

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 طویی 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 میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۴. دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

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

نویسنده مسئول:

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، ضد میکروب و ضد انگل نام برده شده است. با توجه به ویژگی‌هایی رازیانه، اثرات ضدکاندیدایی عصاره‌های آبی، الکلی، استونی و اسانس دانه رازیانه روی مخمر کاندیدا آلبیکنس و همچنین با توجه به نقش ماکروفاژها در ایمنی ذاتی، اثرات عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی دانه رازیانه بر روی 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 برات استفاده شد. برای سنجش اثرات ایمنومدولاتوری عصاره‌های دانه رازیانه از آزمایش‌های NO، MTT و برای بررسی کشندگی مخمر کاندیدا آلبیکنس توسط ماکروفاژ صفاقی موش از آزمایش‌های NBT 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) به ترتیب ۳۰۰ و ۳۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر است. از طرفی تولید نیتریک‌اکساید در ماکروفاژهای صفاقی که با عصاره استونی رازیانه در غلظت ۱۰ mg/ml تیمار شده بودند، افزایش معناداری نشان داد ($P < 0.02$). همچنین تولید ROS (Reactive Oxygen Species) در محیط دارای عصاره استونی رازیانه افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0.001$). بررسی کشندگی نیز نشان داد که ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ mg/ml و ۲۰ mg/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 ایمنومدولاتوری عصاره استونی رازیانه بر تحریک ماکروفاژهای صفاقی موش و تولید نیتریک‌اکساید و ROS و کشندگی کاندیدا آلبیکنس، لازم است تا مطالعات بیشتری بر روی مدل‌های حیوانی و انسانی جهت روشن شدن ترکیبات موثر آن بر بیماری کاندیدایزیس صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: رازیانه، کاندیدا آلبیکنس، ایمنو نو مدولاتور

دوماهنامه علمی - پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال شانزدهم - شماره ۸۲

شهریور ۱۳۸۸

وصول: ۸۷/۱۲/۱۸

آخرین اصلاحات: ۸۸/۳/۵

پذیرش: ۸۸/۶/۱۶

مقدمه

رازیانه یا بادیان سبز با نام علمی *Foeniculum Vulgare Mill* متعلق به گیاهی است علفی دو یا چند ساله از خانواده چتریان (Umbelliferae) به ارتفاع تا دو متر دارای برگ‌هایی با بریدگی‌های زیاد، به طوری که به صورت نخ‌شکل درآمده‌اند. همه قسمت‌های گیاه معطر بوده و قسمت مورد استفاده گیاه معمولاً میوه یا دانه‌های کوچک آن است [۱].

دانه رازیانه در طب سنتی به عنوان ضدنفخ معروف است و به عنوان طعم‌دهنده در شکلات، لیکورها، دارو و غذا مصرف می‌شود [۲و۱]. اثرات مهم آن عبارتند از ضدنفخ، ضداسپاسم، آنتی‌سپتیک، خلط‌آور، قاعده‌آور و در طب عوام به عنوان زیاد کننده 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 دانه 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 بازکننده 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 گرم‌کنشی 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 [۵و۶].

کاندیدایزیس بدون شک یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های قارچی فرصت‌طلب در انسان است که به صورت حاد، تحت حاد و مزمن در پوست، ناخن، مخاط واژن، ریه و دستگاه گوارش یا به صورت 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، شیمی‌درمانی و آنتی‌بیوتیک‌تراپی می‌شوند افرادی هستند که در معرض خطر کاندیدایزیس منتشره هستند [۷].

ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی بر ضد عفونت‌های 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 T و B 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 کاندیدایزیس منتشره دارند [۷].

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

مواد و روش‌ها

نحوه جمع‌آوری گیاه

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

سویه استاندارد قارچ

قارچ مخمری کاندیدا آلبیکنس سویه ۵۰۲۷=PTCC (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 (Hydrodistillation) انجام گرفت [۹ و ۲]. مقدار صد گرم دانه رازیانه را با آسیاب برقی خرد کرده و به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس‌گیری (کلونجر مدل دارونامه بریتانیا) ریخته و پس از اضافه کردن هفتصد میلی‌لیتر آب مقطر، دستگاه را روشن کرده تا به مدت دو ساعت جریان تقطیر برقرار شود. پس از اتمام اسانس‌گیری، اسانس در شیشه رنگی تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

روش تهیه عصاره اتانلی و استونی

عصاره‌گیری به روش خیساندن (Maceration) و با استفاده از حلال اتانل و استون صورت گرفت. مقدار صد گرم از دانه 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 65°C – 60°C برای تبخیر حلال قرار داده شد. عمل تغلیظ تا رسیدن به حدود پنج درصد مقدار اولیه هر عصاره ادامه یافت [۹ و ۲].

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 دانه رازیانه به ترتیب ۴/۱ و ۴/۴ گرم عصاره اتانلی و عصاره استونی به‌دست آمد.

روش تهیه عصاره آبی

میزان لازم از دانه 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 50°C و ۰/۰۴ mbar لیوفلیزه شد. بر این اساس از صد گرم وزن خشک دانه رازیانه، ۲/۶ گرم عصاره آبی به‌دست آمد.

این توضیح لازم است که برای تهیه 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 عصاره 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 دانه 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 تازه 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 (عصاره پایه) مقدار سی میکرولیتر روی دیسک‌های بلانک که وسط پلیت گذاشته شده بود، ریخته شد. پلیت‌ها در گرمخانه 35°C به مدت ۴۸–۲۴ ساعت نگهداری شده و پس از گذشت زمان موردنظر، تشکیل منطقه مانع از رشد قارچ با خط‌کش اندازه‌گیری شده و نتایج حاصل در جداول مربوطه وارد شد.

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

برابر در محدوده 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 به دست آمد.

پنجاه میکرولیتر از ماده قابل تلقیح استاندارد شده را به لوله‌های یک تا ده وارد کرده و به ملایمت بهم زده شد. لوله شماره یازده به عنوان کنترل کشت که دارای حلال، محیط کشت، و فاقد ماده تلقیحی بود (که نباید در آن رشدی دیده شود) و لوله شماره ده که دارای ماده 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 مشاهده قارچی بعد از انکوباسیون دیده نشود. در محیط کشت کنترل نیز نباید رشدی صورت می‌گرفت و در لوله ماده تلقیحی کنترل باید رشد دیده می‌شد.

برای تعیین MFC از هر یک از لوله‌های MIC که به ظاهر مخمر در آن‌ها رشد نکرده بود، بیست میکرولیتر برداشته و به صورت یکنواخت در سطح پلیت‌های سابورودکستروز آگار کشت داده شد و بعد از ۴۸ ساعت دوره 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 ملاحظه قارچی بعد از انکوباسیون دوباره 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 μg/ml و ۱۶-۰/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد.

هاله ممانعت از رشد شانزده میلی‌متر به بالا به عنوان حساس، بین ده تا چهارده میلی‌متر، وابسته به دوز و کمتر از ده میلی‌متر به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. در مورد کتوکونازول نیز قطر هاله ۲۸ میلی‌متر به عنوان حساس به دارو، بین ۲۷-۲۱ میلی‌متر وابسته به دوز و کمتر از بیست میلی‌متر مقاوم در نظر گرفته شد.

آزمایش رقیق‌سازی در برات (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 ماده تلقیحی

ماده مورد تلقیح (کاندیدا آلیکنس) با شماره PTCC=۵۰۲۷ (ATCC=۱۰۲۳۱) پس از کشت در محیط سابورودکستروز در گرم‌خانه^c ۳۵ به مدت ۴۸ ساعت تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون تلقیحی از کلنی‌های رشد کرده که دست کم 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 این که غلظت نهایی سوسپانسیون موردنظر به 1×10^8 cfu/ml معادل ۰/۵ مک فارلند رسانده شد.

بررسی اثر حلال DMSO بر رشد کاندیدا آلیکنس

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

تهیه محلول کار و رقت سریال از اسانس

یازده لوله آزمایش 16×100 میلی‌متر استریل را برداشته و به لوله‌های یک تا یازده هر کدام یک میلی‌لیتر محیط سابورودکستروز برات دارای DMSO دو درصد اضافه شد و از اسانس مورد مطالعه رقت‌های سریال دو

ماکروفاژ بوده و همچنین با استفاده از رنگ آمیزی گیسما مشخص شد ۹۵ درصد سلول‌های چسبیده در هر چاهک، ماکروفاژ هستند [۱۲۸].

برای سنجش اثر عصاره‌ها بر فعالیت ماکروفاژهای کشت داده شده، از عصاره آبی و اتانلی رازیانه با غلظت‌های پنج، ده و بیست میلی گرم در میلی لیتر و برای عصاره استونی با غلظت‌های ۰/۵، یک و ده میلی گرم در میلی لیتر 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 Dimethylsulfoxide و Tween 20 در غلظت دو درصد سه چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

پلیت‌ها به مدت بیست ساعت در انکوباتور با دمای 37°C و پنج 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 باقی مانده، 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 [۱۳۸].

اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید (Nitrite assay)

اصول کار براساس روش گریس انجام پذیرفت [۱۱۰]. 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

آزمایش‌های اثرات ایمونومدولاتوری عصاره‌های دانه گیاه رازیانه

تهیه حیوانات آزمایشگاهی (animals)

حیوانات مورد استفاده موش‌های نر BALB/c هشت تا ده هفته با وزن ۱۸-۲۵ 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 ($3-5/4$) دی‌متیل تیازول ۲-۲-۵ دی‌فنیل تترازولیوم برومید) استفاده شد. تمام مواد و معرف‌های کشت سلول از نماینده اروپایی شرکت سیگما (sigma) و گیبکو (GIBCO) خریداری شد.

جداسازی ماکروفاژهای صفاقی (macrophage isolation)

موش‌ها با استفاده از پنبه آغشته به دی‌اتیل اتر 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 1500rpm سانتریفوژ شد. پس از بیرون ریختن مایع رویی، در نهایت دو میلی لیتر 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 37°C حاوی پنج درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت منتقل شده و پس از دو ساعت برای حذف لئوسیت‌ها و سایر سلول‌های نجسبیده، چاهک‌ها با سالین نرمال 37°C شست‌شو داده شدند. با استفاده از لام نئوبار و شمارش و محاسبه سلول‌های نجسبیده در شش چاهک معلوم شد که حدود پنجاه درصد سلول‌های ریخته شده در هر چاهک،

۳۷ °C و پنج درصد CO₂ 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 ۳۷ °C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری شد. سپس CFU (Colony - Forming Units) هر پلیت تعیین و براساس فرمول زیر درصد کشندگی به دست آمد [۱۷].

$$\text{Fungicidal activity} = [1 - \text{CFU experimental culture/CFU untreated}] \times 100$$

روش‌های آماری

برای به دست 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 $P < 0/05$ به دست آمد.

یافته‌ها

اثرات ضدکاندیدی اسانس و عصاره‌های رازیانه
نتایج حاصل از اثر اسانس روی کاندیدا آلبیکنس نشان داد که اسانس رازیانه دارای اثرات ضدکاندیدی 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 به دست 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 به دست آمد.

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 عصاره استونی رازیانه (غلظت ۲۰ mg/ml) تیمار شدند. همچنین برای تأثیر توأم میتوزن‌های LPS و fMPL با عصاره استونی رازیانه، تعدادی از سلول‌های کشت شده در مجاورت میتوزن‌های LPS و fMPL به میزان ده میکرولیتر قرار گرفتند. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ °C و رطوبت لازم و پنج درصد CO₂ 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 و جذب 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 عصاره استونی رازیانه در غلظت‌های ۵ mg/ml، ۱۰ mg/ml و ۲۰ mg/ml در مواجهه با مخمر کاندیدا آلبیکنس مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا براساس روش NCCLS مشخص شد که عصاره استونی رازیانه در غلظت‌های ذکر شده، فاقد هرگونه اثر مستقیم ضدکاندیدی است. سپس براساس روش شرح داده شده در آزمایش MTT، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت ماکروفاژهای تیمار شده با عصاره استونی رازیانه، آن‌ها را به نسبت یک به ده (Target to effector) در معرض سویه مخمر کاندیدا آلبیکنس (ATCC=۱۰۲۳۱) به مدت یک ساعت در دمای

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

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

جدول ۲. نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی رازیانه بر فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفائی در آزمایش MTT.

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

* - NS= Not Significant (P<0.05)

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 تیمار شده 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.

بر اساس نتایج به دست آمده نیز مشخص شد که عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی گیاه رازیانه فاقد هرگونه اثرات ضدکاندیدیایی مستقیم بودند (جدول ۱).

فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفائی

بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفائی تیمار شده با عصاره‌های آبی و اتانلی دانه رازیانه در غلظت‌های ۵ mg/ml، ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (جداول ۲ و ۳). از طرفی فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفائی تیمار شده با عصاره استونی رازیانه

جدول ۳. نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتانلی رازیانه بر فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفائی در آزمایش MTT

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

* - NS= Not Significant (P<0.05)

نتایج به دست آمده از این آزمایش، مشخص شد که تولید ROS در محیط دارای عصاره استونی رازیانه (فاقد میتوزن‌های fMLP و LPS) افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت (نمودار ۴). در حالی که، این پاسخ در محیط دارای عصاره استونی رازیانه همراه با میتوزن‌های فوق نسبت به عصاره تنها معنادار نبوده، اما نسبت به گروه کنترل معنادار بود ($P < 0.001$). 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 عصاره استونی رازیانه در میزان کشندگی مخمر کاندیدا آلبیکنس در ماکروفاژهای صفافی

همان‌طور که اشاره شد، میزان تأثیر مستقیم عصاره استونی رازیانه روی مخمر کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد عصاره استونی رازیانه در غلظت‌های ۴۰-۰/۵ mg/ml فاقد هرگونه اثر ضدکاندیدی است. نتایج حاصل از مواجهه ماکروفاژ تحریک شده (با عصاره استونی رازیانه) با کاندیدا آلبیکنس در نمودار پنج نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ماکروفاژهای تحریک شده در غلظت‌های ۱۰ mg/ml و ۲۰ mg/ml دارای افزایش فعالیت ضدکاندیدی نسبت به گروه کنترل بودند (به ترتیب $P < 0.03$ و $P < 0.004$).

اثر عصاره‌های دانه رازیانه بر ماکروفاژهای صفافی برای تولید نیتریک اکساید (NO)

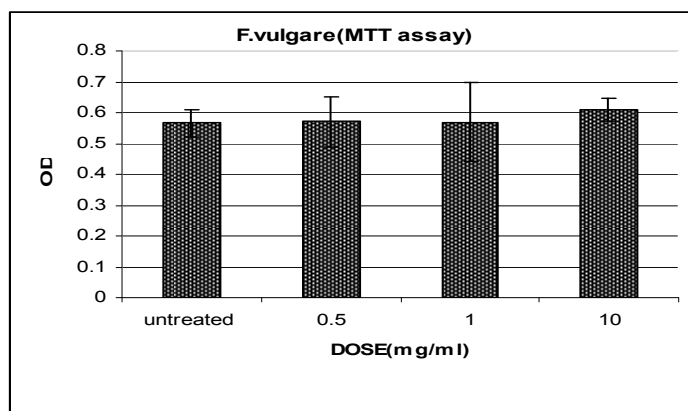
همان‌طور که در نمودار دو مشاهده می‌شود، تولید NO در ماکروفاژهای صفافی که با عصاره استونی رازیانه (بدون حضور میتوزن) در غلظت ۱۰ mg/ml تیمار شده بودند، افزایش معناداری را نشان داد ($P < 0.02$).

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

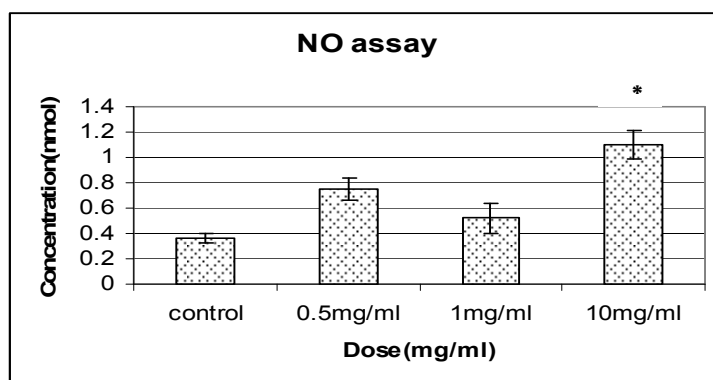
همچنین تولید NO در غلظت‌های ۰/۵ mg/ml و ۱ mg/ml عصاره استونی رازیانه علی‌رغم افزایش نسبت به گروه کنترل، معنادار نشد ($P < 0.05$). از طرفی تولید NO در ماکروفاژهای صفافی که با عصاره آبی و اتانلی با غلظت‌های ۵ mg/ml، ۱۰ mg/ml و ۲۰ mg/ml تیمار شده بودند، افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (نمودار ۳). بنابراین با توجه به نتایج بهتر عصاره استونی رازیانه نسبت به سایر عصاره‌ها، این عصاره برای انجام آزمایش‌های NBT و Killing انتخاب شد.

اثر عصاره استونی رازیانه بر ماکروفاژهای صفافی برای تولید ROS

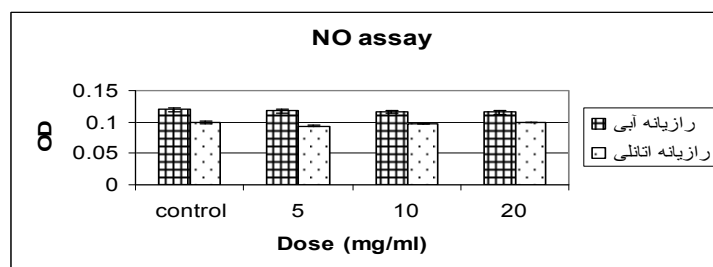
تولید ROS در ماکروفاژهای صفافی که با عصاره استونی رازیانه در غلظت ۲۰ mg/ml تیمار شده بودند، با استفاده از آزمایش NBT مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس



نمودار ۱. میانگین جذب نوری (OD) در آزمایش MTT با عصاره استونی رازیانه. سلول‌های ماکروفاژ صفافی 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 ($P < 0.05$).



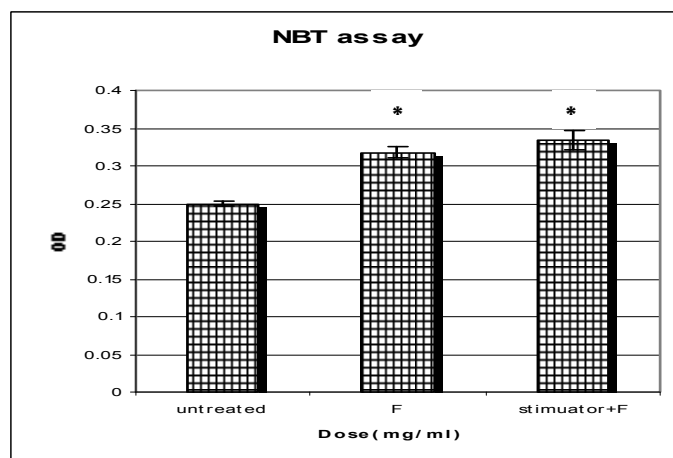
نمودار ۲. میانگین غلظت NO با غلظت‌های مختلف عصاره استونی رازیانه در آزمایش گریس.
* معنادار در حیطه $P < 0.05$.



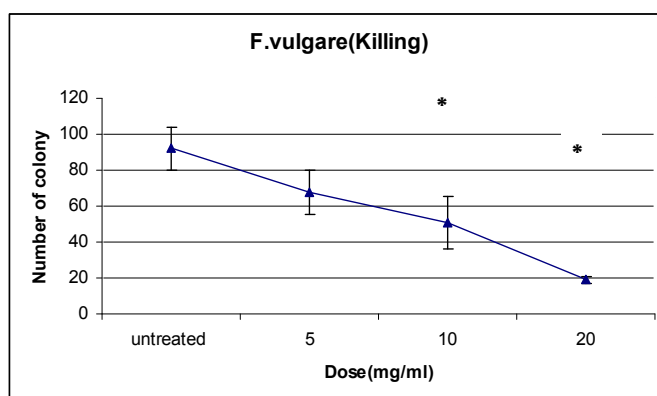
نمودار ۳. میانگین جذب نوری NO در غلظت‌های مختلف عصاره آبی و اتانلی رازیانه.

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 عصاره استونی رازیانه در غلظت ذکر شده همراه با محرک و بدون آن سبب افزایش NBT نسبت به گروه کنترل در حد معنادار شده 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 ($P < 0.02$).

نتایج نمودار ۴ نشان داد که عصاره استونی رازیانه در غلظت ذکر شده همراه با محرک و بدون آن سبب افزایش NBT نسبت به گروه کنترل در حد معنادار شده 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 ۴. میانگین جذب نوری (OD) عصاره استونی رازیانه در آزمایش NBT با غلظت ۲۰ mg/ml همراه با محرک LPS+fMLP و بدون محرک.
* معنادار در حیطه $P < 0.05$.



نمودار ۵ میانگین تعداد کلنی‌های زنده کاندیدا آلبیکنس در مواجهه با ماکروفاژهای تحریک شده با غلظت‌های مختلف عصاره استونی رازیانه. نتایج * معنادار در حیطه $P < 0.05$.

نویسندگان تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات ایمنومدولاتوری عصاره 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 ضد میکروبی 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 oxysporum*) و آلترناریا آلترناتا (*Alternaria alternate*) و ریزوکتونیا سلولانی (*Rhizoctonia solani*) مورد بررسی قرار گرفته و مشخص گردید که غلظت ۴۰ ppm از اسانس رازیانه مانع رشد آلترناریا شده در حالیکه غلظت ۱۰ ppm 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 عصاره رازیانه بیشترین تأثیرمانعت‌کنندگی را روی هلیکوباکتر پیلوری دارد [۲۱]. طی بررسی Singh و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشخص شد که اسانس رازیانه دارای اثرات ضدقارچی بر روی یکسری از قارچ‌های آلوده

نمودار ۵ نشان می‌دهد درصد کشندگی ماکروفاژها در غلظت‌های ۱۰ mg/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 ۱۰ mg/ml و ۲۰ mg/ml عصاره استونی به ترتیب حدود ۷۲ و ۸۹ درصد بود که کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد و این نشان‌دهنده افزایش قدرت کشتار است.

بحث

رازیانه گیاهی شناخته شده در طب قدیم است که اثرات مختلف آن شناسایی شده است. به طوری که تمدن‌های کهن مصر، هند، چین و یونان این گیاه دارویی را شناخته بودند و علاوه بر آن به عنوان چاشنی و طعم‌دهنده غذا نیز مورد مصرف داشته و دارد. مهم‌ترین اثراتی که برای رازیانه در کتب طب سنتی عنوان شده، خاصیت ضدنفخ، ضداسپاسم، آنتی‌سپتیک، ضدانگل، خلط‌آور و زیاد کننده شیر است. مصرف رازیانه در حد دارویی دارای عارضه نبوده، اما مصرف بیش از حد آن ممکن است سبب استفراغ و حساسیت فوری شود [۲۱].

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس دانه رازیانه دارای اثرات ضدکاندیدی قوی است. همچنین هدف دیگر این مطالعه، بررسی اثرات ایمنومدولاتوری عصاره‌های آبی، اتانلی و استونی دانه رازیانه است که نتایج نشان داد عصاره استونی این گیاه دارای یک اثر تعدیل‌کننده وابسته به دوز روی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c است. از آنجا که

در این تحقیق، جدای از اثرات ضدکاندیدی رازیانه، اثر عصاره‌های دانه رازیانه بر ماکروفاژهای صفاقی در موش BALB/C نیز مورد بررسی قرار گرفت. اهمیت بررسی این تأثیر از آن جهت است که ماکروفاژها در پاسخ‌های ایمنی ذاتی و همچنین ایمنی اختصاصی سهیم بوده و در عفونت‌های مخمری به‌خصوص کاندیدیازیس منتشره دارای نقش مهمی هستند [۳، ۴ و ۲۶]. ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها می‌توانند اشکال مختلف کاندیدا آلبیکنس (اعم از مخمر یا هایف) را به روش فاگوسیتوز و از مسیره‌های اکسیداتیو و غیراکسیداتیو از بین ببرند [۲۶ و ۲۷]. بنابراین در صورتی که فرآورده‌های استخراج شده از گیاه رازیانه بتواند علاوه بر اثر مستقیم ضدقارچی، فعالیت ماکروفاژها را نیز افزایش دهد، ارزش آن دوچندان خواهد شد.

همان‌طور که می‌دانیم اگر اثر ضدقارچی یک فرآورده با اثر توکسیک بر سیستم ایمنی همراه باشد، از ارزش آن ترکیب خواهد کاست. براساس نتایج از این مطالعه، غلظت‌های به کار برده شده در این تحقیق برای سلول‌های ماکروفاژ اثر توکسیک و سمی نداشت. این موضوع با نتایج تحقیقات Shah و همکاران مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که عصاره اتانلی رازیانه به صورت خوراکی در دوزهای مختلف و زمان‌های متفاوت، فاقد اثرات سمی و تغییرات مرفولوژیکی خارجی، هماتولوژیکی و اسپرماتوژنیکی در موش است [۲۸]. از طرفی، نتایج مطالعه ما نشان داد که عصاره استونی دانه رازیانه می‌تواند سبب افزایش نسبی در فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی شود، هر چند که از لحاظ آماری معنا دار نشد ($P < 0/05$).

در طی مطالعه Cherng و همکاران (۲۰۰۸) اثرات ایمونومدولاتوری رازیانه روی سلول‌های PBMC (peripheral blood mononuclear cells) انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت. محققان اعلام کردند عصاره آبی رازیانه بیشترین اثر تحریکی روی سلول‌های PBMC انسانی در شرایط آزمایشگاهی داشته که ممکن است این اثرات ایمونومدولاتوری گیاه، ناشی از ترکیبات فنلی آن باشد [۲۹].

به طور کلی، بررسی تأثیر عصاره یک گیاه بر تولید مواد میکرب‌کشی که ماکروفاژ ترشح می‌کند، می‌تواند در روشن‌تر کردن مکانیسم اثر آن مفید باشد. نیتریک اکساید

کننده مواد غذایی شامل گونه‌های اسپرژیلوسی، پنی‌سیلیومی و فوزاریومی است [۲۲]. از طرفی نتایج یکسری از تحقیقات نشان‌دهنده اثرات ضد درد، ضد آماسی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌هیستامینی برای رازیانه است [۲۳ و ۲۴].

Aligiannis و همکاران در تحقیقات خود روی مواد گیاهی پیشنهاد دادند، براساس نتایج MIC به دست آمده از اثرات ضد میکروبی گیاهان، می‌توان آن‌ها را به سه دسته تقسیم‌بندی کرد. به طوری که گیاهانی با MIC تا $500 \mu\text{g/ml}$ دارای ممانعت از رشد قوی، گیاهان با MIC بین $1500 - 6000 \mu\text{g/ml}$ دارای ممانعت از رشد متوسط و گیاهان دارای MIC $1600 \mu\text{g/ml}$ (یا $1/6 \text{ mg/ml}$) به بالا دارای ممانعت از رشد ضعیف طبقه‌بندی می‌شوند [۲۵]. براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، مشخص شد که اسانس دانه رازیانه دارای اثرات ضدکاندیدی قوی بوده اسانس گیاهان دارویی مانند آویشن شیرازی و آویشن باغی است [۳۰]. قابل توجه است که کم بودن قطر هاله ممانعت از رشد در اسانس رازیانه (هجده میلی‌متر) می‌تواند ناشی از عدم انتشار مناسب در آگار باشد. درستی این موضوع در خصوص داروی آمفوتریسین B که قطر هاله‌ای در حد شانزده میلی‌متر ایجاد کرده، قابل اثبات است.

اگر چه اثرات ضدقارچی داروهای شیمیایی کتوکونازول و آمفوتریسین B نسبت به اسانس رازیانه قوی‌تر ارزیابی شد، اما به این نکته باید توجه داشت که یکی از دلایل قوی‌تر بودن داروهای شیمیایی، خالص بودن آن‌ها است. بنابراین با تحقیقات بیشتر روی ترکیبات اسانس گیاه رازیانه و مواد مؤثره آن و با خالص‌سازی و کشف مکانیسم اثر آن و بهینه‌سازی روش‌های استخراج مواد مؤثره، می‌توان به نتایج مشابهی مانند داروهای شیمیایی رسید. از طرفی کم‌خطر و در دسترس بودن گیاهان دارویی و ارزان و به صرفه بودن هزینه‌های استخراج مواد مؤثره آن‌ها نسبت به داروهای شیمیایی، از مزیت‌های آن‌ها به شمار می‌رود. مقاوم بودن یکسری از گونه‌های کاندیدی به داروهای شیمیایی نیز توجه به آلترناتیو و جایگزین مناسب برای مبارزه با چنین سویه‌های مقاومی را به خوبی توجیه می‌کند.

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 عصاره استونی رازیانه و میتوژن‌ها مشترک باشد.

آخر این‌که، احتمال دارد، ماکزیم 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 رابطه 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 آلیکنس 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 ضدکاندیدیایی ماکروفاژهای صفافی موش که با عصاره استونی رازیانه تیمار شده بودند، به خوبی نشان داده شد. بر این اساس، اثرات ضدکاندیدیایی قوی از سوی ماکروفاژهای فعال شده، در غلظت‌های ۱۰mg/ml و ۲۰mg/ml دیده شد. به طوری‌که ماکروفاژها در غلظت‌های فوق توانستند با عمل فاگوسیتوز خود، درصد مخمرهای کشته کاندیدا آلیکنس را نسبت به گروه کنترل به ترتیب به ۵۸/۷ و ۷۵ درصد برسانند (نمودار ۵).

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

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. به طوری که سنتز و ترشح این واسطه شیمیایی با مصرف داروها می‌تواند دچار تغییر شود [۳۰ و ۳۱]. 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 صفافی (در تست MTT) تیمار شده با عصاره استونی در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نشان نداد، اما تولید NO در غلظت ۱۰mg/ml افزایش معناداری داشت ($P < 0/02$). 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 نیتريت را تولید می‌کند، ماکروفاژهای فعال شده با ترشح نیتریک اکساید نقش مهمی در دفاع میزبان دارند [۲۷ و ۲۵۸].

واسطه‌های فعال اکسیژن (ROS) نیز از مواد میکرب‌کش بسیار مهم ماکروفاژها هستند [۲۵]. براساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، مشخص شد، تولید ROS در محیط کشت ماکروفاژهایی که با عصاره استونی رازیانه با غلظت ۲۰mg/ml تیمار شده بودند، افزایش قابل توجهی (حدود ۲۶ درصد) نسبت به گروه کنترل داشت ($P < 0/001$). در حالی‌که حضور میتوژن‌های قوی مانند fMLP و LPS نتوانستند به این افزایش چیزی اضافه کنند. بنابراین در عمل اختلاف معناداری بین ماکروفاژهای تیمار شده با عصاره 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 ($P < 0/001$). به عبارت دیگر، میزان تولید ROS در ماکروفاژهای تیمار شده با و بدون میتوژن‌های fMLP و LPS اختلاف معناداری با گروه کنترل نشان ندادند ($P < 0/05$).

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

اول آن‌که، عصاره استونی رازیانه در غلظت ۲۰mg/ml توانسته در حد میتوژن‌های قوی fMLP و LPS، تولید ROS

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 peritoneal macrophage 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., et al., Effects on cytokine stimulating activities 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 against *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 al. Survey 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. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int. Immunopharmacol* 2007; 7:701-24.

اثر تعدیل کننده ایمنی (ایمونومدولاتور) روی دستگاه ایمنی ذاتی داشته باشد.

از آنجا که گیاه رازیانه به صورت خوراکی مصرف می شود و اثرات سمیتی کمی برای آن قائل شده اند، تحقیقات بیشتر روی فراکشن های مختلف این گیاه می تواند به تولید فرآورده دارویی مناسبی برای عوامل فرصت طلب قارچی به خصوص کاندیدیازیس منجر شود.

تشکر و قدردانی

محققان و نویسندگان این پژوهش به این وسیله از زحمات اعضای گروه ایمنولوژی و قارچ شناسی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی که قسمتی از هزینه های این تحقیق را متقبل شده اند، و همچنین از زحمات آقایان حسین زاده 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 Laboratory standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test (6th ed). M2-A6 Wayne, PA.

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 Umbelliferae 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.