارچ مخمری کاندیدا آلبیکنس سویهٔ PTCC=۵۰۲۷ (ATCC=۱۰۲۳۱) از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ‌های بیماری زای سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

روش‌های استخراج عصاره‌ها و اسانس

روش تهیه اسانس

تهیه اسانس به روش تقطیر با آب (Hydrodistilation) انجام گرفت [۲و۹]. مقدار صد گرم دانهٔ رازیانه را با آسیاب برقی خرد کرده و به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس‌گیری (کلونجر مدل دارونامهٔ بریتانیا) ریخته و پس از اضافه کردن هفتصد میلی‌لیتر آب مقطر، دستگاه را روشن کرده تا به‌مدت دو ساعت جریان تقطیر برقرار شود. پس از اتمام اسانس‌گیری، اسانس در شیشه رنگی تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

روش تهیهٔ عصارهٔ اتانلی و استونی

عصاره‌گیری به روش خیساندن (Maceration) و با استفاده از حلال اتانل و استون صورت گرفت. مقدار صد گرم از دانهٔ رازیانه پس از آسیاب کردن، درون ظروف عصاره‌گیری ریخته شده و به میزان چهار برابر وزن گیاه حلال استون (صد درصد) و یا اتانول(هشتاد درصد) اضافه شده و مدت سه الی چهار روز روی شیکر در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس محلول به‌دست آمده توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شده و درون بن ماری $^{\circ}$C۶۵-۶۰ برای تبخیر حلال قرار داده‌شد. عمل تغلیظ تا رسیدن به حدود پنج درصد مقدار اولیهٔ هر عصاره ادامه یافت [۲و۹].

پس از اتمام عصاره‌گیری، ماده به‌دست آمده را توزین کرده و درون شیشه مات ریخته و تا هنگام مصرف در یخچال نگهداری شد. بر این اساس از صد گرم وزن خشک دانهٔ رازیانه به‌ترتیب ۴/۱ و ۴/۴ گرم عصارهٔ اتانلی و عصارهٔ استونی به‌دست آمد.

روش تهیهٔ عصارهٔ آبی

میزان لازم از دانهٔ رازیانه آسیاب شده (صد گرم) را داخل ظرف عصاره‌گیری ریخته و چهار برابر آن آب مقطر اضافه شد. ظرف موردنظر روی حرارت ملایم قرار گرفته به‌طور دائم مخلوط شده تا اولین نشانه‌های جوشیدن دیده شود. پس از جوشاندن محلول به مدت پانزده دقیقه، صاف شده (کاغذ صافی واتمن ۴۲) و با استفاده از دستگاه لیوفلیزاتور به مدت ۹۶ ساعت در دمای منهای $^{\circ}$C۵۰ و mbar ۰/۰۴ لیوفلیزه شد. بر این اساس از صد گرم وزن خشک دانهٔ رازیانه، ۲/۶ گرم عصارهٔ آبی به‌دست آمد.

این توضیح لازم است که برای تهیهٔ محلول کار از حلال‌های دو درصد Dimthlsulfoxide (شرکت مرک) برای اسانس و از آب مقطر برای عصاره اتانلی و آبی و از Tween 20 دو درصد (شرکت مرک) برای عصارهٔ استونی استفاده شد. در انتها تمامی محلول‌های به‌دست آمده از صافی استریل کننده (۰/۰۲m) عبور داده شد. مبنای تعیین غلظت هر یک از عصاره‌ها بر ماکروفاژ، براساس آزمایشات اولیه و تحقیقات مشابه صورت گرفت.

در ضمن برای جلوگیری از عوامل مخدوش‌کننده در تحقیق، بی‌تأثیر بودن حلال‌ها روی سویه قارچ و ماکروفاژ در غلظت‌های ذکر شده، مورد آزمایش قرار گرفت.

آزمایشات اثرات ضدکاندیدایی دانهٔ رازیانه

آزمایش دیسک‌گذاری (Disc diffusion method)

اصول کار در این آزمایش براساس روش استاندارد (NCCLS ۱۹۹۷) انجام شد [۱۰].

در آزمایش دیسک‌گذاری، سوسپانسیون تهیه شده از کشت تازهٔ کاندیدا آلبیکنس ۴۸-۲۴ ساعته در آب مقطر (به کدورت معادل نیم مک فارلند) با استفاده از سوآب پنبه‌ای استریل، روی سطح پلیت به‌طور یکنواخت تلقیح شد و از محلول کار اسانس و عصاره‌ها (عصارهٔ پایه) مقدار سی میکرولیتر روی دیسک‌های بلانک که وسط پلیت گذاشته شده بود، ریخته شد. پلیت‌ها در گرمخانه $^{\circ}$C۳۵ به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شده و پس از گذشت زمان موردنظر، تشکیل منطقهٔ ممانعت از رشد قارچ با خط‌کش اندازه‌گیری شده و نتایج حاصل در جداول مربوطه وارد شد.

برای آزمایش کنترل مثبت از دیسک‌های دو داروی آمفوتریسین B (ده میکروگرم) و کتوکونازول (پانزده میکروگرم) خریداری شده از شرکت انگلیسی Master Group استفاده شد. طبق نظر شرکت مذکور قطر

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

هاله ممانعت از رشد شانزده میلی‌متر به بالا به‌عنوان حساس، بین ده تا چهارده میلی‌متر، وابسته به دوز و کمتر از ده میلی‌متر به‌عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. در مورد کتوکونازول نیز قطر هاله ۲۸ میلی‌متر به‌عنوان حساس به دارو، بین۲۷-۲۱ میلی‌متر وابسته به دوز و کمتر از بیست میلی‌متر مقاوم در نظر گرفته شد.

آزمایش رقیق‌سازی در براث
(NCCLS macrodilution method)

با استفاده از روش استاندارد رقت لوله‌ای اصلاح شده حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ MIC (Minimum Inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی MFC (Minimum Fungicidal Concentration) اسانس رازیانه تعیین شد [۱۱].

آماده‌سازی مادهٔ تلقیحی

ماده مورد تلقیح (کاندیدا آلبیکنس) با شماره PTCC=۵۰۲۷ (ATCC=۱۰۲۳۱) پس از کشت در محیط سابورودکستروز در گرم‌خانه $35^{\circ}C$ به‌مدت ۴۸ ساعت تهیه شد. برای تهیهٔ سوسپانسیون تلقیحی از کلنی‌های رشد کرده که دست‌کم دارای یک میلی‌متر قطر بودند با استفاده از آنس وارد دو میلی‌لیتر آب مقطر استریل و برای دقت در کار، با استفاده از لام هموسیتومتر تعداد مخمرها را شمارش کرده تا این‌که غلظت نهایی سوسپانسیون موردنظر به 1×10^{6} cfu/ml معادل ۰/۵ مک فارلند رسانده شد.

بررسی اثر حلال DMSO بر رشد کاندیدا آلبیکنس

برای تعیین اثر ممانعت‌کنندگی حلال دی متیل سولفوکساید بر رشد کاندیدا، آزمایش MIC و MFC روی مادهٔ موردنظر انجام گرفت و مشخص شد که این ماده در غلظت پایین‌تر از پنج درصد موجب ممانعت از رشد کاندیدا آلبیکنس نمی‌شود.

تهیهٔ محلول کار و رقت سریال از اسانس

یازده لوله آزمایش ۱۰۰× ۱۶ میلی‌متر استریل را برداشته و به لوله‌های یک تا یازده هر کدام یک میلی‌لیتر محیط سابورودکستروز براث دارای DMSO دو درصد اضافه شد و از اسانس مورد مطالعه رقت‌های سریال دو برابر در محدودهٔ غلظتی ۴۰-۰/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در این لوله‌ها تهیه شد.

از لوله شماره یک بعد از مخلوط کردن، یک میلی‌لیتر با سرسمپلر برداشته و به لوله شماره دو اضافه و با ورتکس خوب مخلوط کرده و سپس با سر سمپلر جداگانه یک میلی‌لیتر از لوله شماره دو برداشته و به لوله سه اضافه و با ورتکس خوب مخلوط کرده و به همین ترتیب تا لوله شماره نه ادامه دادیم. از لوله شماره نه بعد از مخلوط کردن، یک میلی‌لیتر برداشته و دور ریخته شد. به این ترتیب رقت سریال در محدوده غلظتی ۴۰-۰/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.

پنجاه میکرولیتر از مادهٔ قابل تلقیح استاندارد شده را به لوله‌های یک تا ده وارد کرده و به ملایمت به‌هم زده شد. لوله شماره یازده به‌عنوان کنترل کشت که دارای حلال، محیط کشت، و فاقد ماده تلقیحی بود (که نباید در آن رشدی دیده‌شود) و لوله شماره ده که دارای مادهٔ تلقیحی و بدون اسانس بود، انتخاب شد. سپس لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه قرار داده شد. MIC عبارت از پایین‌ترین غلظت دارویی است که در آن، هیچ رشد قابل مشاهدهٔ قارچی بعد از انکوباسیون دیده نشود. در محیط کشت کنترل نیز نباید رشدی صورت می‌گرفت و در لولهٔ مادهٔ تلقیحی کنترل باید رشد دیده‌می‌شد.

برای تعیین MFC از هر یک از لوله‌های MIC که به ظاهر مخمر در آن‌ها رشد نکرده بود، بیست میکرولیتر برداشته و به‌صورت یکنواخت در سطح پلیت‌های سابورو-دکستروز آگار کشت داده شد و بعد از ۴۸ ساعت دورهٔ انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد یا تا زمانی که رشد دیده شود، نگهداری کردیم. MFC پایین‌ترین غلظت دارو بوده که در آن هیچ رشد قابل ملاحظهٔ قارچی بعد از انکوباسیون دوبارهٔ کشت‌ها دیده نشده باشد. در مورد داروهای ضدقارچی آمفوتریسین B و کتوکونازول نیز اصول کار به صورت بالا بوده و برای انجام آزمایش به ترتیب، رقت‌های سریال دو مرتبه‌ای در محدوده ۱۶-۰/۰۱۶ μ g/ml و ۱۶-۰/۰۳ μg/ml میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

آزمایش‌های اثرات ایمونومدولاتوری عصاره‌های دانهٔ گیاه رازیانه

تهیهٔ حیوانات آزمایشگاهی (animals)

حیوانات مورد استفاده موش‌های نر BALB /c هشت تا ده هفته با وزن ۲۵-۱۸ گرم بودند که از آزمایشگاه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد خریداری شدند.

مواد (material)

در این مطالعه از محیط کشت RPMI 1640، سرم FBS برای کشت سلول و محلول پنج درصد MTT (۳- (۴/ ۵ دی‌متیل تیازول ۲-yl)-۲/ ۵ دی‌فنیل تترازولیوم بروميد) استفاده شد. تمام مواد و معرف‌های کشت سلول از نمایندهٔ اروپایی شرکت سیگما (sigma) و گیبکو (GIBCO) خریداری شد.

جداسازی ماکروفاژهای صفاقی (macrophage isolation)

موش‌ها با استفاده از پنبهٔ آغشته به دی‌اتیل‌اتر بیهوش شده، سپس تحت شرایط استریل با باز کردن پوست سینه بدون این‌که به پرده صفاقی آسیبی وارد شود با لاواژ سرم فیزیولوژی سرد از صفاق، سلول‌های صفاقی جمع‌آوری شدند.

سنجش اثر عصاره‌ها بر فعالیت ماکروفاژهای صفاقی (MTT assay)

سوسپانسیون سلولی به ترتیب با سرم فیزیولوژیک و با محیط RPMI 1640 شست‌شو داده شده و هر بار به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. پس از بیرون ریختن مایع رویی، در نهایت دو میلی‌لیتر محیط RPMI 1640 حاوی FBS (سرم جنین گاوی) ده درصد به سلول‌ها اضافه شد. با استفاده از لام نئوبار سلول‌ها شمارش شده و تعداد چهارصد هزار سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پلیت‌ها به انکوباتور $۳۷^{\circ C}$ حاوی پنج درصد Co_2 و ۹۵ درصد رطوبت منتقل شده و پس از دو ساعت برای حذف لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های نچسبیده، چاهک‌ها با سالین نرمال $۳۷^{\circ}C$ شست‌شو داده شدند. با استفاده از لام نئوبار و شمارش و محاسبه سلول‌های نچسبیده در شش چاهک معلوم شد که حدود پنجاه درصد سلول‌های ریخته شده در هر چاهک، ماکروفاژ بوده و همچنین با استفاده از رنگ‌آمیزی گیسما مشخص شد ۹۵ درصد سلول‌های چسبیده در هر چاهک، ماکروفاژ هستند [۸و۱۲].

برای سنجش اثر عصاره‌ها بر فعالیت ماکروفاژهای کشت داده شده، از عصارهٔ آبی و اتانلی رازیانه با غلظت‌های پنج، ده و بیست میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای عصارهٔ استونی با غلظت‌های ۰/۵، یک و ده میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. مبنای تعیین دوزها برای هر عصاره براساس آزمایش‌های اولیه بوده و برای هر دوز از هر عصاره چهار چاهک اختصاص یافت. در هر پلیت دو ردیف سه تایی به عنوان کنترل ماکروفاژ در نظر گرفته شد. همچنین برای هر یک از حلال‌های Dimthlsulfoxide و Tween 20 در غلظت دو درصد سه چاهک به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

پلیت‌ها به مدت بیست ساعت در انکوباتور با دمای $۳۷^{\circ C}$ وپنج درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند. پس از این مدت، پلیت از انکوباتور خارج شده و پنجاه میکرولیتر از مایع رویی سلول‌ها برای سنجش NO جمع‌آوری شد. سپس بیست میکرولیتر محلول پنج درصد MTT به سوسپانسیون اضافه و پلیت دوباره به مدت چهار ساعت به انکوباتور منتقل شد. سپس محیط رویی هر چاهک با سمپلر کشیده شده و به کریستال‌های باقی‌مانده، صد میکرولیتر محلول ایزوپروپانول اسیدی (اسیدکلریدریک چهار درصد نرمال در ایزوپروپانول) اضافه شد. پس از حل شدن کریستال‌های بنفش رنگ در مایع رویی، جذب نوری چاهک‌ها با دستگاه جذب‌سنج ELISA reader در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد [۸و۱۳].

اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید (Nitrite assay)

اصول کار براساس روش گریس انجام پذیرفت [۱۰و۱۱]. برای انجام کار، مایع رویی کشت‌ها که قبلاً جمع‌آوری شده بود، در حجم پنجاه میکرولیتر به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه الیزا اضافه شد. سپس پنجاه میکرولیتر سولفانیل آمید یک درصد در اسید فسفریک پنج درصد و پنجاه میکرولیتر NEDA یک درصد در اسیدفسفریک پنج درصد به هر چاهک اضافه شد. سپس تغییر رنگ حاصل شده با دستگاه جذب‌سنج

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

خواننده ELISA در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد [۱۴و۱۵].

سنجش اثر عصاره بر تولید ROS داخل سلولی (Intracellular Reactive Oxygen Species)

روش کار براساس آزمایش NBT (Nitroblue tetrazolium test) انجام پذیرفت [۱۶] مانند روش کار در آزمایش MTT، ماکروفاژها در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت شده و یکسری از ماکروفاژها با عصارهٔ استونی رازیانه (غلظت ۲۰mg/ml) تیمار شدند. همچنین برای تأثیر توأم میتوژن‌های LPS و fMLP با عصارهٔ استونی رازیانه، تعدادی از سلول‌های کشت شده در مجاورت میتوژن‌های LPS و fMLP به‌میزان ده میکرولیتر قرار گرفتند.

سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای $37^{\circ C}$ و رطوبت لازم و پنج درصد CO_2 نگهداری شد. پس از این مدت، پلیت از انکوباتور خارج شده و محیط کشت رویی سلول‌ها برداشت شده و به نسبت پنجاه درصد محیط RPMI 1640 و پنجاه درصد محلول NBT ۰/۱ درصد (استریل شده با فیلتر ۰/۲ میکرولیتر) به هر چاهک اضافه شده و پلیت برای مدت یک ساعت به انکوباتور برگردانده شد. در پایان یک ساعت مایع رویی سلول‌ها برداشت شده و سلول‌های کف پلیت را با استفاده از پیریدین (Pyridine) حل کرده وجذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت کشندگی ماکروفاژها بر علیه کاندیدا آلبیکنس (Killing)

بررسی میزان کشندگی ماکروفاژهای تیمار شده با عصارهٔ استونی رازیانه در غلظت‌های ۵mg/ml، ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml در مواجهه با مخمر کاندیدا آلبیکنس مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا براساس روش NCCLS مشخص شد که عصارهٔ استونی رازیانه در غلظت‌های ذکر شده، فاقد هرگونه اثر مستقیم ضدکاندیدایی است. سپس براساس روش شرح داده شده در آزمایش MTT، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت ماکروفاژهای تیمار شده با عصارهٔ استونی رازیانه، آن‌ها را به نسبت یک به ده (Target to effector) در معرض سویه مخمر کاندیدا آلبیکنس (ATCC=۱۰۲۳۱) به‌مدت یک ساعت در دمای $37^{\circ C}$ و پنج درصد CO_2 قرار داده و بعد از این مدت مایع رویی برداشته شده و پلیت با سرم فیزیولوژی دوبار شست‌شو داده شد. سپس با استفاده از آب مقطر استریل سرد، سلول‌ها لیز شده و هر چاهک با آب مقطر سه بار شست‌شو داده شد. برای اطمینان از انجام درست شست‌شو و لیز سلول‌ها از میکروسکوپ معکوس استفاده شد [۱۷و۱۸].

به منظور تعیین میزان فعالیت کشندگی ماکروفاژهای تیمار شده، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر چاهک به پلیت سابورود دکستروز آگار برده شد و درون انکوباتور در دمای $37^{\circ C}$ به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس CFU (Colony – Forming Units) هر پلیت تعیین و براساس فرمول زیر درصد کشندگی به‌دست آمد [۱۷].

Fungicidal activity = [1 - CFU experimental culture/CFU untreated] × 100

روش‌های آماری

برای به‌دست آوردن نتایج یکسان،آزمایش‌ها سه بار تکرار و نتایج براساس Mean ± SEM محاسبه شد. سپس با استفاده از آزمون t-test و آنالیز واریانس چندجانبه (Bonferroni) نتایج مورد بررسی قرار گرفته و معنادار بودن جواب‌ها در حیطه $P< ۰/۰۵$ به‌دست آمد.

یافته‌ها

اثرات ضدکاندیدایی اسانس و عصاره‌های رازیانه

نتایج حاصل از اثر اسانس روی کاندیدا آلبیکنس نشان داد که اسانس رازیانه دارای اثرات ضدکاندیدایی قوی است. علی‌رغم این‌که قطر هاله عدم رشد در آزمایش انتشار در آگار کم بوده (۱۸ میلی‌لیتر) با این حال MIC و MFC اسانس رازیانه به ترتیب ۳۰۰ و ۳۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد (جدول ۱).

همچنین نتایج حاصل از آزمایش دو داروی آمفوتریسین B و کتوکونازول روی مخمر کاندیدا آلبیکنس در جدول شماره یک آورده شده است. بر این اساس، MIC و MFC آمفوتریسین B دو و چهار میکروگرم در میلی‌لیتر و کتوکونازول چهار و چهار میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

جدول ۱. میزان اثرات ضدکاندیدایی اسانس و عصاره‌های دانه رازیانه و داروهای شیمیایی بر روی سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس

آزمایش / نوع ماده	NCCLS macrodilution		Disc diffusion
	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	Inhibition zone (mm)
اسانس	۳۰۰	۳۰۸	۱۸
عصاره آبی	–	–	–
عصاره اتانلی	–	–	–
عصاره استونی	–	–	–
آمفوتریسین B	۲	۴	۱۶
کتوکونازول	۴	۴	۳۰

جدول ۲. نتایج تأثیرغلظت‌های مختلف عصارهٔ آبی رازیانه بر فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی در آزمایش MTT.

آزمایش MTT / دوز دارو mg/ml	میانگین (mean)	انحراف معیار (SD)	Std Error	P-Value
۲۰	۰/۷۳۷	۰/۰۸۰	۰/۰۴۰	NS*
۱۰	۰/۷۹۴	۰/۱۶۶	۰/۰۸۳	NS
۵	۰/۷۸۳	۰/۱۵۵	۰/۰۷۷	NS
کنترل	۰/۸۷۱	۰/۱۴۰	۰/۰۵۷	–

* - NS= Not Significant (P<0.05)

براساس نتایج به‌دست آمده نیز مشخص شد که عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی گیاه رازیانه فاقد هرگونه اثرات ضدکاندیدایی مستقیم بودند (جدول ۱).

فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی

براساس نتایج به‌دست آمده مشخص شد که فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی تیمار شده با عصاره‌های آبی واتانلی دانهٔ رازیانه در غلظت‌های ۵ mg/ml، ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (جداول۲ و ۳). از طرفی فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی تیمار شده با عصاره استونی رازیانه نیز در غلظت‌های ۰/۵mg/ml، ۱mg/ml و ۱۰mg/ml در مقایسه با گروه کنترل افزایش نسبی داشته، اما این افزایش در هیچ‌یک از غلظت‌های مذکور معنادار نشد (نمودار ۱).

همان‌طور که در جداول شماره ۲ و ۳ و نمودار یک نشان داده شده است، میانگین جذب (OD) ماکروفاژهای تیمارشده با عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی رازیانه در آزمایش MTT با گروه کنترل اختلاف معناداری نشان نمی‌دهند. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که این عصاره‌ها در دوزهای فوق، فاقد خاصیت توکسیسیتی برای سلول‌های ماکروفاژ هستند.

جدول ۳. نتایج تأثیرغلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانلی رازیانه بر فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی در آزمایش MTT

آزمایش MTT / دوز دارو mg/ml	میانگین (mean)	انحراف معیار (SD)	Std Error	P-Value
۲۰	۰/۴۳۷	۰/۰۱۸	۰/۰۰۹	NS*
۱۰	۰/۴۵۸	۰/۱۱۵	۰/۰۵۷	NS
۵	۰/۳۷۶	۰/۰۹۲	۰/۰۴۶	NS
کنترل	۰/۵۳۲	۰/۰۹۴	۰/۰۴۲	–

* - NS= Not Significant (P<0.05)

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

اثر عصاره‌های دانهٔ رازیانه بر ماکروفاژهای صفاقی برای تولید نیتریک اکساید (NO)

همان‌طور که در نمودار دو مشاهده می‌شود، تولید NO در ماکروفاژهای صفاقی که با عصارهٔ استونی رازیانه (بدون حضور میتوژن) در غلظت ۱۰mg/ml تیمار شده بودند، افزایش معناداری را نشان داد (P< ۰/۰۲).

میانگین غلظت NO در این گروه تیمارشده با عصارهٔ استونی رازیانه ۱/۱ nmol بود، در حالی که میانگین غلظت NO در گروه کنترل ۰/۳۶ nmol است.

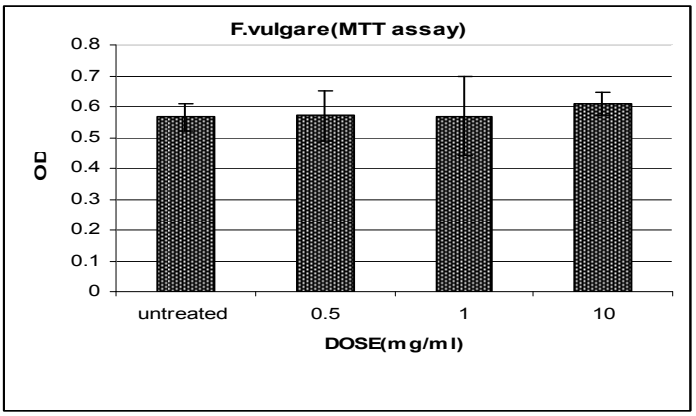
همچنین تولید NO در غلظت‌های ۰/۵mg/ml و ۱mg/ml عصارهٔ استونی رازیانه علی‌رغم افزایش نسبت به گروه کنترل، معنادار نشد (P<۰/۰۵). از طرفی تولید NO در ماکروفاژهای صفاقی که با عصارهٔ آبی و اتانلی با غلظت‌های ۵mg/ml، ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml تیمار شده بودند، افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (نمودار۳). بنابراین با توجه به نتایج بهتر عصارهٔ استونی رازیانه نسبت به سایر عصاره‌ها، این عصاره برای انجام آزمایش‌های NBT و Killing انتخاب شد.

اثر عصارهٔ استونی رازیانه بر ماکروفاژهای صفاقی برای تولید ROS

تولید ROS در ماکروفاژهای صفاقی که با عصارهٔ استونی رازیانه در غلظت ۲۰ mg/ml تیمار شده بودند، با استفاده از آزمایش NBT مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده از این آزمایش، مشخص شد که تولید ROS در محیط دارای عصارهٔ استونی رازیانه (فاقد میتوژن‌های fMLP و LPS) افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت (نمودار ۴). در حالی که، این پاسخ در محیط دارای عصارهٔ استونی رازیانه همراه با متیوژن‌های فوق نسبت به عصارهٔ تنها معنادار نبوده، اما نسبت به گروه کنترل معنادار بود (P<۰/۰۰۱). این افزایش در هر دو گروه حدود ۲۵ درصد نسبت به گروه کنترل بود. نمودار ۴ میانگین تولید ROS در گروه تیمار فاقد محرک را با گروه تیمار دارای محرک در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد.

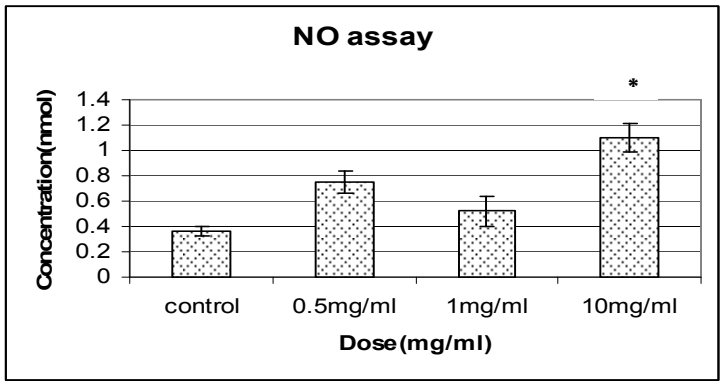
اثر عصارهٔ استونی رازیانه در میزان کشندگی مخمر کاندیدا آلبیکنس در ماکروفاژهای صفاقی

همان‌طور که اشاره شد، میزان تأثیر مستقیم عصارهٔ استونی رازیانه روی مخمر کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد عصارهٔ استونی رازیانه در غلظت‌های ۴۰mg/ml– ۰/۵ فاقد هرگونه اثر ضدکاندیدایی است. نتایج حاصل از مواجههٔ ماکروفاژ تحریک شده (با عصارهٔ استونی رازیانه) با کاندیدا آلبیکنس در نمودار پنج نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ماکروفاژهای تحریک‌شده در غلظت‌های ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml دارای افزایش فعالیت ضدکاندیدایی نسبت به گروه کنترل بودند (به ترتیب P< ۰/۰۳ و P<۰/۰۰۴).



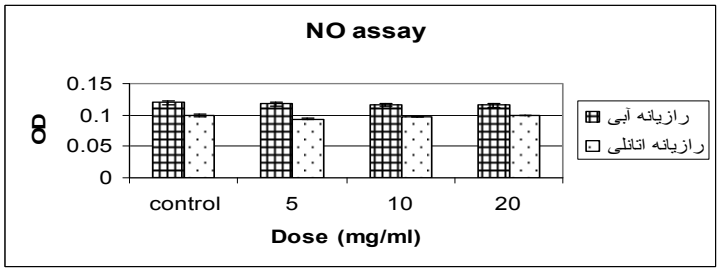
نمودار ۱. میانگین جذب نوری (OD) در آزمایش MTT با عصاره استونی رازیانه. سلول‌های ماکروفاژ صفاقی کشت داده شده در پلیت ۹۶ خانه‌ای با دوزهای متفاوتی از دارو تیمار شده و همراه با گروه کنترل فعالیت حیاتی آن‌ها با استفاده از آزمایش MTT بررسی گردید. نتایج نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه‌ها مشاهده نمی‌شود (P<0.05).

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018



نمودار ۲. میانگین غلظت NO با غلظت‌های مختلف عصاره استونی رازیانه در آزمایش گریس.

* معنادار در حیطه $P<0.05$.

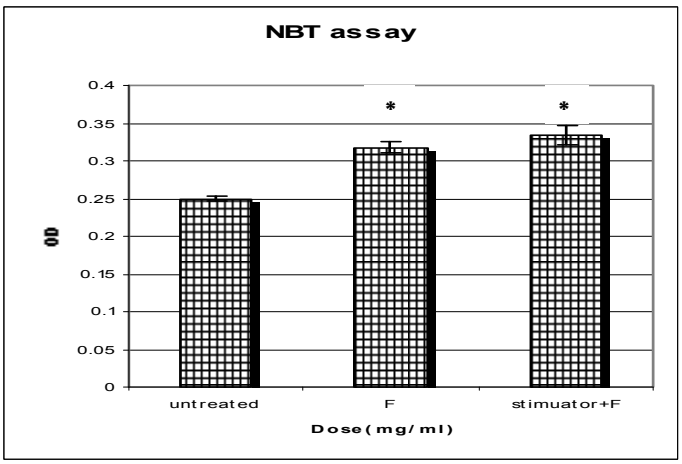


نمودار ۳. میانگین جذب نوری NO در غلظت‌های مختلف عصاره آبی و اتانلی رازیانه.

نتایج نمودار ۳ نشان می‌دهد که هیچ‌یک از عصاره‌ها در غلظت‌های تعیین شده سبب افزایش ترشح NO نسبت به گروه کنترل نشده‌اند.

نتایج نمودار ۴ نشان داد که عصارهٔ استونی رازیانه در غلظت ذکر شده همراه با محرک و بدون آن سبب افزایش NBT نسبت به گروه کنترل در حد معنادارشده است ($P<0.001$).

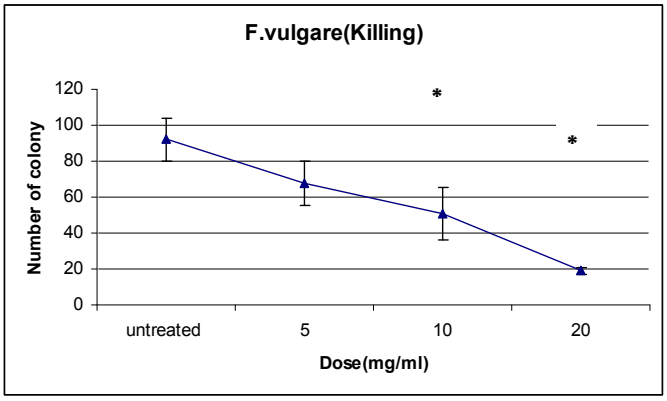
نتایج نمودار ۲ مشخص کرد که عصاره استونی رازیانه در غلظت ۱۰ mg/ml سبب افزایش ترشح NO نسبت به گروه کنترل شده است ($P<0.02$).



نمودار ٤. میانگین جذب نوری (OD) عصاره استونی رازیانه در آزمایش NBT با غلظت ۲۰mg/ml همراه با محرک LPS+fMLP و بدون محرک.

* معنادار در حیطه $P<0.05$.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018



نمودار ۵ میانگین تعداد کلنی‌های زندهٔ کاندیدا آلبیکنس در مواجهه با ماکروفاژهای تحریک شده با غلظت‌های مختلف عصاره استونی رازیانه.نتایج

* معنادار در حیطه $P<0.05$.

نمودار ۵ نشان می‌دهد درصد کشندگی ماکروفاژ ها در غلظت های ۱۰mg/ml و ۲۰ نسبت به گروه کنترل معنادار بوده است (به ترتیب $P<0.03$ و $P<0.004$). درصد کشندگی کلنی‌های مخمر کاندیدا آلبیکنس در غلظت ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml عصارهٔ استونی به ترتیب حدود ۷۲ و ۸۹ درصد بود که کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد و این نشان‌دهندهٔ افزایش قدرت کشتار است.

بحث

رازیانه گیاهی شناخته شده در طب قدیم است که اثرات مختلف آن شناسایی شده است. به‌طوری‌که تمدن‌های کهن مصر، هند، چین و یونان این گیاه دارویی را شناخته بودند و علاوه بر آن به‌عنوان چاشنی و طعم‌دهندهٔ غذا نیز مورد مصرف داشته و دارد. مهم‌ترین اثراتی که برای رازیانه در کتب طب سنتی عنوان شده، خاصیت ضدنفخ، ضداسپاسم، آنتی‌سپتیک، ضدانگل، خلط‌آور وزیاد کنندهٔ شیر است. مصرف رازیانه در حد دارویی دارای عارضه نبوده، اما مصرف بیش از حد آن ممکن است سبب استفراغ و حساسیت فوری شود [۱و۲].

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس دانهٔ رازیانه دارای اثرات ضدکاندیدایی قوی است. همچنین هدف دیگر این مطالعه، بررسی اثرات ایمونومدولاتوری عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی دانهٔ رازیانه است که نتایج نشان داد عصارهٔ استونی این گیاه دارای یک اثر تعدیل‌کنندهٔ وابسته به دوز روی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c است. از آنجا که نویسندگان تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات ایمونومدولاتوری عصارهٔ رازیانه روی ماکروفاژ مشاهده نکرده‌اند، مقاله حاضر می‌تواند در نوع خود جالب توجه باشد.

هر چند که تا به حال چندین مطالعه در مورد اثرات ضدقارچی و ضدمیکربی رازیانه انجام شده است، اما مطالعه‌ای در مورد کاندیدا آلبیکنس یافت نشد. از جمله این مطالعات، می‌توان به تحقیق Ozcan و همکاران در سال ۲۰۰۶ اشاره کرد. در طی این تحقیق، اثرات ضدقارچی رازیانه روی قارچ‌های فوزاریوم اکسی‌پروم (Fusarium oxyporum) و آلترناریا آلترناتا (Alternaria alternate) و رایزوکتونیا سولانی (Rhizoctonia solani) مورد بررسی قرار گرفته و مشخص گردید که غلظت ppm ۴۰ از اسانس رازیانه مانع رشد آلترناریا شده در حالیکه غلظت ppm ۱۰ فاقد چنین اثری بوده و نتیجه گرفتند که اثرات ضدقارچی رازیانه وابسته به دوز است [۱۹].

Mimica و همکاران (۲۰۰۳) نیز طی یک بررسی، اثرات ضدقارچی اسانس رازیانه را خوب ارزیابی کردند [۲۰]. همچنین رنجبریان و همکاران در سال (۲۰۰۴) با روش دیسک دیفیوژن و فلوسیتومتری نشان دادند که عصارهٔ رازیانه بیشترین تأثیرممانعت‌کنندگی را روی هلیکوباکتر پیلوری دارد [۲۱]. طی بررسی Singh و همکاران درسال ۲۰۰۶ مشخص شد که اسانس رازیانه دارای اثرات ضدقارچی برروی یکسری از قارچ های آلوده

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

کننـدهٔ موادغـذایی شـامل گونـه‌هـای آسپرژیلوسـی، پنـی‌سـیلیومی و فوزاریـومی اسـت [۲۲]. از طرفـی نتـایج یکسـری از تحقیقـات نشـان‌دهنـدهٔ اثـرات ضـددرد، ضدآماسی،آنتی‌اکسیدانی وآنتی‌هیستامینی برای رازیانه است [۲۳و۲۴].

Aligiannis و همکاران در تحقیقـات خـود روی مـواد گیاهی پیشنهاد دادند، براساس نتایج MIC به‌دست آمـده از اثرات ضدمیکروبی گیاهان، می‌توان آن‌ها را بـه سـه دسـته تقسیم‌بندی کرد. به طوری‌که گیاهانی با MIC تا ۵۰۰ µg/ml دارای ممانعـت از رشـد قـوی، گیاهـان بـا MIC بـین ۱۵۰۰-۶۰۰ µg/ml دارای ممانعت از رشد متوسط و گیاهان دارای MIC، ۱۶۰۰µg/ml (۱/۶ mg/ml) بـه بـالا دارای ممانعت از رشد ضعیف طبقه‌بندی می‌شوند [۲۵]. براساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، مشخص شد که اسـانس دانـهٔ رازیانـه دارای اثـرات ضـدکاندیـدایی قـوی بـوده (MIC = ۳۰۰ µg/ml) و اثـرات ضـدکاندیدایی آن در حـد اسانس گیاهان دارویی مانند آویشن شیرازی و آویشن باغی است [۳۰]. قابل توجه است که کم بودن قطر هالهٔ ممانعت از رشد در اسانس رازیانه (هجده میلی‌متر) می‌تواند ناشـی از عدم انتشار مناسب در آگار باشد. درستی این موضوع در خصوص داروی آمفوتریسین B کـه قطـر هالـه‌ای در حـد شانزده میلی‌متر ایجاد کرده، قابل اثبات است.

اگـر چـه اثـرات ضـدقـارچی داروهـای شـیمیایی کتوکونـازول و آمفوتریسـین B نسـبت بـه اسـانس رازیانـه قـوی‌تـر ارزیـابی شـد، امـا بـه ایـن نکتـه بایـد توجه داشت که یکـی از دلایـل قـوی‌تـر بـودن داروهـای شیمیایی، خالص بودن آن‌ها اسـت. بنـابراین بـا تحقیقـات بیشتر روی ترکیبات اسـانس گیـاه رازیانـه و مـواد مـؤثرهٔ آن و بـا خـالص‌سـازی و کشـف مکانیسـم اثـر آن و بهینه‌سـازی روش‌هـای اسـتخراج مـواد مـؤثره، مـی‌تـوان به نتایج مشابهی مانند داروهای شیمیایی رسـید. از طرفـی کـم‌خطـر و در دسـترس بـودن گیاهـان دارویـی و ارزان و به صرفه بودن هزینه‌هـای اسـتخراج مـواد مـوثرهٔ آن‌هـا نسبت به داروهای شیمیایی، ازمزیت‌هـای آن‌هـا بـه شـمار می‌رود. مقاوم بودن یکسـری از گونـه‌هـای کاندیـدایی بـه داروهـای شـیمیایی نیـز توجـه بـه آلترنـاتیو و جـایگزین مناسب برای مبارزه با چنین سویه‌های مقاومی را به خوبی توجیه می‌کند.

در این تحقیق، جدای از اثرات ضدکاندیدایی رازیانـه، اثر عصاره‌های دانـهٔ رازیانـه بـر ماکروفاژهـای صـفاقی در موش BALB/C نیـز مـورد بررسـی قـرار گرفـت. اهمیـت بررسی ایـن تـأثیر از آن جهـت اسـت کـه ماکروفاژهـا در پاسخ‌های ایمنی ذاتی و همچنین ایمنی اختصاصـی سـهیم بوده و در عفونت‌های مخمری به‌خصـوص کاندیـدیازیس منتشره دارای نقش مهمی هستند [۳،۴و ۲۶]. ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها می‌توانند اشکال مختلف کاندیدا آلبیکنس (اعم از مخمر یا هایف) را به روش فاگوسـیتوز و از مسـیرهای اکسیداتیو و غیراکسیداتیو از بین ببرنـد [۲۶و۲۷]. بنـابراین در صورتی‌که فرآورده‌های استخراج شـده از گیـاه رازیانـه بتواند علاوه بر اثر مستقیم ضدقارچی، فعالیت ماکروفاژهـا را نیز افزایش دهد، ارزش آن دوچندان خواهد شد.

همان‌طور که می‌دانیم اگر اثر ضدقارچی یک فرآورده با اثر توکسیک بر سیسـتم ایمنـی همـراه باشـد، از ارزش آن ترکیـب خواهـد کاسـت. براسـاس نتـایج از ایـن مطالعـه، غلطـت‌هـای بـه کـار بـرده شـده در ایـن تحقیـق بـرای سلول‌های ماکروفاژ اثـر توکسـیک و سـمی نداشـت. ایـن موضوع با نتایج تحقیقات Shah و همکاران مطابقـت دارد. آن‌ها نشان دادند کـه عصـارهٔ اتـانلی رازیانـه بـه صـورت خـوراکی در دوزهـای مختلـف و زمـان‌هـای متفـاوت، فاقـد اثـرات سـمی و تغییـرات مرفولـوژیکی خـارجی، همـاتولوژیکی و اسـپرماتوژنیکی در مـوش اسـت [۲۸] از طرفی، نتایج مطالعه ما نشان دادکـه عصـارهٔ اسـتونی دانـهٔ رازیانه می‌تواند سـبب افـزایش نسـبی در فعالیـت حیـاتی ماکروفاژ های صفاقی شود، هر چند کـه از لحـاظ آمـاری معنا دار نشد (P<۰/۰۵).

در طـی مطالعـه Cherng و همکـاران (۲۰۰۸) اثـرات ایمونومـدولاتوری رازیانـه روی سـلول‌هـای PBMC (peripheral blood mononuclear cells) انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت. محققـان اعـلام کردنـد عصـارهٔ آبـی رازیانـه بیشترین اثر تحریکی روی سـلول‌هـای PBMC انسـانی در شرایط آزمایشگاهی داشـته کـه ممکـن اسـت ایـن اثـرات ایمونومدولاتوری گیاه، ناشـی از ترکیبـات فنلـی آن باشـد [۲۹].

به طور کلی، بررسی تأثیر عصارهٔ یـک گیـاه بـر تولیـد مواد میکرب‌کشی که ماکروفاژ ترشح می‌کند، مـی‌توانـد در روشن‌تر کردن مکانیسم اثر آن مفید باشد. نیتریک اکسـاید

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

از جمله واسطه‌های فعال نیتروژنی است که ماکروفاژ در پاسخ به عفونت‌ها ترشح کرده و در حذف عفونت و ایجاد پاسخ التهابی نقش دارد و میزان آن تحت تأثیر مواد مختلف تغییر می‌کند. به‌طوری که سنتز و ترشح این واسطهٔ شیمیایی با مصرف داروها می‌تواند دچار تغییر شود [۳۰و۳۱]. غضنفری و همکاران در طی مطالعه‌ای روی داروی ACA1 برگرفته از یک داروی گیاهی بومی ایران، مشخص کردند که این دارو در دوزهای مختلف می‌تواند موجب افزایش تولید NO شود [۸]. در مطالعه ما علی‌رغم این‌که فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی (در تست MTT) تیمارشده با عصاره استونی در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نشان نداد، اما تولید NO در غلظت ۱۰mg/ml افزایش معناداری داشت (P<۰/۰۲). از آنجا که نیتریک اکساید یک متابولیت نیتروژنی حاصل از فعال شدن ماکروفاژ است که با رادیکال‌های اکسیژن ترکیب شده و رادیکال بسیار فعال پراکسی نیتریت را تولید می‌کند، ماکروفاژهای فعال شده با ترشح نیتریک اکساید نقش مهمی در دفاع میزبان دارند [۸،۲۵و۲۷].

واسطه‌های فعال اکسیژن (ROS) نیز از مواد میکرب‌کش بسیار مهم ماکروفاژها هستند [۲۵]. براساس نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، مشخص شد، تولید ROS در محیط کشت ماکروفاژهایی که با عصارهٔ استونی رازیانه با غلظت ۲۰mg/ml تیمار شده بودند، افزایش قابل توجهی (حدود ۲۶ درصد) نسبت به گروه کنترل داشت (P< ۰/۰۰۱). در حالی‌که حضور میتوژن‌های قوی مانند fMLP و LPS نتوانستند به این افزایش چیزی اضافه کنند. بنابراین در عمل اختلاف معناداری بین ماکروفاژهای تیمارشده با عصارهٔ استونی رازیانه به تنهایی یا ترکیب توأم عصاره با محرک، مشاهده نشد. هر چند که هر دو گروه نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی نشان دادند (P<۰/۰۰۱). به عبارت دیگر، میزان تولید ROS در ماکروفاژهای تیمارشده با و بدون میتوژن‌های fMLP وLPS اختلاف معناداری با گروه کنترل نشان ندادند (P<۰/۰۵).

این رخداد از چند جنبه قابل بررسی بوده و مکانیسم‌های پیشنهادی ذیل می‌تواند مطرح شود.

اول آن‌که، عصارهٔ استونی رازیانه در غلظت ۲۰mg/ml توانسته در حد میتوژن‌های قوی fMLP و LPS، تولید ROS در ماکروفاژ را القا کند. بنابراین می‌توان گفت ماکروفاژ به این تحریک پاسخ داده است.

دوم این‌که، تولید و ترشح ROS با و بدون حضور میتوژن‌های فوق یکسان بوده، در نتیجه این احتمال وجود دارد که بخشی از مسیرهای مربوط به فعال‌سازی و تحریک ماکروفاژ در عصارهٔ استونی رازیانه و میتوژن‌ها مشترک باشد.

آخر این‌که، احتمال دارد، ماکزیمم توانایی ماکروفاژها در تولید رادیکال‌های ROS را داشته‌ایم.

همان‌طور که اشاره شد، کاندیدیازیس یکی از بیماری‌های مهم قارچی بوده که معضلات عمده‌ای را برای بیماران در معرض خطر ایجاد می‌کند. از آنجا که سیستم ایمنی در این افراد دچار رکود است، بنابراین این بیماران نسبت به سایرین مستعد ابتلا به بیماری‌های قارچی فرصت‌طلب، به‌خصوص کاندیدیازیس منتشره هستند. از طرفی وجود محدودیت‌هایی که در درمان این بیماری‌ها، اعم از تعداد کم و گران بودن داروهای ضدقارچی، عوارض جانبی و مقاومت دارویی یا کاهش حساسیت به این داروها سبب شده تا توجه پژوهشگران به جست‌جو در رابطهٔ درمان‌های پیش‌گیرانه و ایمن‌تر معطوف شود. از این میان، ایمنی ذاتی و به‌خصوص نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها نقش مهمی در ایجاد مقاومت بدن و کشتار کاندیدا آلبیکنس در افراد مبتلا به بیماری کاندیدیازیس منتشره بازی می‌کنند. به طوری که این نقش می‌تواند در خصوص ماکروفاژها بارها تکرار شود [۳۱].

در یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه اثرات ضدکاندیدایی ماکروفاژهای صفاقی موش که با عصارهٔ استونی رازیانه تیمار شده بودند، به خوبی نشان داده شد. بر این اساس، اثرات ضدکاندیدایی قوی از سوی ماکروفاژ های فعال شده، در غلظت‌های ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml دیده شد. به‌طوری‌که ماکروفاژها در غلظت‌های فوق توانستند با عمل فاگوسیتوز خود، درصد مخمرهای کشته کاندیدا آلبیکنس را نسبت به گروه کنترل به ترتیب به ۵۸/۷ و ۷۵ درصد برسانند (نمودار ۵).

نتایج این مطالعه به‌طور خلاصه نشان می‌دهد که عصارهٔ استونی رازیانه می‌تواند با تحریک ماکروفاژهای صفاقی موش سبب تولید نیتریک اکساید، ROS و کشتار کاندیداآلبیکنس شده و در نتیجه این عصاره می‌تواند یک

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

اثر تعدیل‌کنندهٔ ایمنی (ایمونومدولاتوری) روی دستگاه ایمنی ذاتی داشته باشد.

از آنجا که گیاه رازیانه به‌صورت خوراکی مصرف می‌شود و اثرات سمیتی کمی برای آن قائل شده‌اند، تحقیقات بیشتر روی فراکشن‌های مختلف این گیاه می‌تواند به تولید فرآورده دارویی مناسبی برای عوامل فرصت‌طلب قارچی به‌خصوص کاندیدیازیس منجر شود.

تشکر و قدردانی

محققان و نویسندگان این پژوهش به این وسیله از زحمات اعضای گروه ایمنولوژی و قارچ‌شناسی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی که قسمتی از هزینه‌های این تحقیق را متقبل شده‌اند، و همچنین از زحمات آقایان حسین‌زاده نامی و جمالی تشکر و قدردانی دارند.

منابع

1. Myrhydr H, Education plants, Tehran: Islamic Culture Publication Office, 2001.

2. Salehi Surmaghi H. Medicinal plants and phytotherapy. Tehran, Iran: Donyaee Taghazie; 2006.

3. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Management of Candida species infections in critically ill patients. Lancet Infect Dis 2003; 3: 772-785.

4. Khan ZU, Chandy R, Metwali KE. Candida albicans strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: A study of morphotypes and resistotypes. Mycoses 2003; 46: 476-486.

5. Klepser ME. Antifungal resistance among Candida species. Pharmacother 2001; 21: 124S-132S.

6. Tavanti A, Campa D, Bertozzi A, Pardini G, Naglik JR, Barale R, Senesi S., Candida albicans isolates with different genomic backgrounds display a differential response to Microbes macrophage infection, Microbs and Infection 2006 ;8(3):791-800.

7. Tosi MF, Innate immune responses to infection,J.Allergy clin: Immunolo 2005; 116:241-9.

8. Ghazanfari T, Yaraee R,Naseri M, et al. Effect of plant products in response ACA1 proliferation and nitric oxide production by peritoneal macrophages in mice BALB / c, Journal of Basic Medical Sciences.2007;1:14-8.

9. Samsam H,Qualitative and quantitative evaluation of the active constituents and control methods for medicinal plants.Esfahan:Mani pub;1992.

10. NCCLS, 1991. National committee for clinical Laboatory standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test (6th ed). M2-A6 Wayne, PA.

11. Clinical laboratory standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility Testing of yeast. Approved standard M27-A2. Wayne.PA: Clinical Laboratory standards Institute, 2002.

12. Yaraee R., Ebtekar M., Ahmadiani A., Sabahi F., Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages, International Immunopharmacology 2003; 3: 1883–1887.

13. Byun JA, Ryu MH, Lee JK. The Immunomodulatory effects of 3-monochoro -1, 2- propanediol on murine splenocyte and peritioneal macrophaye function in vitro. Toxicol in vitro 2006; 20:272-8.

14. Yaraee R., Ebtekar M., Ahmadiani A., Sabahi F.,Ghazanfari T. The effect of substance P on nitric oxide production by HSV-1 infected macrophages. Int Immunopharmacol. 2007; 7(2):135-9.

15. Chen, N.Y., HSU, T.H., Lin F.Y., etal., Effects on cytokine stimulating activites of EPS from Tremella mesenterica with Various carbon sources, Food Chemistry 2006; 99(1), 92-97.

16. Gentle T.A. and Thompson R.A., clinical Immunology, A practical Approach. Edited by H.C. Gool, Oxford University Press 1990:56-58.

17. Murad J.M., Cavi S.A., Soares A.M.V.C., et al. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages aginst paracoccidioides brasiliensis, Journal of Ethnophar 2002;79: 331-334.

18. Loyda W., Gaziri D.A., Gazir L.C.J., et al. Concanavalin a enhance phagocytosis and killing of candida albicans by mice peritoneal neutrophils and macrophages, FEMS Immunology and Medical Microbiology 2002; 33: 201-208.

19. Ozcan MM.,Chalchat JC, Arslan D, Ateş A, Unver A. comparative essential oil composition and Antifungal effect of(Foeniculum vulgare ssp. Piperitum) fruit oils obtained During Different vegetation. J Med Food. 2006;9(4):552-61.

20. Mimica- Dukic N.,Kujundzić S, Soković M, Couladis M. Essential oil composition and antifungal activity of Foeniculum vulgare Mill obtained by different distillation conditions. Phytother Res 2003;17(4):368-71.

21. Ranjbarian p, Sadeghian S,Shirazi M, et alSurvey of Anti-Bacterial Effect of Plant Extracts (Fennel-Dill-Caraway-Cinnamon) by Flow Cytometry and Disk Diffusion,Scientific J of Hamadan univer of Medical science,2004;45:43-43.

22. Singh G., Maurya S., Lampasona M.and Catalan C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of Foeniculum vulgare volatile oil and its acetone extract,Food Control ,2006;17:745-752.

23. Choi E. and Hwang J. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of Foeniculum vulgare Fitoterapia 2004; 75,6: 557-565.

24. Haggag EG, Abou-Moustafa MA, Boucher W, Theoharides TC,The effect of a herbal water-extract on histamine release from mast cells and on allergic asthma.:J Herb Pharmacother 2003; 3(4):41-54.

25. Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. J Agri Food Chem 2001; 40: 4168-4170.

26. Vazques-Torres A. and Balish E., Macrophages in resistance to candidiasis, Micro. & molecular Biology Reviews 1997:170-192.

27. Moradali MF., Mostafavi H., Ghod S., and Hedjaroude GA. Immunomo dulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). Int. Immunophamacol 2007; 7:701-24.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 14:06 IRST on Thursday February 22nd 2018

28. Shah A. H.,Qureshi s., Ageel A.M.,Toxicity studies in mice of ethanol extracts of Foeniculum vulgare fruit and Ruta chalepensis aerial parts. J of Ethnopharm 1991; 34(2-3):167-172.

29. Cherng J.,Chiang W.Chiang L. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbellifferae and its related coumarins and flavonoids. Food Chemistry 2008;106:944-950.

30. Khosravi AR, Eslami A, Shokri H, Kashanian M. Zataria multiflora cream for the treatment of acute vaginal candidiasis. Int J Gynaecol Obstet 2008; 101: 201-202.

31. Luongo M., Porta A., and Maresca B. Homology, disruption and phenotypic analysis of CaGS Candida albicans gene induced during macrophage infection, FEMS 2005; 45, 3: 471-478.