



Scan online to view this article

Comparison of anti-candida effects of aqueous, ethanolic extracts and essential oil of *E. angustifolia* with fluconazole on the growth of clinical strains of *Candida*
Tohid Piri Gharaghie^{1,*}, Sameh Hajimohammadi²

1. Sina Borna Aria (SABA) Co., Ltd Lab, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, University Of Eyvanakey, Eyvanakey Branch, Eyvanakey, Iran.

Abstract

Aim and Background: *Candida* species are *opportunistic* pathogens that can be considered as the main cause of a wide range of diseases. Due to the increased resistance of these fungi to chemical drugs and also the adverse effects of these compounds on patients, it is necessary to replace these drugs with herbal compounds. In this study, the antifungal effect of aqueous and ethanolic extracts and essential oil of *E. angustifolia* on the growth of *Candida albicans* with fluconazole was compared.

Materials and Methods: In this laboratory study conducted in 1398 in Shahrekord Azad University Biotechnology Research Center, 80 candidate fungal samples were prepared from Parsian Hospital in Shahrekord and 50 *Candida albicans* samples were isolated by diagnostic tests. *E. Angustifolia* plants were obtained from Shahrekord Azad University Faculty of Agriculture. The extract was extracted by percolation and the essential oil was extracted by water distillation. The antifungal effect of *E. angustifolia* extracts along with *E. angustifolia* essential oil with fluconazole was compared on these isolates by disk diffusion and microdilution methods.

Results: The minimum and maximum diameter zone of inhibition obtained by disk diffusion method for *E. angustifolia* extracts, no growth halo formation with 1 and the lowest and maximum halo diameter for *E. angustifolia* essential oil were 6 and 37 mm. Therefore, the mean diameter of non-growth zone of inhibition for *E. angustifolia* extracts was 1 and for *E. angustifolia* the essential oil was 23.4 mm. Comparison of the mean diameter of 25 mg fluconazole inhibition zone as control with an average of 16.26 mm shows a weaker antifungal performance and a significant difference compared to *E. angustifolia* essential oil. ($P \leq 0.05$). The minimum inhibitory concentrations (MIC) of ethanolic and aqueous extracts of *E. angustifolia* and fluconazole were 4, 8, and 8 mg/ml, respectively; While the minimum fungicidal concentrations (MFC) were 8, 16, and 8 mg/ml, respectively; Showed a significant difference in inhibition of *E. angustifolia* ethanolic extract compared to 25 mg fluconazole disk ($P \leq 0.01$).

Discussion and Conclusion: According to the results of the above research, it seems that the ethanolic extract of *E. angustifolia* can be used as a suitable drug candidate with better antifungal performance than fluconazole in the pharmaceutical industry.

Keywords: Essential oil, Fluconazole, *Candida albicans*, *E. angustifolia* extract, Iau Science .

Corresponding author:

Sina Borna Aria (SABA) Co., Ltd Lab, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Email: tohidpirie@yahoo.com

برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنیدمقایسه اثرهای ضد کاندیدایی عصاره های آبی و اتانولی
و اسانس گیاه سرخارگل (*Echinacea angustifolia*)با داروی فلوکونازول بر رشد سویه های کلینیکی قارچ کاندیدا آلبیکنس
توحید پیری قراقیه^{۱*}، سامه حاجی محمدی^۲

۱. شرکت سینا برنا آریا (SABA)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه برق، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه غیرانتفاعی واحد ایوانکی، ایوانکی، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: گونه های کاندیدا، پاتوژن های فرصت طلبی هستند که به دلیل افزایش مقاومت به داروهای شیمیایی لازم است که داروهایی با ترکیب های گیاهی جایگزین این داروها شود. در این تحقیق به مقایسه اثر ضدقارچی عصاره آبی و اتانولی و اسانس قسمت گلریزه گیاه *E. angustifolia* روی رشد کاندیدا آلبیکنس با داروی فلوکونازول پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۸ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد انجام گرفت، ۸۰ نمونه قارچی کاندیدایی از بیمارستان پارسیان شهرکرد تهیه و با انجام تست های تشخیصی ۵۰ نمونه کاندیدا آلبیکنس جدا شد. بوته های گیاه *E. angustifolia* از مزرعه آموزشی پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد شهرکرد تهیه شد. استخراج عصاره به روش پرکولاسیون و استخراج اسانس به روش تقطیر با آب صورت گرفت. مقایسه اثر ضدکاندیدایی عصاره و اسانس *E. angustifolia* با داروی فلوکونازول، با دو روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن برات انجام شد.

نتایج: میانگین قطر هاله های عدم رشد برای عصاره های *E. angustifolia* ۱ و برای اسانس *E. angustifolia* ۲۳/۴ میلی متر بود. مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد فلوکونازول ۲۵ میلی گرمی به عنوان شاهد با میانگین ۱۶/۲۶ mm نشان دهنده عملکرد ضدقارچی ضعیف تر و تفاوت معنی دار آن نسبت به اسانس *E. angustifolia* است ($P \leq 0.05$). میانگین حداقل غلظت عصاره اتانولی و آبی *E. angustifolia* و فلوکونازول به ترتیب ۴، ۸ و ۸ mg/ml برای MIC و ۸، ۱۶ و ۸ mg/ml برای MFC بود؛ که تفاوت معنی دار با دارندگی عصاره اتانولی *E. angustifolia* نسبت به دیسک ۲۵mg فلوکونازول را نشان داد ($P \leq 0.01$).

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از تحقیق فوق، به نظر می رسد عصاره اتانولی گیاه *E. angustifolia* می تواند به عنوان یک کاندید دارویی مناسب با عملکردی ضدقارچی بهتر از فلوکونازول در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اسانس، فلوکونازول، کاندیدا آلبیکنس، عصاره *E. angustifolia*، Iau Science

مقدمه

کاندیدایزیس یکی از مهم ترین و شایع ترین عفونت های قارچی فرصت طلب در انسان است که به وسیله برخی از گونه های مخمری کاندیدا به ویژه کاندیدا آلبیکنس ایجاد می شود (۱). شیوع این عفونت ها در دو دهه گذشته رشد چشم گیری داشته است، به گونه ای که در فاصله سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۲۰ رشد این عفونت ها به طور تقریبی ۵ برابر

نویسنده مسئول:

شرکت سینا برنا آریا (SABA)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
پست الکترونیکی: tohidpirie@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰

(۱۰،۱۱). داروهای گروه آژولها بهویژه فلوکونازول یک تریآزول دوتایی و فلورینه شده محلول در آب است که به دلیل وزن مولکولی کم، جذب آن سریع بوده و قابلیت انتشار به اکثر بافت‌های بدن را دارد. این داروها در بیماری‌های قارچی به خصوص کاندیدیازیس بسیار زیاد استفاده می‌گردند. فلوکونازول یک داروی آژولی است که با مهار آنزیم ۱۴ آلفا دی‌متیلاز اثرهای ضدقارچی خود را اعمال می‌کند. این دارو به‌طور وسیع در بیماری‌های قارچی به خصوص کاندیدیازیس استفاده می‌گردد (۱۱). به دلیل افزایش مقاومت در بین گونه‌های کاندیدیایی به داروهای شیمیایی و همچنین اثرهای نامطلوبی مثل تهوع، درد شکمی، استفراغ و سردرد، راش‌های پوستی و... این ترکیبها بر روی بیماران لازم است تحقیقات بیشتر تری در جهت جایگزینی این ترکیبها با ترکیب‌های گیاهی بدون عارضه جانبی یا ترکیب‌های شیمیایی و یا سنجش هم‌اثری این ترکیبها با آنتی‌بیوتیکها، جهت کاهش سمیت داروهای شیمیایی انجام شود (۱۲).

E. angustifolia از جمله گیاهانی که در سال ۱۹۴۰ در فهرست ملی گیاهان دارویی آمریکا قرار داشت اما پس از جایگزینی انواع آنتی‌بیوتیکها از فهرست مزبور حذف شد (۱۳،۱۴). سرخارگل گیاهی علفی و چند ساله از تیره کاسنی است که ارتفاع آن حداکثر به ۱ تا ۱/۵ متر می‌رسد. برگ‌های پایین ساقه تخم‌مرغی تا نيزه‌ای شکل هستند که حداکثر ۳۰ سانتی‌متر طول و ۲۰ سانتی‌متر عرض دارند (۱۳). پلی‌ساکاریدهای این گیاه شامل اکیناسائین، اکیناکوزید و آکینولون هستند که دارای خواص دارویی و ضد میکروبی مشابه با ترکیب‌های گیاه سیر و آلیسین است (۱۳،۳۴). این گیاه در سال‌های اخیر به‌علت مقاومت‌های میکروبی بار دیگر مورد توجه قرار گرفته است و در طب سنتی در درمان سرماخوردگی، مارگزیدگی، سینوزیت و مسمومیت‌های خونی استفاده می‌شود. عصاره این گیاه هم‌چنین بر سیستم گوارش اثر داشته و دارای اثرهای تب‌بری و ضد رونشیت است. از خواص دیگر این گیاه می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، التیام زخم، درمان مالاریا و ... اشاره کرد (۱۵). از آنجا که مطالعه‌ای بر روی اثرهای ضدقارچی عصاره قسمت گل‌ریزه گیاه *E. angustifolia* روی رشد کاندیدا آلبیکنس بررسی نشده است، لذا در این مطالعه به منظور مقایسه اثر ضدقارچی عصاره‌های آبی و اتانولی *E.*

شده است (۲،۱). این قارچ فرصت‌طلب می‌تواند موجب تظاهرات بالینی فراوانی از قبیل برفک، واژینیت، عفونت پوست، اندوکاردیت^۱، مننژیت^۲، آبسه مغزی، آرتریت^۳، پیلونفریت^۴ و ... در میزبان انسانی شود (۳). کاندیدا آلبیکنس جزئی از فلور طبیعی سطوح مخاطی حفره دهانی، دستگاه گوارش و واژن است. این قارچ در سطوح مخاطی کلونیزه می‌شود و بنابراین بیش‌تر عفونت‌های درون زاد از این ناحیه ایجاد می‌شود (۳). اکثر افراد با مکانیسم دفاعی فیزیولوژیک و سیستم ایمنی سالم، رشد و انتشار این مخمر را کنترل می‌کنند. ولی تحت شرایط خاص و با وجود فاکتورهای مستعد کننده از قبیل دیابت، نقص سیستم ایمنی، مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف این فرصت ایجاد می‌شود تا کاندیدا آلبیکنس از شکل هم‌زیست به شکل بیماری‌زا تبدیل شود و قابلیت ایجاد عفونت در بافت‌های مختلف و امکان ایجاد بیماری سیستمیک کشنده را داشته باشد (۳،۴). در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی از شکست در درمان مبتلایان به اشکال بالینی متفاوت کاندیدیازیس اشاره شده است (۴-۱). داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون‌های متفاوت جهت درمان وجود دارد که در بسیاری موارد به دلیل عدم پاسخ مناسب به درمان بیماری به شکل مزمن در آمده، گاهی عودهای مکرر مشاهده می‌شود (۵،۶). در میان داروهای ضدقارچی داروی فلوکونازول به دلیل انتشار مناسب در اکثر بافت‌های بدن میزبان، استفاده گسترده تری در درمان اشکال موضعی و منتشره بیماری دارد (۷). در سال‌های اخیر مطالعه‌های انجام گرفته در مورد حساسیت گونه‌های کاندیدا نسبت به داروهای ضدقارچی و به خصوص فلوکونازول، مکانیسم‌های مولکولی مختلفی را در جهت بیان دلایل مقاومت دارویی گونه‌های کاندیدا نشان داده است (۸،۹). هم‌چنین نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضدقارچی که خود منجر به بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آن‌ها می‌گردد و شناسایی بعضی از فاکتورهای ژنتیکی در ارتباط با مقاومت دارویی نسبت به فلوکونازول محدودیت‌هایی را در استفاده از این قبیل ترکیب‌های ضدقارچی به وجود آورده است، لذا تحقیقات مختلفی در زمینه یافتن ترکیب‌های ضدقارچی مؤثر با منشاء طبیعی و اثرهای جانبی کم‌تر انجام پذیرفته است

¹Endocardit

²Meningitis

³Arthritis

⁴Pyelonephritis

angustifolia با داروی فلوکونازول روی رشد کاندیدا/آلبیکس پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سویه های مخمری

به‌دنبال کشت ۸۰ نمونه قارچی کاندیدایی جداسازی شده از بیماران مبتلا به اشکال بالینی مختلف کاندیدیا یزیس که در طول سال ۱۳۹۸ به آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی بیمارستان پارسین شهرکرد مراجعه کرده بودند، نمونه‌ها ابتدا در محیط سابورو دکستروز آگار کشت و سپس از لحاظ میکروسکوپی و ماکروسکوپی تعیین گونه گردیدند. سپس کلنی‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط پوتیتودکستروز آگار^۵ (PDA) کشت داده شدند. مقدار ۳ ml سالیان استریل ریخته با خراش پیپت پاستور روی سطح کلونی و تکان آرام محیط، کونیدی‌ها و هایفاها معلق و به‌وسیله شیکر مخلوط شدند. سپس جهت شناسایی سویه‌های قارچی از محیط افتراقی کروم آگار کاندیدا (تالیژن پارس، ایران) استفاده شده رنگ و مورفولوژی کلنی‌ها برای هر یک از جدایه‌ها ثبت شد. چگونگی جذب قند در ۳ نوبت به فاصله‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به حفره شاهد توسط هر یک از مخمرها با استفاده از کیت API20C (شرکت Biomerieux SA، فرانسه) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتایج براساس الگوی ارائه شده کارخانه برای شناسایی کاندیدا/آلبیکس (شکل 1C) تعیین هویت شدند (۱۶).

تهیه مواد دارویی و گیاهی

تهیه دیسک‌های فلوکونازول و رقت‌های دارویی

طبق استاندارد انتشار از دیسک CLSI 2018، برای تهیه دیسک‌های ۲۵ میلی گرمی فلوکونازول، ۲ میلی گرم پودر آن (Apotex, CANADA) را در ۱ میلی لیتر بافر فسفات سالیان حل کرده پس از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه استریل و توسط فیلتر سرنگی، فیلتر و به‌میزان ۱۲/۵ میکرولیتر استوک دارویی بر روی دیسک‌ها با قطر ۵ میلی-متر تلقیح و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شده و پس از خشک شدن در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در این بررسی داروی ضدقارچی (پارس دارو، ایران) به‌صورت پودری بود که از فرمول زیر استفاده شد:

$mg = (\mu g) / ml$ (غلظت) وزن

$(\mu g) / (ml) \times$ (درجه خلوص) حجم
(ml)

طبق پروتکل مؤسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی M-27-A، چون رقت ۱۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نیاز بود، ۱۶ میلی گرم از دارو مذکور با درجه خلوص ۹۹/۹ میلی گرم بر میلی لیتر در ۱۰ میلی لیتر حلال آب حل گردید تا محلول استوک دارویی با رقت حدود ۱۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر حاصل شد. سپس به‌منظور تهیه رقت‌های دارویی از محیط کشت RPMI 1640 (HyClone, China) به‌نسبت ۱ به ۵۰ استفاده گردید و رقت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از طریق رقت‌های سریالی تهیه گردید (۳۸). چون ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت برای یک تست استفاده می‌شود پس ۱ میلی لیتر حدودی برای ۸ تست کافی است (۱۷).

تهیه اسانس و عصاره‌های گیاهی

الف: تهیه عصاره آبی و اتانولی *E. angustifolia*

بوته‌های گیاه *E. angustifolia* کشت شده در مزرعه آموزشی پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد شهرکرد توسط کارشناس تأیید هویت شد. سپس قسمت گلریز گیاه خشک شده و ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۳ ساعت روی هیتر برقی با دمای ۷۰-۸۰ درجه سلسیوس خیسانده، قرار گرفت. سپس عصاره آبی جمع‌آوری شده و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس جهت مصارف بعدی نگهداری شد. جهت تهیه عصاره اتانولی ۵۰ گرم از قسمت گلریز گیاه در ۲ لیتر الکل ۷۰ درصد پس از سه روز در دستگاه روتاری در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه گذاشته شد. سپس حلال توسط دستگاه روتاری، جدا شد. پس از آن عصاره‌ها سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور بر دقیقه تا ۱۰ دقیقه) و فیلتر (۰/۴۵ میکرومتر) شده و در یخچال ۰-۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. اطراف لوله آزمایش توسط فویل برای جلوگیری از رسیدن نور به عصاره پوشانده شد (۱۸).

ب: تهیه اسانس

جهت تهیه اسانس به‌روش تقطیر با بخار آب، ۵۰ گرم از

۲۴ ساعت کمترین غلظتی از عصاره *E. angustifolia* و دارو فلوکونازول که قارچ در آن رشد نکرده بودند به عنوان مقادیر MFC گزارش شدند. از سویه کاندیدا آلبیکنس ATCC 18804 و ATCC 1023 به عنوان سویه استاندارد به منظور صحت عملکرد و کنترل کیفیت کار استفاده شد (۲۲).

آنالیز آماری

از نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS برای انجام آنالیز آماری نتایج استفاده شد. تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) به همراه آزمون Tukey برای مقایسه داده‌ها استفاده شد. تمامی آزمون‌ها به شکل ۳ بار تکرار انجام شد. رسم نمودارها با نرم افزار گرافد پرسیم ۸ انجام شد. در این مطالعه از لحاظ آماری اختلاف میانگین‌ها در سطح $P < 0.01$ و $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

نتایج

در بررسی رنگ آمیزی این پژوهش، تمام ۸۰ نمونه که از بیماران مبتلا به عفونت‌های جلدی، مخاطی، واژینال و عمیق تهیه شده بودند، سلول‌های مخمری جوانه‌دار در لام تشکیل دادند. پس از کشت این نمونه‌ها در محیط کروم آگار، ۵۰ مورد کلنی سبز رنگ مشاهده شد که به عنوان جدایه کاندیدا آلبیکنس شناسایی شدند. ۱۲ مورد دارای کلنی بنفش رنگ بودند که به عنوان کاندیدا گلابراتا، ۱۳ مورد کلنی صورتی رنگ به عنوان کاندیدا کروزه ای و ۵ مورد کلنی آبی با هاله قهوه‌ای به عنوان کاندیدا تروپیکالیس شناسایی شد. سپس آزمایش جذب قند با کیت API20C (شرکت Biomerieux SA، فرانسه) انجام و نوارهای رنگی جهت تشخیص گونه کاندیدا آلبیکنس در شکل ۱ C نشان داده شد. ۵۰ نمونه کاندیدا آلبیکنس جداسازی شده به عنوان منبع برای تست‌های دارویی مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از دیسک‌های تهیه شده طبق پروتکل موسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی M-27-A، با رقت ۱۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تست آنتی بیوگرام سویه‌های قارچی انجام و هر یک از سویه‌ها درصدی از مقاومت را از خود نشان دادند.

نتایج دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) فلوکونازول و عصاره *E. angustifolia*

در این روش ۴ تیمار مختلف را برای نمونه‌های مختلف قارچ کاندیدا آلبیکنس در نظر گرفته و داده‌های مربوط به هر تیمار برحسب میلی‌متر ثبت گردید. داروی شیمیایی فلوکونازول با ۲ تیمار عصاره آبی و اتانولی و ۱ تیمار اسانس *E. angustifolia* مقایسه و عملکرد آن‌ها ارزیابی شد. در این روش، بیش‌ترین عدد در هر ردیف نمونه بهترین عملکرد محسوب می‌شود. هر چه اندازه هاله بیش‌تر باشد، میکروارگانیسم مقاومت کم‌تری نسبت به آن دیسک دارد. عصاره آبی و اتانولی اتانولی *E. angustifolia* در این روش واکنشی نشان ندادند (شکل ۲).

انحراف معیار یکی از شاخص‌های پراکندگی است که نشان می‌دهد به‌طور میانگین داده‌ها چه مقدار از مقدار متوسط فاصله دارند. اگر انحراف معیار مجموعه‌ای از داده‌ها نزدیک به صفر باشد، نشانه آن است که داده‌ها نزدیک به میانگین هستند و پراکندگی اندکی دارند؛ در حالی که انحراف معیار بزرگ بیانگر پراکندگی قابل توجه داده‌ها است. به‌طور معمول داده‌های با اختلاف بیش‌تر از دو انحراف معیار از مقدار میانگین به‌عنوان داده‌های پرت در نظر گرفته و از تحلیل، خارج می‌شوند. مطابق با شکل ۲ (ب) انحراف معیار فلوکونازول کم‌تر از اسانس *E. angustifolia* بود که نشان‌دهنده دامنه عملکردی ضدقارچی بهتر فلوکونازول نسبت به اسانس *E. angustifolia* است. هم‌چنین میانگین قطر هاله عدم رشد فلوکونازول بیش‌تر از اسانس *E. angustifolia* بود که نشان از خاصیت ضدقارچی بهتر آن نسبت به اسانس هیچ هاله عدم رشدی در این روش برای عصاره‌های آبی و اتانولی در تمام تیمارها وجود نداشت که برای محاسبه آماری برابر با یک در نظر گرفته شد. در روش آماری به‌جای عدد حداقل، ۱ و به‌جای بیش‌تر از ۳۰ عدد ۳۱ را قرار دادیم، تا از لحاظ آماری قابل توجه باشد. فقط در ۴ سویه شماره ۲، ۲۸، ۲۹ و ۳۱ بیش‌ترین مقدار هاله عدم رشد برای داروی فلوکونازول برابر با ۳۱ بود در حالی که برای اسانس *E. angustifolia* تعداد ۱۳ سویه هاله عدم رشد ۳۱ را نشان دادند. در این روش داروی فلوکونازول با اسانس *E. angustifolia* و ۲ تیمار دیگر مقایسه شد، و طبق مجموع داده اندازه هاله‌ها و میانگین آن‌ها، مشخص شد که اسانس *E. angustifolia* عملکرد مشابه و حتی بهتری نسبت به داروی فلوکونازول دارد. چون هر چه اندازه هاله بیش‌تر باشد خاصیت ضدقارچی بهتر است. انحراف معیار اسانس *E. angustifolia* بسیار زیاد بود. داده‌های اسانس



Glucose Maltose Sucrose Lactose Trehalose Cellobios Raffinose



شکل ۱- قسمت A. سلول‌های مخمری جوانه‌دار در لام؛ قسمت B. کلنی سبز رنگ کاندیدا آلبیکنس در محیط کروم آگار؛ قسمت C. نوار رنگی جهت تشخیص کاندیدا آلبیکنس توسط کیت API20C

با توجه به جمع داده‌ها و مقدار میانگین عصاره اتانولی *E. angustifolia* در مقایسه با تیمار شاهد فلوکونازول، عملکرد بهتری داشته است. از لحاظ آماری نیز هر چه انحراف معیار کم‌تر باشد بهتر است، یعنی عصاره‌ها هم‌خوانی بهتری در هر تیمار نسبت به داروی شیمیایی فلوکونازول داشتند. با توجه به نتایج، انحراف معیار عصاره‌های گیاهی *E. angustifolia* نسبت به فلوکونازول کم‌تر است که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار و عملکرد بهتر عصاره‌ها نسبت به فلوکونازول است ($P \leq 0.05$). هم‌چنین بین عصاره‌های گیاهی کم‌ترین انحراف معیار مربوط به عصاره اتانولی *E. angustifolia* است که این عصاره خاصیت ضد قارچی بهتری را از خود نشان داد.

حداقل غلظت کشندگی (MFC⁶) فلوکونازول و عصاره *E. angustifolia*

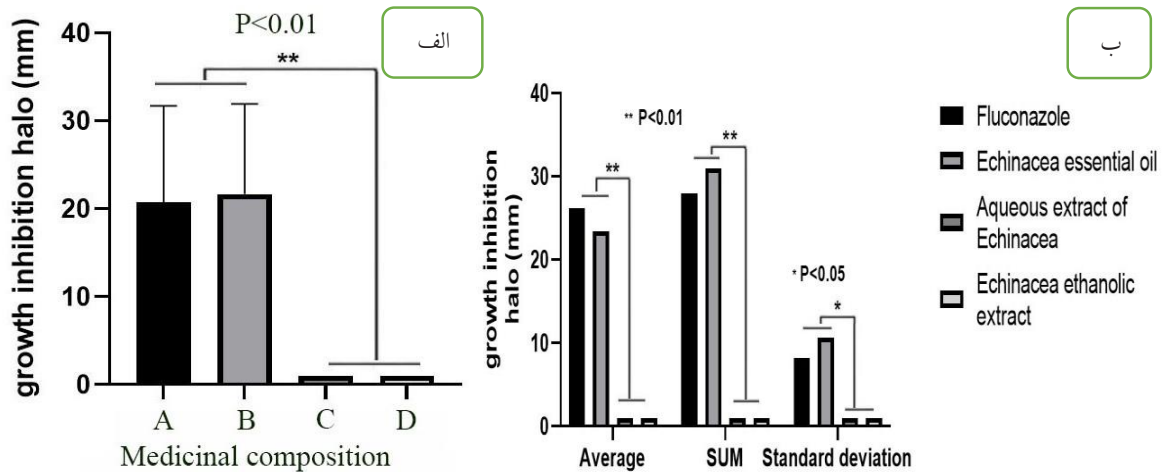
در این روش نیز (MFC) برای هر ۵۰ نمونه مختلف قارچ کاندیدا آلبیکنس ۳ تیمار در نظر گرفته، داروی شیمیایی

E. angustifolia پراکنش بیش‌تری داشتند. عصاره آبی *E. angustifolia* بود ($P < 0.05$). از این‌رو، با این‌که نتایج کلی میزان بازدارندگی نشان‌دهنده عملکرد جزیی بهتر اسانس نسبت به فلوکونازول است (شکل ۲ الف)، اما با توجه به انحراف معیار بالای اسانس (۲ ب) می‌توان چنین نتیجه گرفت که نتایج کلی تست دیسک دیفیوژن بر ای تعیین عملکرد ضدقارچی کافی نیست و لزوم تحقیقات بیش‌تر را آشکار می‌کند.

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) فلوکونازول و عصاره *E. angustifolia*

در این تست حداقل غلظت بازدارندگی داروی فلوکونازول با ۲ عصاره از گیاه *E. angustifolia* مقایسه و عملکرد آن‌ها ارزیابی شد. کم‌ترین عدد در هر ردیف نمونه، بهترین عملکرد برای MIC محسوب شد. چون در همان غلظت کم از دارو رشد قارچ متوقف شده است. هر چه در غلظت کمی رشد قارچ متوقف شود، اثرپذیری دارو بیش‌تر است (جدول ۲).

⁶ Minimum fungicidal concentration



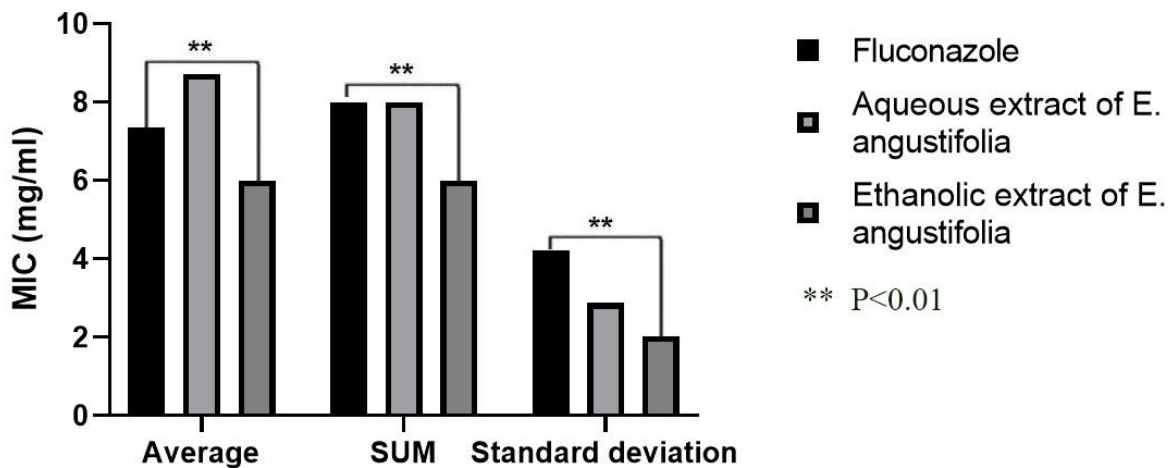
شکل ۲- نمودار مربوط به مقایسه میانگین، میانه و انحراف معیار در روش Disk برای ۴ تیمار. میزان بازدارندگی نشان دهنده عملکرد جزئی بهتر اسانس نسبت به فلوکونازول است.

الف) میزان بازدارندگی کلی فلوکونازول (A) نسبت به اسانس (B)، عصاره های آبی (C) و الکلی (D)

ب) انحراف معیار، میانه و میانگین عصاره های آبی، الکلی و اسانس *E. angustifolia* نسبت به فلوکونازول

عصاره اتانولی *E. angustifolia* عملکردی بهتر یا مشابه به فلوکونازول را نشان داد. مطابق نتایج MFC، تفاوت جزئی در عصاره اتانولی *E. angustifolia* با داروی فلوکونازول وجود داشت، هر چند که این تفاوت معنی دار نبود ($P > 0.05$). از لحاظ آماری هر چه انحراف معیار کم تر باشد بهتر است. از این رو، داروی فلوکونازول و عصاره اتانولی *E. angustifolia* داده های آماری مناسب با خطای میانگین

فلوکونازول با ۲ عصاره مختلف آبی و اتانولی از گیاه *E. angustifolia* مقایسه شد. کمترین عدد در هر ردیف نمونه بهترین عملکرد محسوب شد. چون در همان غلظت کم از دارو قارچ می میرد. هر چه در غلظت کمتری دارو باعث مرگ قارچ شود، اثرپذیری دارو بیشتر است. عصاره آبی *E. angustifolia* در ۲۷ سویه مقدار MFC بیش تری را نسبت داروی فلوکونازول نشان داد که نشان دهنده عملکرد ضعیف آن نسبت به فلوکونازول بود. در حالی که در ۳۸ سویه قارچی،



شکل ۳- نتایج آزمایشگاهی روش MIC، عصاره ها و فلوکونازول. کمترین عدد در هر نمونه، بهترین عملکرد برای MIC محسوب می شود. براین اساس، عصاره اتانولی *E. angustifolia* دارای کمترین مقدار MIC است و نسبت به فلوکونازول تفاوت معنی داری در سطح $P < 0.01$ را نشان می دهد.

حداقل را در بین تیمارها دارا بودند. عدد میانه عصاره اتانولی *E. angustifolia* و فلوکونازول یکسان بود.

طبق نتایج آنالیز داده‌ها MIC و MFC میانگین رشد ۳ تیمار با هم برابر نیست. ولی بین تیمار ۱ (فلوکونازول) با تیمار عصاره اتانولی *E. angustifolia* تفاوت معناداری وجود دارد که نشان‌دهنده عملکرد کلی بهتر عصاره اتانولی *E. angustifolia* نسبت به فلوکونازول است. هم‌چنین آنالیز نتایج دیسک دیفیوژن نشان داد که میانگین رشد تیمارها (۴ تیمار حاوی فلوکونازول، اسانس *E. angustifolia*، عصاره آبی و اتانولی *E. angustifolia*) با هم برابر نیست و بین تیمار ۱ (فلوکونازول) با تیمارهای ۲ و ۳ و ۴ (عصاره‌های *E. angustifolia* و اسانس *E. angustifolia*) تفاوت معناداری وجود دارد. در واقع، عصاره‌ها بهتر از اسانس در این روش به آزمایش دیسک واکنش نشان داده است. اما مقایسه عملکرد اسانس *E. angustifolia* نسبت به تیمار شاهد (فلوکونازول) حاکی از عملکرد بهتر فلوکونازول است.

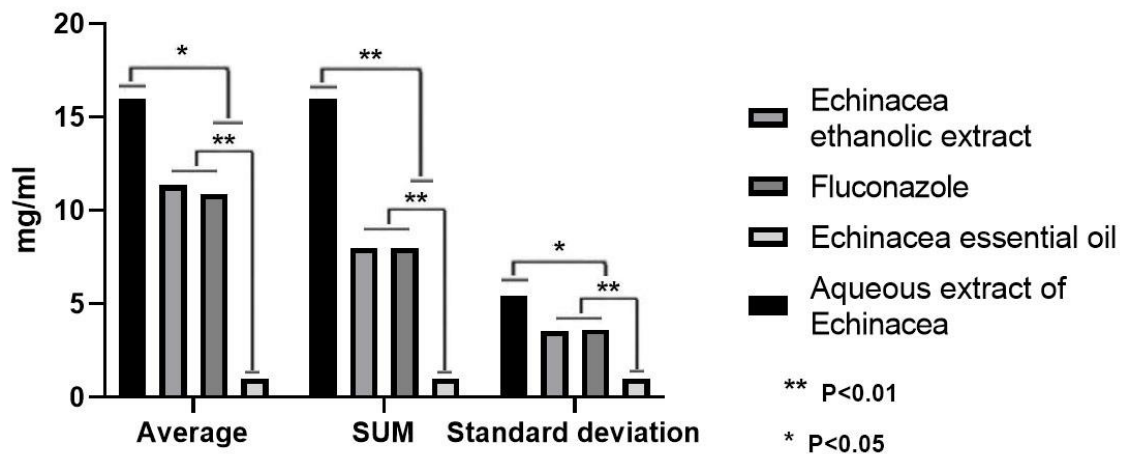
بحث

عفونت‌های قارچی سیستمیک ناشی از کاندیدا/آلبیکنس در طول سالیان اخیر به دلیل افزایش بیماری‌های تضعیف‌کننده

سیستم ایمنی نظیر ایدز، بدخیمی‌های خونی، مصرف بی‌رویه کورتیکواستروئیدها، به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر به‌خصوص برای بیماران بستری در بیمارستان مطرح است (۲۰). شیوع این عفونت‌ها و استفاده بی‌رویه از ترکیب‌های ازولی مثل فلوکونازول باعث ایجاد مقاومت قارچی به این دارو شده است (۲). لذا استفاده از ترکیب‌ها جایگزین به‌ویژه گیاهان دارویی جهت درمان و پیشگیری از مقاومت ثانویه توصیه می‌گردد.

نتایج مطالعه Sharifi-Rad و همکاران (۲۰۱۸) با هدف بررسی خواص دارویی گونه‌های اکیناسه، کشت آن‌ها، ترکیب شیمیایی و کاربردهای بالقوه این گیاهان به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدان و ضدباکتری نشان داد که عصاره گیاه اکیناسه دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی و ایمنی بالایی است (۲۲).

بررسی خواص دارویی گونه‌های اکیناسه، کشت آن‌ها، ترکیب شیمیایی و کاربردهای بالقوه این گیاهان به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدان و ضدباکتری نشان داد که عصاره گیاه اکیناسه دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی و ایمنی بالایی است (۲۲).



شکل ۴- مقایسه انحراف معیار، میانگین و میانه عصاره‌های *E. angustifolia* با فلوکونازول در روش MFC. عصاره آبی *E. angustifolia* مقدار MFC بیش‌تری را نسبت به داروی فلوکونازول نشان داد که نشان‌دهنده عملکرد ضعیف آن نسبت به فلوکونازول است. اما عصاره اتانولی نتایج مشابه با فلوکونازول را نشان داد.

Carolina Chiellini و همکاران (۲۰۱۷) مطالعه‌ای تحت عنوان داده‌های اولیه در مورد فعالیت ضدباکتریایی انجمن-های باکتریایی مرتبط با گیاه *Echinacea purpurea* در برابر سویه‌های کمپلکس *Burkholderia cepacia*، پاتوژن-های فرصت طلب بیماران فیبروز کیستیک انجام دادند. نتایج این گروه نشان داد که باکتری‌های هم‌زیست با گیاه *E. angustifolia* فعالیت ضد *Burkholderia cepacia* بالایی از خود نشان دادند. این مطالعه نشان داد که ترکیب‌های گیاهی اثرهای خوبی روی میکروارگانیسم‌ها دارند و می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان به داروهای گیاهی و به-احتمال ترکیب‌های جدیدی در جهت درمان عفونت‌های کاندیدیایی دست یافت (۲۴).

Bagheri و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضدقارچی *Fumaria officinalis*، *Echinacea angustifolia*، سرکه سیب و انگور و فلوکونازول در برابر *Candida albicans* و *Candida glabrata* جدا شده از کاندیدیازیس واژن را بررسی کردند. براساس نتایج مطالعه این گروه، فلوکونازول در مقایسه با ترکیب‌های آلی مورد مطالعه، منطقه مهار بیش‌تری داشت. با این‌حال، سرکه‌های سیب و انگور تأثیر قابل‌توجهی در میان ترکیب‌های طبیعی داشتند. سایر ترکیب‌ها هیچ تأثیر قابل توجهی نداشتند. از این‌رو گیاهان و سرکه‌های طبیعی منطقه مهار کم‌تری نسبت به فلوکونازول داشتند، هیچ عارضه جانبی جدی نداشتند و هزینه بسیار کم‌تری را تحمیل می‌کردند (۲۵).

S. Merali و همکاران (۲۰۰۳) مطالعه‌ای تحت عنوان ارزیابی فعالیت ضدقارچی و ضد التهابی جنس *Echinacea* علیه اکثر قارچ‌های بیماری‌زا نشان داد (۲۶). در مطالعه Falahati و همکاران در سال ۱۳۹۱ فعالیت ضدقارچی عصاره اتانولی موسیر ایرانی بر ضد تمامی گونه‌های کاندیدیایی نسبت به عصاره آبی بیش‌تر بود (۱۱).

Mir-Rashed و همکاران در سال ۲۰۱۰ پژوهشی با عنوان اختلال در دیواره سلولی قارچ توسط عصاره‌های ضدقارچ *Echinacea* انجام دادند. براساس نتایج این گروه، *S. cerevisiae* تحت درمان با *Echinacea* به‌طور قابل توجهی مستعد آسیب دیواره سلول نسبت به سلول‌های غیر تیمار شده است. این مطالعه شواهد قانع‌کننده‌ای را نشان می‌دهد که دیواره سلولی قارچ هدف عصاره گیاهان *Echinacea* است و

بنابراین می‌تواند کاربرد این گیاه پزشکی در درمان میکوز را توضیح دهد (۲۷).

نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج Sharifi-Rad و همکاران (۲۰۱۸)، Bachir و همکاران (۲۰۱۵)، Carolina Chiellini و همکاران (۲۰۱۷)، Bagheri و همکاران (۲۰۱۵)، Mir-Rashed و همکاران (۲۰۱۰) و S. Merali و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که عصاره گیاهی جنس *Echinacea* نسبت به داروی شیمیایی (فلوکونازول) عملکرد ضد قارچی بهتری دارد. هم‌چنین مشخص شد که حساسیت کاندیدا آلبیکنس به عصاره اتانولی *E. angustifolia* نسبت به داروی فلوکونازول بیش‌تر است.

Ankri و Mirelman با بررسی اثر مهاری عصاره‌های گیاهی تازه با استفاده از روش میکرودايلوشن برات بر گونه‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گالبراتا، کاندیدا کروزه‌ای به این نتیجه دست یافتند که روش میکرودايلوشن برات روشی مؤثر و دقیق برای تعیین مهار رشد قارچ‌ها است (۳). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که روش میکرودايلوشن برات نسبت به دیسک دیفیوژن برای محاسبه فعالیت ضدقارچی عصاره گیاهی برحسب غلظت عصاره، کارایی بیش‌تری دارد.

خاصیت ضد میکروبی گیاهان به‌طور عمومی به دلیل وجود ترکیب‌های فنولی، ساپونین، پلی‌ساکاریدها و 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 ضد میکروبی خود را اعمال نماید. تحقیقات فیتوشیمیایی گذشته اثرهای ضد میکروبی عصاره‌های مختلف را روی تعدادی از میکروارگانیسم‌ها بررسی کرده است (۲۸-۳۱). فعالیت ضد میکروبی پلی‌ساکاریدهای گیاه *E. angustifolia* شامل اکیناسئین، اکیناکوزید و آکینولون را می‌توان مشابه با آلیسین موجود در سیر دانست که با حضور بعضی از ترکیب‌های عمده مانند α -پینین همراه با ترکیب‌های دیگر با مقدار کم‌تر مانند لینالول به شکل مشخصی فعالیت ضد میکروبی و باکتریواستاتیک آن تشخیص داده شده است (۳۴-۳۱). از طرفی گزارش شده است که خاصیت ضدقارچی با قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی بیش‌تر از عصاره آبی است (۳۵). با توجه به این‌که عصاره‌هایی با روش-ها و حلال‌های متفاوت از یک گیاه گرفته می‌شود، می‌تواند

در بیماری‌های قارچی کاندیدایی باشد. با این وجود ممکن است انتشار عصاره‌ی آبی در محیط کشت حاوی آگار با مشکل مواجه گردیده و یا در اثر ترکیب با مواد موجود در محیط کشت از اثر ممانعت کنندگی آنها کاسته شده باشد. با توجه به نتایج، عصاره اتانولی گیاه *E. angustifolia* در مقایسه با داروی فلوکونازول برای درمان عفونت‌های قارچی کاندیدایی مناسب می‌باشد. لذا مطالعات بیشتر در خصوص اثرهای ضد قارچی عصاره‌های گیاه *E. angustifolia* توصیه می‌شود.

اثرهای ضدقارچی متفاوتی از خود نشان دهند. عصاره اتانولی تهیه شده در این پژوهش نسبت به عصاره آبی اثر مهاری بیش‌تری را روی کاندیدا *آلبیکنس* نشان داد. پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند که مواد ضد میکروبی موجود در گیاهان توسط حلال‌های آلی بهتر استخراج می‌شوند (۳۶). تصور بر این است که به احتمال آکالوئیدهای موجود در گیاه *E. angustifolia* در تماس با اتانول بهتر استخراج شده و به این ترتیب عصاره اتانولی قدرت بازدارندگی بیش‌تری دارد. از طرفی ممکن است انتشار عصاره آبی در محیط کشت حاوی آگار با مشکل مواجه گردیده و یا در اثر ترکیب با مواد موجود در محیط کشت از اثر ممانعت کنندگی آنها کاسته شده باشد. Li Dahui و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره ریشه *E. angustifolia* و تجزیه و تحلیل ترکیب‌های آن با استفاده از طیف‌سنجی جرمی کروماتوگرافی گازی (GC-MS) نشان دادند که عصاره ریشه *E. angustifolia* دارای فعالیت ضدقارچی قوی علیه *B. cinerea* با مقادیر EC50 و EC90 به ترتیب ۹۴۸ و ۱۸۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر، حداقل غلظت مهاری (MIC) ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۳۷) از طرفی، ایجاد تغییرها در دیواره قارچ و اندامک‌های داخلی در اثر اسانس نیز نشان‌دهنده تأثیر ضد میکروبی این گیاه بوده و وجود ترکیب‌های ضد میکروبی در گیاه را تأیید کرد (۱۲).

Raho G و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی اثرهای مهاری اسانس *E. angustifolia* در رشد پنج ارگانیزم بیماری‌زا: *Saccharomyces*, *Pseudomonas* Spp, *Coliform* Spp و *Zygosaccharomyces Bailii*, *Cerevisiae* و *Lactobacillus Plantarum* چنین گزارش کردند که این گیاه اثر باکتریواستاتیک ضعیفی در برابر برخی از مهم‌ترین علل عفونت ایجاد می‌کند که پتانسیل هیجان‌انگیزی در حرکت به سمت گزینه‌های طبیعی‌تر آنتی‌بیوتیکی برای آینده فراهم می‌کند (۳۲). در این تحقیق همسو با تحقیقات گذشته، ویژگی‌های ضدقارچی گونه گیاهی *E. angustifolia* علیه قارچ کاندیدا *آلبیکنس* بررسی و نتایج نشان‌دهنده تأثیر مناسب عصاره این گیاه بر مهار رشد بود.

نتیجه‌گیری

مطابق با نتایج، به نظر می‌رسد که عصاره اتانولی *E. angustifolia* کاندید مناسبی برای جایگزینی فلوکونازول

1. Ghaddar, Nahed, et al. "Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon." *BMC infectious diseases* 20.1 (2020): 1-9.
2. Rafiq, Naureen B. "Candidiasis." *StatPearls* [Internet] (2020).
3. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* 1999; 1(2):125-9.
4. Badiee, Parisa, and Zahra Hashemizadeh. "Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management." *The Indian journal of medical research* 139.2 (2014): 195.
5. Bidad F, Madani M, Masoumi M. Evaluation of Anticandidal Effects of *Allium saralicum*. *Qom Univ Med Sci J*. 2017; 11 (6) :10-18
6. Quindós, Guillermo, et al. "Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs." *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 24.2 (2019): e172.
7. Bellmann, Romuald, and Piotr Smuszkiwicz. "Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients." *Infection* 45.6 (2017): 737-779.
8. Al-Baqsemi, Zahraa F., Suhail Ahmad, and Ziauddin Khan. "Antifungal drug susceptibility, molecular basis of resistance to echinocandins and molecular epidemiology of fluconazole resistance among clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait." *Scientific reports* 10.1 (2020): 1-10.
9. Berkow, Elizabeth L., and Shawn R. Lockhart. "Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective." *Infection and drug resistance* 10 (2017): 237.
10. Sharafutdinov, Irshad S., et al. "Increasing susceptibility of drug-resistant *Candida albicans* to fluconazole and terbinafine by 2 (5H)-furanone derivative." *Molecules* 25.3 (2020): 642.
11. Falahati Mehraban *, Fateh Ruhollah, Sharifi Nia Somayeh. Anti-candida effects of shallot extracts on the causes of chronic candidiasis. *Razi Medical Sciences (Journal of IranUniversity of Medical Sciences)*. October 2012, Volume 19, Number 100; from page 22 to page 28.
12. Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira G. M, et al. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 985832.
13. Anyanwu, Madubuike Umunna, and Rosemary Chinazam Okoye. "Antimicrobial activity of Nigerian medicinal plants." *Journal of intercultural Ethnopharmacology* 6.2 (2017): 240.
14. American Society of Health–system Pharmacists. *Herbal companion to AHFS DI.*, Bethesda, Maryland, USA, 2001; pp: 31-2.
15. Karsch-Völk, Marlies, et al. "E. angustifolia for preventing and treating the common cold." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2 (2014).
16. De Sousa, Lourimar Viana Nascimento F., et al. "Isolation and identification of *Candida* species in patients with orogastric cancer: susceptibility to antifungal drugs, attributes of virulence in vitro and immune response phenotype." *BMC infectious diseases* 16.1 (2016): 1-12.
17. Tantasuwana, S., P. Chongtrakool, and M. Chayakulkeeree. "Impact of fluconazole disk diffusion susceptibility testing on management of Candidemia." *International Journal of Infectious Diseases* 101 (2020): 386.

18. Garmus, Tábata T., et al. "Ethanollic and hydroalcoholic extracts of Pitanga leaves (*Eugenia uniflora* L.) and their fractionation by supercritical technology." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 36.2 (2019): 1041-1051.
19. Waikhom, Sayanika Devi, et al. "Prevalence of vulvovaginal candidiasis among pregnant women in the Ho municipality, Ghana: species identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolates." *BMC pregnancy and childbirth* 20 (2020): 1-14.
20. Shahrokh, Somayeh, et al. "In vitro antifungal activity of aqueous-ethanolic extract of *Allium jesdianum* against fluconazole-susceptible and-resistant human vaginal *Candida glabrata* isolates." *Journal of Herbmmed Pharmacology* 6.4 (2017): 165-170.
21. Barani Karbasaki, Farzaneh, et al. "Evaluation of Antimicrobial effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron on Oral Pathogenic Microbes (*Streptococcus Mutans*, *Lactobacillus*, *Candida Albicans*)." *Journal of Mashhad Dental School* 40.3 (2016): 203-212.
22. Sharifi-Rad, Mehdi, et al. "Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications." *Phytotherapy Research* 32.9 (2018): 1653-1663.
23. Bachir Raho, G., et al. "Inhibitory effects of *Echinacea angustifolia* essential oils on the growth of five pathogenic organisms: coliform spp, *pseudomonas* spp, *saccharomyces cerevisiae*, *zygosaccharomyces bailii* and *lactobacillus plantarum*." *International Journal of Advanced Research in Botany (IJARB)* 1.10 (2015).
24. Chiellini, Carolina, et al. "Preliminary data on antibacterial activity of *Echinacea purpurea*-associated bacterial communities against *Burkholderia cepacia* complex strains, opportunistic pathogens of Cystic Fibrosis patients." *Microbiological research* 196 (2017): 34-43.
25. Bagheri, Majid, et al. "A comparison between antifungal effect of *Fumaria officinalis*, *Echinacea angustifolia*, vinegar, and fluconazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolated from vagina candidiasis." *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* 17.136 (2015): 1-9.
26. Merali, S., et al. "Antifungal and anti-inflammatory activity of the genus *Echinacea*." *Pharmaceutical Biology* 41.6 (2003): 412-420.
27. Mir-Rashed, Nadereh, et al. "Disruption of fungal cell wall by antifungal *Echinacea* extracts." *Medical mycology* 48.7 (2010): 949-958.
28. Parham, Shokoh, et al. "Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials." *Antioxidants* 9.12 (2020): 1309.
29. Madani M, Khosravi AR, Shirani M. Comparisono f the In vitro effect of different *Allium jesdianum* extracts on candida spp. *J Biology Sci* 2010; 3(1):63-71. [Full Text in Persian]
30. Shirani M, Madani M, Khosravi AR, Hoseindoust SR. Evaluation of Antifungal activity of essential oil of *Allium jesdianum* on *Malassezia furfur* and candida *Krusei*. *Jundishapour J Microbiol* 2013; Special Edition.
31. Hemeg, Hassan A., et al. "Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population." *Saudi Journal of Biological Sciences* 27.12 (2020): 3221-3227.
32. Bachir Raho, G., et al. "Inhibitory effects of *Echinacea angustifolia* essential oils on the growth of five pathogenic organisms: coliform spp, *pseudomonas* spp, *saccharomyces cerevisiae*, *zygosaccharomyces bailii* and *lactobacillus plantarum*." *International Journal of Advanced Research in Botany (IJARB)* 1.10 (2015).



33. Zorig, Anuu, et al. "Echinacea purpurea water extracts suppress the release of chemical mediators from mast cells." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2021).
34. Teymourizadeh Zarir, et al. "Comparison of the effects of thyme extracts, turmeric, garlic and virginiamycin antibiotic on serum lipids, hematocrit percentage and hemoglobin level of broilers."(2020) 37-45.
35. 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
36. Chalebian Firoozeh, Sharifnia Fariba, and Katozian Fatemeh. "Study of antimicrobial effects of methanolic, ethanolic and aqueous extracts of six species of Iranian *Papaver* on some pathogenic bacteria."(2019) 41-60.
37. Dahui, Li, Wang Zaigui, and Zhang Yunhua. "Antifungal activity of extracts by supercritical carbon dioxide extraction from roots of *Echinacea angustifolia* and analysis of their constituents using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)." *Journal of Medicinal Plants Research* 5.23 (2011): 5605-5610.