مقاله پژوهشی

مقایسه تأثیر عصاره آبی و متانولی گیاه *Callistemon viminalis* (SOl. ex Gaertn.)G. Don با آمفوتریسین B و بررسی اثرات سینرژیستی آن‌ها

سید جلال‌الدین اشرف‌منصوری[1*]، مریم رمضانیان[2]، راضیه موسوی‌فرد[3]

۱- دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، ایران
۳- واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان حضرت ولیعصر(عج)، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: ظهور مقاومت دارویی قارچ‌ها و همچنین عوارض جانبی داروهای شیمیایی موجود، منجر به تقاضای زیاد برای داروهای ضدقارچی جدید شده است. درنتیجه هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره متانولی و آبی گیاه *Callistemon viminalis* بر ممانعت از رشد *کاندیدا آلبیکانس* و بررسی اثرات سینرژیستی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: بعد از خشک شدن برگ‌ها، عصاره‌ها به روش تقطیر با حلال متانول و آب تهیه شد. اثر عصاره‌های حاصله در سه غلظت ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر و با استفاده از روش انتشار دیسک و تهیه رقت‌های متوالی عصاره بر روی مخمر *کاندیدا آلبیکانس* مورد آزمایش قرار گرفت. در بررسی اثر سینرژیستی، سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* بر روی محیط حاوی عصاره متانولی کشت داده شد و سپس دیسک‌های آمفوتریسین B بر روی آن قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج حاصل، اثر ضدقارچی عصاره متانولی گیاه *viminalisCallistemon* بر روی *کاندیدا آلبیکانس* بیشتر از عصاره آبی است. در بررسی حداقل غلظت بازدارندگی MIC، عصاره متانولی گیاه *viminalisCallistemon* در غلظت ۶۲/۵µg/ml و عصاره آبی در غلظت ۲۵۰µg/ml بر قارچ *کاندیدا آلبیکانس* اثر ضدقارچی نشان داده است. قطر هاله عدم رشد برای آمفوتریسین B، معادل ۱۸ میلی‌متر شد و در صورت ترکیب با عصاره متانولی *viminalisCallistemon* با غلظت ۶۲/۵ µg/ml برابر ۲۱ میلی‌متر و همچنین در ترکیب با عصاره آبی با غلظت ۲۵۰µg/ml برابر ۱۹ میلی‌متر شد.

نتیجه‌گیری: اگرچه آمفوتریسین B مؤثرترین دارو برای درمان عفونت‌های قارچی سیستمیک است، ولی در صورت ترکیب با عصاره گیاه *viminalisCallistemon* خاصیت آن افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: *Callistemon viminalis*، *کاندیدا آلبیکانس*، عصاره متانولی و آبی، آمفوتریسین B

مقدمه

Callistemon viminalis به‌عنوان شیشه‌شور مجنون شناخته می‌شود که متعلق به خانواده Myrtaceae و شامل بیش از ۳۰ گونه است. آن‌ها درخت یا درختچه‌های چوبی معطر هستند (۰/۵ متر تا ۷ متر ارتفاع) که به‌طور وسیع در نواحی استوایی مرطوب توزیع‌شده‌اند. این گیاهان به‌طور شاخص در استرالیا، آمریکای جنوبی و نواحی گرمسیری آسیا گسترش یافته‌اند ولی امروزه در سایر نقاط جهان نیز یافت می‌شوند (۱). مقاومت گیاه شیشه‌شور در برابر خشکی، گرما، باد و از همه مهم‌تر زیبایی آن در زمان گلدهی موجب شده که از این گیاه در سطح گسترده‌ای در فضای سبز و حاشیه خیابان‌ها استفاده شود (۲). این گیاه در ایران به‌عنوان درخت تزئینی در پارک‌ها و حاشیه خیابان‌ها کاشته می‌شود (۳). استفاده از گونه*Callistemon viminalis* به‌عنوان گیاهی دارویی جهت درمان سنتی بیماری‌های گوناگون دارای سابقه‌ای غنی است. این گیاه دارویی به‌طورکلی برای درمان موارد مختلف پزشکی ازجمله عفونت‌های پوستی، معده و موارد تنفسی استفاده می‌شود. در جامائیکا جوشانده این گیاه به‌صورت «چای داغ» در درمان بیماری‌های معده و روده، اسهال و عفونت‌های پوستی به کار می‌رود (۴، ۵). *Callistemon viminali s* به دلیل قابض بودن دارای خاصیت جلوگیری از خونریزی را دارد و می‌تواند

* **نویسنده مسئول: سید جلال‌الدین اشرف‌منصوری**، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.
Email: nanojalal_microjalal@yahoo.com

خونریزی داخلی مانند زخم معده را به‌وسیله منقبض کردن رگ‌های خونی متوقف نماید. اغلب زنان برای پاک کردن ترشحات مخاطی یا آلودگی‌های دستگاه ادراری_تناسلی ناشی از قاعدگی بیش‌ازحد، با آن استحمام می‌کنند و همچنین به دلیل مدر بودن می‌تواند در رفع احتباس آب و مشکلات کلی دستگاه ادراری مفید باشد (۶).

کاندیدیازیس ازجمله شایع‌ترین و گسترده‌ترین بیماری‌های قارچی انسان است که در سال‌های اخیر در حد زیادی افزایش یافته است (۷). جنس کاندیدا دارای گونه‌های متعددی است، اما اصلی‌ترین و شایع‌ترین گونه بیماری‌زای انسانی این جنس، *کاندیدا آلبیکانس* است (۸). *کاندیدا آلبیکانس* جزئی از فلور طبیعی سطوح مخاطی حفره دهانی، دستگاه گوارش و واژن است اما به‌صورت عفونت‌های فرصت‌طلب، می‌تواند موجب تظاهرات بالینی فراوانی از قبیل برفک، واژنیت، عفونت پوست، آندوکاردیت، مننژیت، آبسه مغزی، آرتریت و پیلنفریت در میزبان انسانی شود (۹،۱۰). آمفوتریسین B مؤثرترین داروی مورداستفاده برای درمان عفونت‌های قارچی سیستمیک است (۱۱)؛ اما مصرف این آنتی‌بیوتیک موجب بروز سمیت کلیوی قابل‌توجهی می‌گردد (۱۲). دفع این آنتی‌بیوتیک توسط کلیه‌ها باعث تخریب این اندام می‌شود. این سمیت در درمان عفونت قارچ‌های سیستمیک که نیاز به دارودرمانی طولانی دارند، تشدید می‌گردد، زیرا در این حالت نیاز است که دارو با غلظت زیاد به مدت طولانی در بدن باقی بماند (۱۳).

در مقام مقایسه با پیشرفت‌های به‌دست‌آمده در تولید و عرضه مواد دارویی، روند و آهنگ توسعه داروهای ضدقارچی به‌خصوص قبل از دهه ۱۹۸۰ بسیار آهسته بوده است. به همین علت نیز امروزه تنوع داروهای ضد عفونت‌های قارچی، بسیار کمتر و محدودتر از داروهای ضد باکتریایی است. با آغاز پیشرفت‌های وسیع درمانی از ابتدای دهه ۱۹۸۰ و متحول‌شدن علم پزشکی، نیاز به داروهای مؤثر ضدقارچی با عوارض جانبی کمتر، بیش‌ازپیش احساس شد (۱۴). مقاومت دارویی روزافزون این قارچ و بنابراین افزایش دوز مصرفی داروهای متداول و به دنبال آن افزایش عوارض جانبی داروها موجب شده است تا امروزه بیشترین توجه به عواملی با پایه طبیعی مانند گیاهان دارویی با عوارض جانبی بسیار کمتر معطوف شود (۱۵، ۱۶).

استفاده از گیاهان دارویی به‌تنهایی یا با داروهای مدرن امروزی جهت کاهش عوارض جانبی دارو، به‌صورت ترکیب برای اهداف درمانی مورد استقبال قرار گرفته است (۱۷). لذا استفاده از داروهای ضدقارچی به‌صورت ترکیب با عصاره گیاهی می‌تواند سبب پیشگیری و یا تعویق گسترش مقاومت عوامل قارچی نسبت به داروهای ضدقارچی گردد (۱۸). با توجه به اینکه مخمر *کاندیدا آلبیکانس* در بیماران دارای ضعف ایمنی (مثل افراد مبتلا به ایدز و سرطان‌های مختلف) گاهاً با سپتی سمی کشنده همراه است؛ به‌علاوه در خانم‌ها یکی از عوامل مهم واژینیت‌های قارچی است (۱۹)، بر آن شدیم که اثر عصاره گیاه شیشه‌شور بر مخمر *کاندیدا آلبیکانس* در شرایط آزمایشگاهی بررسی و نتایج حاصل از آن را با اثر آمفوتریسین B بر این مخمر مقایسه کنیم تا بتوان از نتایج حاصل به‌منظور استفاده از این فرآورده در درمان کاندیدیازیس بهره برد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: نمونه‌های گیاهی در بهار سال ۱۳۹۴، از نواحی مختلف سطح شهر فسا جمع‌آوری شد سپس در هرباریوم دانشگاه پیام نور مرکز داراب به کمک منابع مختلف، جنس و گونه‌ی گیاه، شناسایی و مورد تأیید قرار گرفت. پس از برداشت برگ‌ها را جدا نموده و در محیط آزمایشگاه در شرایط مناسب (دور از نور مستقیم خورشید و رطوبت) نگهداری و به‌طور کامل خشک گردیدند. سپس به‌وسیله آسیاب برقی و الک، پودر نمونه تهیه شد.

عصاره گیری: برای تهیه عصاره از روش ماسراسیون استفاده شد. بدین ترتیب که برگ‌های پودر شده را، به نسبت ۱ به ۱۰ ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در متانول خیسانده شد تا حداکثر مواد مؤثره در متانول حل شود (۲۰). برای تهیه عصار آبی نیز، پودر نمونه را در آب ۸۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد و سپس با صاف کردن به‌وسیله کاغذ صافی واتمن و تبخیر حلال در فشار کم ماده غلیظی به دست آمد. در پایان جهت حذف کامل حلال نمونه‌ها در دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفت. برای عصاره گیاهی غلظت‌های ۵۰۰µg/ml و۲۵۰µg/ml و ۱۲۵µg/ml تهیه شد، به این صورت که مقدار مشخصی از عصاره را با ترازوی حساس وزن کرده و در یک سی‌سی از حلال دی متیل سولفوکساید برای عصاره متانولی و آب مقطر برای عصاره آبی حل گردید. سپس برای استریل نمودن عصاره‌ها، از فیلتر ۰/۴۵µm استفاده شد.

سوش استاندارد میکروبی: جهت انجام مطالعات فوق از سوش استاندارد (*Candida albicans* ATCC10231) استفاده

شد. این سوش به‌صورت لیوفیلیزه از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهرستان فسا تهیه شد.

روش انتشار در آگار: جهت بررسی اثر ضدقارچی گیاه شیشه‌شور بر مخمر *کاندیدا آلبیکانس*، از محیط کشت سابورو دکستروز آگار استفاده شد. از کشت ۴۸ ساعته *کاندیدا آلبیکانس* تعداد ۲ تا ۳ کلنی به سرم فیزیولوژی استریل افزوده و کاملاً ورتکس شد و کدورت سوسپانسیون به‌دست‌آمده معادل ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸ cfu/ml) تنظیم گردید. از سوسپانسیون موردنظر با سوآپ استریل روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده، آنگاه دیسک‌های ۶/۴ میلی‌متری، حاوی عصاره را با پنس استریل برداشته و بافاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به‌صورت وارونه به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها نتایج موردبررسی قرار گرفت (۲۱). در هر آزمایش یک دیسک حاوی حلال به‌عنوان کنترل منفی و یک دیسک حاوی آمفوتریسین 100(BU/disc) به‌عنوان کنترل مثبت بکار برده شد و برای حصول از اطمینان این آزمایش، برای هر عصاره متانولی و آبی، سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد در سه بار، به‌عنوان قطر نهایی ثبت شد.

روشMIC: برای تعیین MIC، ۷ عدد لوله‌آزمایش تمیز و استریل انتخاب و در هرکدام یک میلی‌لیتر نرمال‌سالین ۰/۹ درصد ریخته شد. لوله‌ها به ترتیب زیر شماره‌گذاری شدند:

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
رقت عصاره	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$

یک میلی‌لیتر (هزار میکرولیتر) عصاره با غلظت 250 µg/ml، توسط سمپلر برداشته و به لوله شماره‌ی ۱ اضافه و لوله را به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شد. پس از یکنواختی محیط، یک میلی‌لیتر از محلول لوله‌آزمایش شماره ۱ برداشته شد و به لوله‌آزمایش شماره ۲ منتقل و پس از مخلوط کردن یک میلی‌لیتر از لوله شماره ۲ به لوله شماره ۳ و بالاخره تا لوله آخر ادامه یافت. درنهایت یک میلی‌لیتر از لوله شماره ۷ کشیده و دور ریخته شد. ۲ لوله نیز به‌عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. کنترل مثبت فقط حاوی ۱ میلی‌لیتر نرمال‌سالین و بدون عصاره بود و کنترل منفی حاوی ۱ میلی‌لیتر عصاره خالص بود. پس از تهیه رقت‌های فوق، یک میلی‌لیتر مخمر موردنظر در هر لوله ریخته، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از گذشت مدت‌زمان مقرر به تعداد لوله‌ها پلیت حاوی محیط سابورودکستروز آگارتهیه و شماره هر لوله روی پلیت مربوط به آن نوشته شد و کنار شعله توسط لوپ پر از محتوی لوله برداشته به‌صورت کشت خطی در پلیت مربوط به هر رقت کشت داده شد (۲۲). در کلیه آزمون‌های میکروبیولوژی که نیاز به محیط آسپتیک بوده از هود لامینار فلو استفاده شد.

بررسی اثر سینرژیستی عصاره متانولی گیاه شیشه‌شور با آمفوتریسین B: برای تعیین اثر ترکیبی میان عصاره متانولی گیاه شیشه‌شور و دیسک‌های آمفوتریسین B از روش انتشار دیسک استفاده شد. بررسی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی عصاره‌ها بر آمفوتریسین B با استفاده از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) صورت گرفت که برابر با رقت ۱ به ۸ MIC برای عصاره متانولی و رقت ۱ به ۲ MIC برای عصاره آبی، است. غلظت تحت مهاری عصاره‌ها، به محیط دکستروز آگار، با نسبت ۱ به ۲ اضافه و به‌عنوان پلیت تست استفاده شد. سوسپانسیون مخمر با غلظت ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸cfu/ml) روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی غلظت‌های تحت مهاری عصاره، توسط سواب به‌صورت چمنی کشت داده شد و دیسک‌آمفوتریسین B روی سطح محیط کشت قرار داده شد، همچنین یک دیسک حاوی حلال به‌عنوان کنترل منفی و یک دیسک حاوی عصاره با غلظت تحت مهاری (sub-MIC) به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس قطر هاله‌های عدم رشد دیسک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه ثبت شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری: آزمایش‌ها بر تکرار سه‌تایی استوار بود. نتایج به‌صورت میانگین به همراه انحراف معیار بیان شد. سپس برای بررسی اختلاف بین گروهی، گروه‌ها به‌صورت دوتایی با تی تست (با استفاده از نرم‌افزار آماری spss۱۶)، در سطح معنی‌دار P<۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

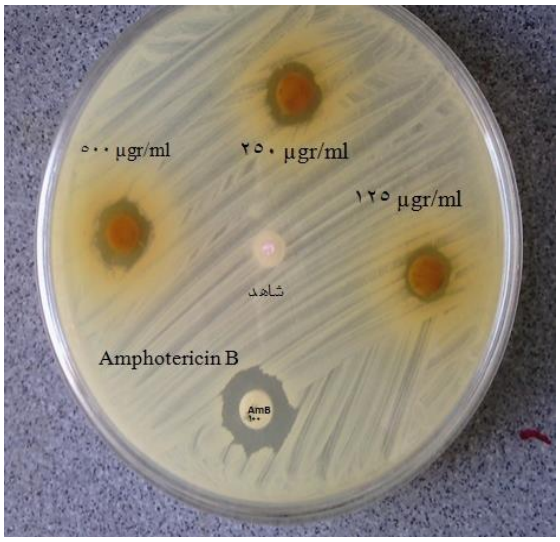
درروش دیسک دیفیوژن (انتشار در آگار)، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک آغشته به عصاره متانولی و آبی گیاه شیشه‌شور و آمفوتریسین B برای مخمر*کاندیدا آلبیکانس*، اندازه‌گیری شده که در جدول ۱ آمده است. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، قطر هاله عدم رشد برای عصاره متانولی گیاه *Callistemon viminalis* در غلظت‌های تحت

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک عصاره‌های شیشه‌شور و آمفوتریسین B بر مخمر *کاندیدا‌آلبیکانس* به روش دیسک دیفیوژن

قطر هاله‌های عدم رشد (میلی‌متر)								
عصاره آبی و آمفوتریسین B	عصاره متانولی و آمفوتریسین B	آمفوتریسین B	عصاره آبی شیشه‌شور µg/ml			عصاره متانولی شیشه‌شور µg/ml		
۲۵۰ µg/ml+۱۰۰(U/disc)	۶۲/۵ µg/ml+۱۰۰(U/disc)	۱۰۰(U/disc)	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰
۱۹	۲۱	۱۸	۷/۳	۹/۷	۱۲/۳	۹/۳	۱۳/۷	۱۶/۳

بررسی بین ۱۶/۳-۹/۳ میلی‌متر و برای عصاره آبی بین ۱۲/۳-۷/۳ میلی‌متر است.

نتایج آماری حاصل از آزمون t، نشان داد که اثر ضد قارچی عصاره متانولی در سطح معنی‌دار ۰/۰۰۲ و برای عصاره آبی در سطح معنی‌دار ۰/۰۰۳ وابسته به غلظت بوده و همواره با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد اطراف مخمر نیز افزایش یافته است. مقایسه‌ی دو عدد ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۲ نشان می‌دهد که عصاره متانولی گیاه شیشه‌شور روی *کاندیدا آلبیکانس* بیشتر از عصاره آبی است و همچنین نتایج نشان داد که اثرات ضدقارچی عصاره‌ها در سطح معنی‌دار P<۰/۰۵ وابسته به غلظت بوده و همواره با افزایش غلظت، قطر هاله‌های ممانعت از رشد نیز افزایش یافته است، (شکل۱) این امر را می‌توان به مقدار ماده مؤثره موجود در عصاره‌ها نسبت داد که مقدار آن در عصاره متانولی بیشتر است.



شکل ۱- قطر هاله‌های عدم رشد عصاره متانولی گیاه *C. viminalis* به روش دیسک دیفیوژن روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار

در جدول شماره ۲، بررسی MIC و MBC را می‌توان مشاهده کرد. عصاره متانولی گیاه شیشه‌شور در غلظت ۶۲/۵µg/m و عصاره آبی در غلظت ۲۵۰ µg/m بر قارچ *کاندیدا آلبیکانس* اثر ضدقارچی نشان داده است (جدول ۲).

جدول ۲- حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی گیاه شیشه‌شور برمخمر *کاندیدا آلبیکانس*

نوع عصاره / غلظت µg/ml	عصاره متانولی	عصاره آبی
۲۵۰	-	-
۱۲۵	-	+
۶۲/۵	-	+
۳۱/۲۵	+	+
۱۵/۶	+	+
۷/۸	+	+
۳/۹	+	+

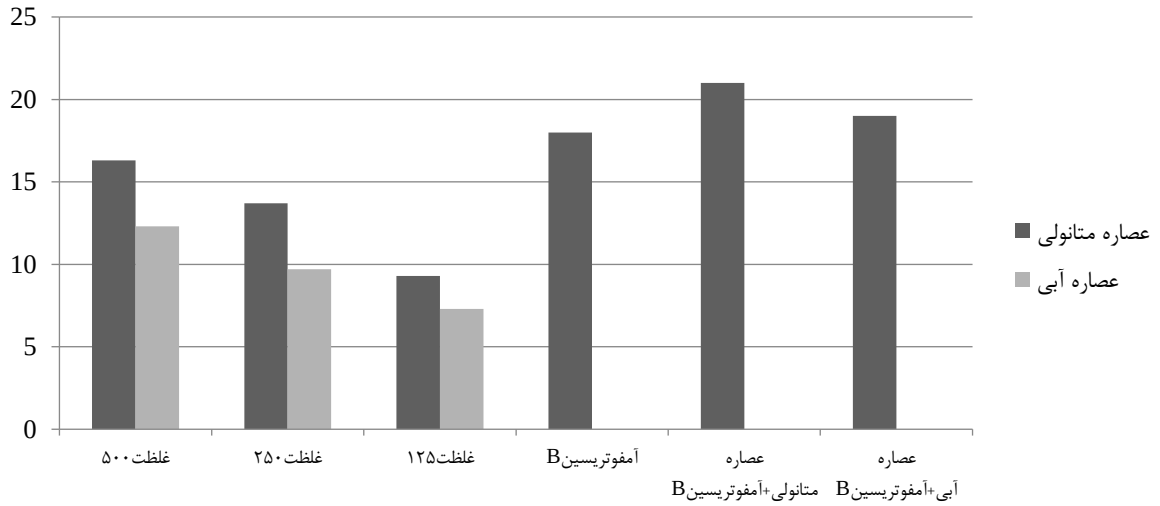
- عدم رشد + رشد باکتری

بر طبق این نتایج، با کاهش عصاره شیشه‌شور در محیط کشت، میزان مشاهده کلنی‌های حاصل از گسترش رقت‌های مختلف سوسپانسیونی *کاندیدا آلبیکانس* افزایش یافت.

همچنین این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره متانولی گیاه شیشه‌شور، خاصیت ضدقارچی، مشابه آمفوتریسین B دارد و با افزودن عصاره گیاه بر آمفوتریسین B، منجر به افزایش حساسیت مخمر*کاندیدا آلبیکانس* می‌شود و هاله بزرگ‌تری از ممانعت رشد ایجاد می‌شود، همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در اثر افزودن عصاره متانولی بر آمفوتریسین B، قطر هاله عدم رشد ۲۱ میلی‌متر و در صورت افزودن عصاره آبی به ۱۹ میلی‌متر افزایش

یافت. درنتیجه می‌توان بیان کرد که عصاره متانولی و آبی فعالیت سینرژیستی با آمفوتریسین B بر *کاندیدا آلبیکانس* دارد (نمودار ۱).

منجر به شناسایی C-متیل فلاونوئیدها، ترپنوئید و مشتقات فلوروگلوسینول شد (۲۵-۲۷). ترکیبات ترپنوئید موجود در *Callistemon viminalis* به دلیل داشتن طعم تندوتیز، ضد



نمودار ۱: مقایسه اثر ضدقارچی عصاره‌های گیاه شیشه‌شور بر *کاندیدا آلبیکانس* و خاصیت سینرژیستی با آمفوتریسین B

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر تأثیر مهاری عصاره متانولی و آبی شیشه‌شور بر *کاندیدا آلبیکانس* به اثبات رسیده است. نتایج نشان داد که عصاره متانولی دارای بیشترین فعالیت ضدقارچی بوده، درحالی‌که اثر ضدقارچی عصاره آبی کمتر از عصاره متانولی است و همچنین عصاره‌های گیاه شیشه‌شور، از آمفوتریسین B خاصیت ضدمیکروبی کمتری دارد ولی افزودن عصاره متانولی گیاه بر آمفوتریسین B، منجر به افزایش حساسیت مخمر می‌شود و درنتیجه هاله بزرگ‌تری ایجاد می‌شود. عصاره این گیاه در غلظت‌های قابل‌استفاده، در مورد مخمر *کاندیدا آلبیکانس*، اثر کشندگی داشته است. با اثر سینرژیستی و کاهش دوز مصرفی آمفوتریسین B، می‌توان از عوارض کشنده‌ای مثل سمیت کلیوی آمفوتریسین B کاست. تاکنون گزارشی از خاصیت سینرژیستی *Callistemon viminalis* با داروهای ضدقارچی وجود ندارد.

خاصیت ضدمیکروبی گیاهان عموماً به دلیل وجود ترکیبات فنولی، ساپونین، فلاونوئیدهای موجود در ساختار آن‌ها است و برخی از این عوامل روی غشای پلاسمایی یا روی مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها مؤثر است و می‌تواند خواص ضدمیکروبی خود را اعمال نماید (۲۳، ۲۴)، تحقیقات فیتوشیمیایی گذشته روی تعدادی از جنس‌های *Calistemon* میکروارگانیسم‌ها، تشخیص داده شده است (۲۸).

فعالیت ضدمیکروبی روغن‌های فرار *Callistemon viminalis* می‌تواند به حضور بعضی از ترکیبات عمده مانند ۱ و ۸- سینئول، α_پینن، α_ترپینئول همراه با ترکیبات دیگر با مقدار کمتر مانند β_پینن و لینالول نسبت داد که تاکنون فعالیت ضدمیکروبی و باکتریواستاتیک آن تشخیص داده شده است (۳۲-۲۹). گزارش‌شده است که روغن‌های فرار گونه‌های مختلف *Callistemon* دارای خاصیت ضد میکروبی (۳۳) ضد کاندیدایی (۳۴) و ضدقارچی (۳۵-۳۸) است. Delahaye و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشاهده کردند که ترکیبات موجود در گیاه *Callistemon viminalis* دارای خاصیت ضدقارچی با قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی بین ۱۶ تا ۲۰ میلی‌متر و عصاره آبی ۱۱ تا ۱۵ میلی‌متر، برای *کاندیدا آلبیکانس* است (۳۹) و همچنین تحقیقات Haque و همکاران در سال ۲۰۱۲، نشان داد که عصاره گیاه شیشه‌شور دارای خاصیت ضد کاندیدایی با قطر هاله عدم رشد بین ۹/۵ تا ۱۱ است (۴۰).

با توجه به این‌که عصاره‌هایی با روش‌ها و حلال‌های متفاوت از یک گیاه گرفته‌شده، می‌تواند اثرات ضدقارچی متفاوتی از خود نشان دهند، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی به همراه

تجزیه عصاره، ماده مؤثره جداسازی شده و اثر آن به‌صورت مجزا و در ترکیب با داروهای ضدقارچی مختلف موردبررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر سعید طالبی ریاست محترم دانشگاه پیام نور مرکز داراب و جناب آقای دکتر علیرضا توسلی مسئول بخش فنی آزمایشگاه بیمارستان ولی‌عصر (عج) شهرستان فسا تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Shinde PR, Patil PS, Bairagi VA. Parmacognostic, phytochemical properties and antibacterial activity of *Callistemon citrinus viminalis* leaves and stems. Int J of pharmacy and pharmaceutical Sci. 2012;4(4):406-408.
2. Zarrinbal M, Moalemi N, Daneshvar M. Effects of different concentrations of auxins, time of cutting and enviromental conditions on rooting of the semi_hardwood cuttings of *Callistemon v*iminalis sol.JHorticultural Sci and Technology of Iran.1995;6(3):121-134. [Article in persian]
3. Ramezanian M, Ashraf mansuri SJ, Zarenejad E. study the antimicrobial activity of plant *Callistemon viminalis (SOl. ex Gaertn.)G. Don. C* on *staphylococcus aureus* and *epidermidis* bacteria. The third national conference of medical herb and stable agriculture; 2015; Hamedan:2015:51 [Article in persian]
4. Morton JF. Atlas of medicinal plants of Middle America, Bahamas to Yucatan. Charles C.Thomas, springfield, illinois. 1981.p.1420.
5. Melendez EN. Plantas medicinales de puerto rico:folklore y fundamentos cientificos, 1 ^{ed}ed. RioPiedras (Puerto Rico):Editorial de la Universidad de Puerto Rico; 1982. P.498.
6. Afrah J. Studing of antibacterial effect for leaves extract of *Callistemon viminalis* in vitro and vivo (uninary system)for rabbits. J Kerbala Univ.2012;10(2):246-254.
7. Hoepelman IM, Dupont B. Oral candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. Int J Antimicro Ag. 1996;6(3):155-159.
8. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and Candida tropicalis: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbial.2006;55(8):999-1008.
9. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother.2008; 52(9): 3259-3266.
10. Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Rol for cell dencity in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(7):2454-2463.
11. Tiyaboonchai W, Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. Int J Pharm. 2007;32(9):142-149.
12. Levinson W, Jawetz E. Summary and analysis of medical microbiology. Translation: SetoodeniaAbdulhossein.1 nd ed. Tehran: generation tomorrow; 2005.P.103. [Article in persian]
13. Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM, Sarmento VH, Chiavacci LA, Scarpa MV, et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. Colloid Surf B: Biointerfaces.2008;66(2):253-259.
14. Mahbobi M, Avijgan M, Darabi M, Kasaeian N. Effects platyloba anticandidal activity (Echinophora platyloba) the yeast *Candida albicans* compared with amphotericin. J of Med Plants. 1998;8(2):36-43. [Article in Persian]
15. Kanafani ZA, perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mecanisms and clinical impact. Clin Infect Dis.2008; 46(1):120-128.
16. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. Emerg Infect Dis.2004;10(1):9-14.
17. Motaharinia Y, Rezaee MA, Zandi F, Hosseini W, Rashidi A, Ahmadi Neaz M, et al. Comparison of the antifungal effect of licorice root, *Althoca officinalis* extracts and ketoconazole on malassezia furfur. Armaghane-danesh. J Yasuj Univ of Med Scie. 2011;16(5):425-432. [Article in Persian] 18. Razagh Parast A, Shams ghahfarokhi M, Yadegari M,Razaghi Abyaneh M. Onions and some azole antifungal effects of the drugs individually and in combination, on the pathogenic yeast.J Kowsar Med. 2008;13(2):103-113. [Article in Persian]

19.Bahmani M, Ghorbani M, Momtaz H,Bahmani E,Rafieian M.The comparison of the in-vitroo effects of Scrophularia deserti plant and amphotricin B on *Candida albicans*. J Arak Med Univ.2011;13(4):15-21. [Article in Persian]20. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asian J of Plant Sci. 2004;3(1):104-107.
21. Griggs JK, Manandhar NP, Towers GH,Taylor RS. The effects of storage on the biological activity of medicinal plants Nepal. J. Ethnopharmacol.2001;77(2-3):247-252.
22. Omidbeigi R. Production and processing of medicinal plants.1nd ed.Tehran: Tarahan publication;1995.P.191-99.[Article in Persian]
23. shahnaz H, Hifza A, Bushra K, Khan JI. Lipid studies of *Cuminium cyminum* fixed oil. Pak J Bot. 2004;36(2):395-401.
24. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MD, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum*and *Rosmarinus officinallis* essential oils. Food Chemistry. 2007;102(3):898-904.[Article in Persian]
25. Wrigley JW, Fagg M. Bottlebrushes, Paperbarks and tea trees and all other plants inn the leptospermum alliance. 1nd ed. Sydney, Ustralia: Angus & Rovertson; 1993.p.352.
26. Wollenweber E, Wehde R, Dorr M, Lang G, Stevens JF. C-methyl flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. Phytochemistry. 2000;55(8):965-970.
27.Huq F,Misra LN. An alkenol and C-methylated flavones from *Callistemon lanceolatus* leaves. planta Med. 1997;63(4):369-370.
28. Tyler VE, Brady LR, Robbert JE. Pharmacoghosy. 9thed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1988. p.56-58.
29. Carson CF, Riley TV.Antimicrobial activity of major components of the essential oils of *Melaleuca alternifolia*.J. Exp. Biol Sci. 1995;78(3):264-269.
30. Tzakou O, Pitarokili D, Chinou IB, Harvala C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. Planta Med. 2001;67(1):81-83.
31. Mourey A, Canillac N. Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. Food Control.2002;13(4-5):289-292.
32. Viljoen A, Vuuren SV, Eenst E, Kelepser M, Demirci B, Van Wyk B. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial and remedy. J. Ethnopharmacol. 2003;88(2,38):137-143. 33. Sudhakar M, Raju Du. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of indian *Callistemon lanceolatus* leaves. Int. J. Chem. Sci.2005;3(3):513-516. 34. Dutta BK, Karmakar S,Naglot A, Aich JC, Begam M. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in india. Mycoses. 2007;50(2):121-124.
35.Dongmo BN, Dongmo PM, Ngoune LT, Kwazou NL, Zollo PH, Menut C. Antifungal activities of essential oils of some Cameroonian Myrtaceae on *Aspergillus flavus* link ex. Fries. Asian J. Exp. Biol. Sci. 2010;1(4):907-914.
36. Misra LN, Huq F, Ahmad A, Dixit AK. Chemical composition of the essential oils of *Callistemon lanceolatus* DC and C. polandii F.M. Bailey. J. Essential oil Res.1997;9(6):625-628.
37. Pandey AK. Fungitoxicity of essential oil of *Callistemon lanceolatus* DC. against some sugarcane pathogens. National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sci. 1995;65(1):73-80.
38. Pandey DK, Chandra H, Tripathi NN. Volatile oil fungitoxic activity of some higher plants with special reference to that of *Callistemon lanceolatus* DC. Phytopathologische Zeitschrift. 1982;105(2):175-182.
39. Delahaye Ch, Rainford L, Nicholson A, Mitchell S, Lindo J, Ahmad M. Antibacterial and antifungal analysis of crude extracts from the leaves of *Callistemon viminalis*. Med and biological sci. 2009;3(1):1-7
40. Haque E, Sultana A, Alam shibib B, Islam M. Antimicrobial, Antioxidant and cytotoxic activities of Callistemon citrinus (curtis) skeels. Dhaka Univ. J. Pharm. 2012;11(1):51-54.

Original Article

Comparing the Effect of Methanolic and Aquatic Extract of *Callistemon viminalis* (SOl. Ex Gaertn.) G. Don with Amphotericin B and Their Synergistic Effects

Ashraf Mansuri SJ[1]*, Ramezanian M[2], Musavifard R[3]

1. Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
2. Department of biology, Payame Noor University, Iran
3. Clinical Research Development Unit of Vali Asr Hospital, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Received: 16 Oct 2015 Accepted: 09 Jan 2016

Abstract

Background & Objective: The emergence of fungal drug-resistance and also different side- effects related to the currently available drugs has led to a high demand for novel antifungal drugs. The purpose of this study was to evaluate the inhibitory activity of methanolic and aquatic extracts of *Callistemon viminalis*on on the growth of *Candida albicans* in vitro.

Materials & Methods: Having dried the leaves, the researchers prepared the extracts by distillation using methanol and water. The minimum lethal activity of 500, 250 and 125 µg/ml concentrations of the extracts on the yeast *C.albicans* was tested using disk diffusion and dilution method. In order to study the synergistic effect, a standard strain of *C. albicans* was cultured on medium containing methanol extract and then amphotericin B discs were put on it.

Results: Based on the results, the antifungal activity of *Callistemon viminalis* methanol extract on *C.albicans* was more than the aqueous extract. In considering the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the methanol extract of the *Callistemon viminalis* at a concentration of 62.5µg/ml and the aqueous extract at a concentration of 250µg/ml inhibitory effect on *C. albicans*. The inhibition zone diameter of amphotericin B was 18mm and should be combined with *Callistemon viminalis* methanol extract at a concentration of 62.5µg/ml was 21mm, and also in combination with the aqueous extract at a concentration 250µg/ml it was 19 mm.

Conclusion: Although amphotericin B is the most effective drug for treating systemic fungal infections, its effect will increases when combined with Callistemon viminalis extracts.

Keywords: Callistemon viminalis, Candida albicans, methanol and aqueous extract, Amphotericin B

***Corresponding author: Sayed Jalaladdin Ashraf Mansuri,** Fasa University of Medicin Sciences, Fasa, Iran
E.mail: nanojalal_microjalal@yahoo.com