مطالعه ترکیبات شیمیایی، خواص ضدقارچی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی اسانس گیاه دارویی (*Thymus daenensis* Celak.)

عبدالناصر محمدی[1*]، سیما شیراوند[2]، کاترین ابراهیمی[3]

[1و2]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

[3]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۰۶

چکیده

آویشن دنایی با نام علمی، *Thymus daenensis* Celak متعلق به تیره نعناعیان است. اسانس گیاه دارای متابولیت‌های ثانوی با ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی قوی برخوردار است. در این تحقیق به‌منظور بررسی فیتوشیمیایی اسانس، فعالیت ضد قارچی، خواص آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی، سر شاخه‌های گلدار گیاه در خردادماه سال ۱۳۹۶ از منطقه زاغه استان لرستان برداشت گردید. ترکیبات شیمیایی اسانس به روش تقطیر با آب استخراج و توسط دستگاه کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) آنالیز شد. خواص ضد قارچی، فعالیت آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی به‌ترتیب با استفاده از روش‌های میکرودایلوشن براث، DPPH وMTT انجام شد. عمده‌ترین ترکیبات اسانس گیاه شامل تیمول (۲۴/۷ درصد) و کارواکرول (۳۸/۰۵ درصد) بوده و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس علیه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس نایجر* به‌ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست امد. اثر مهار کنندگی رادیکالی با افزایش غلظت اسانس، افزایش یافته و IC50=63/23 میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید. روش رنگ‌سنجی MTT نشان داد که سمیت اسانس بر روی سلول‌های لنفوسیت انسانی ناچیز می‌باشد. با توجه به نتایج مطالعه انجام شده، اسانس آویشن دنایی دارای اثرات قابل توجه ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی بوده، بنابراین می‌تواند به‌عنوان یکی از گیاهان بومی کشور پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را داشته باشد و به عنوان یک کاندیدای خوب در درمان بیماری‌های قارچ‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی، آنتی اکسیدان، اسانس، سمیت سلولی، فعالیت ضدقارچی

*نویسنده مسئول: mohammadi.ab@lu.ac.ir

مقدمه

آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) گیاهی است متعلق به تیره نعناعیان و دارای دو زیر گونه *T. daenensis* subsp. *daenensis* و subsp. *T. daenensis Lancifolius* می‌باشد. زیرگونه *T. daenensis* subsp. *Daenensis* بومی‌زاد (اندمیک) ایران بوده، در مناطق گسترده‌ایی از ایران به‌ویژه در مناطق غربی و مرکزی و در ارتفاعات کوه‌های زاگرس رویش دارد (Khoshsokhan et al., 2015; Rustaiee et al., 2011; Rahimmalek et al., 2009b). این گیاه ساقه کوتاه دارد که در پایین کاملاً چوبی است و ارتفاع ساقه گل دهنده آن حداکثر ۳۰ سانتی‌متر است. برگ‌ها ممکن است به‌صورت همپوش یا کوتاهتر از میانگره‌ها باشند (Safaei et al., 2017). قسمت دارویی، مورد استفاده در این گیاه سرشاخه‌های گلدار آن بوده و مواد مؤثره تشکیل دهنده آن از سرشاخه‌های گل دار و برگ‌های خشک شده گیاه به دست می‌آید (Amin et al., 2002). جنس آویشن در مناطق وسیعی از جهان به‌عنوان نوشیدنی، طعم دهنده غذا و داروی گیاهی استفاده می‌شود (Nikavar et al., 2004).

گونه‌های آویشن از گیاهان دارویی بسیار مهمی بوده که به طور فراوان مورد استفاده قرار می‌گیرند. کارواکرول و تیمول از ترکیات عمده انواع آویشن بوده و منشا خواص آن به شمار می‌روند. ترکیب اصلی و عمده آویشن دنایی تیمول و کارواکرول می‌باشد که مقدار تیمول آن بیش از ۷۰ درصد گزارش شده است (Nikavar et al., 2004). تحقیقات نشان می‌دهد که مواد تشکیل‌دهنده اسانس تحت تاثیر ژنوتیپ مرحله تکوینی، تکاملی و همچنین شرایط محیط و رشد و نمو گیاه قرار می‌گیرد. دم کرده و جوشانده اسانس گل و برگ آویشن دنایی به‌عنوان مطبوع کننده، طعم دهنده، ضد سرفه، ضداسپاسم، خلط‌آور، ضدنفخ استفاده می‌شود و خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی قوی دارد (Karimi et al., 2010; Nikavar et al., 2004). علاوه بر این اسانس گونه‌های آویشن از جمله آویشن دنایی به خاطر ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خود قوی بروز می‌دهند. پلی فنول‌ها انواعی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که در پیشگری بیماری‌ها از جمله سرطان نقش دارند، این ترکیبات تنوع بالایی داشته و اثرات متفاوتی دارند. ترکیبات فنولی شامل ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و فلاونوئیدها، ویژگی‌های ضد جهشی داشته و می‌توانند فعالیت ضدسرطانی و همچنین کاهش قند خون را از خود بروز دهند (Haghiroalsadat et al., 2011 ; Ajith and Janardhanan, 2007).

جنس آسپرژیلوس با بیش ۱۸۵ گونه، قارچ‌هایی هستند که در همه جا بخصوص در خاک و سبزیجات در حال فساد حضور دارند. حدود ۲۰ گونه از آنها در انسان بیماری ایجاد می‌کند که شایع‌ترین آنها گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس و به دنبال آن آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر می‌باشد (Khan and Ahmad, 2011; Chakraborty et al., 2006; Dubey et al., 2006). آسپرژیلوزیس یک عفونت فرصت طلب بوده که قارچ‌های عامل آن می‌توانند به اندام‌های داخلی مانند ریه، گوش، چشم، دستگاه گوارش، کلیه و مغز حمله کرده و در این ارگان‌ها آسیب ایجاد نمایند (Khan and Ahmad, 2011; Chakraborty et al., 2006; Dubey et al., 2006). در مطالعات متعددی که در گذشته انجام شده، خاصیت ضدمیکروبی آویشن دنایی بر علیه کاندیداآلبیکنس، لیستریامونوسایتوژنز، کمپلیوباکتر، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، پسودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه وساپرولگنیا پاراسیتیکا به اثبات رسیده است (Karimi et al., 2010; Ghasemi Pirbalouti et al., 2009a; Ghasemi Pirbalouti et al., 2009c).

امروزه تعداد زیادی از داروهای ضدقارچی و ضدباکتریایی موثر برای درمان این عوامل عفونی به کارگرفته می‌شوند، اما با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماریزای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف این داروها، جایگزین کردن آنها توسط داروهای ضدمیکروبی با منشاء گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و سبب تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی شده است. بنابراین با توجه به تنوع آب و هوایی و تنوع فلور گیاهی در ایران، شناسایی مواد موثر گیاهان بومی کشور و استخراج آنها به‌منظور تولید انبوه و در سطح صنعتی آنها اهمیت زیادی پیدا کرده است. بنابراین هدف این مطالعه شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن دنایی و هم‌چنین بررسی خواص ضد آسپرژیلوسی (قارچی) و خواص آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد. از طرفی به منظور دستیابی و تکامل داروهای ضدسرطان از منابع طبیعی سمیت سلولی اسانس آویشن دنایی علیه گلبول‌های سفید انسانی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه: گل و برگ آویشن دنایی در اوایل خرداد ماه سال ۱۳۹۶ از منطقه زاغه لرستان جمع‌آوری شد و پس از شناسایی نمونه‌های جمع‌آوری شده در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک و سپس به کمک آسیاب پودر و برای استفاده‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

اسانس‌گیری: اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر صورت گرفت. به این منظور ۵۰ گرم از نمونه خشک و پودر شده آویشن دنایی به بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل و مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر آب تقطیر شده به آن افزوده شد. اسانس‌گیری تا ۳ ساعت بعد از زمان به جوش آمدن آب ادامه یافت و در پایان به اسانس‌های به دست آمده مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از n- هگزان نرمال جهت جداکردن فاز آلی از آبی اضافه گردید. اسانس را در ظرف‌های شیشه‌ای درب‌دار تا زمان آنالیز دستگاهی و انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

آنالیز اسانس: آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) ساخت شرکت Shimatzu ژاپن، در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه لرستان انجام شد. پس از تزریق اسانس، شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان بازداری ترکیب‌ها (RT)، اندیس بازداری (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه آنها با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی در کروماتوگرام GC با نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Zarin Abaadi et al., 2017).

بررسی خواص ضد قارچی

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[1] MIC و حداقل غلظت کشندگی[2] MFC: تعیین MIC در میکروپلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکرودایلوشن براث انجام شد (CLSI document M38-A2., 2008). ابتدا سریال دایلوشن‌هایی (با حجم ٦٤ میکرولیتر) از اسانس (با رقت‌های ٦٤ اسانس+ ۹۳٦ میکرولیتر DMS) در

1. Minimum Inhibition Concentration
2. Minimum Fungicidal Concentration

پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهکی با استفاده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI 1640 تهیه گردید. بعد از کشت عوامل قارچی مورد آزمایش در محیط SDA (سابورو دکستروز آگار) و ایجاد کلنی‌های تازه و خالص اسپور قارچ‌های رشته‌ای و سوسپانسیون سلولی با تعداد سلول‌های قارچی 3×10^4 Cell/mL تهیه شد. ۱۰۰µl از محلول تلقیحی کاری سوسپانسیون سلول قارچی به چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر (حاوی رقت‌های اسانس و محیط کشت RPMI 1640 اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت انکوبه شد. از کنترل استریل (چاهک حاوی محیط RPMI 1640 بدون سوسپانسیون قارچی) و کنترل رشد (چاهک حاوی محیط RPMI 1640 و سوسپانسیون سلول قارچی بدون عوامل ضدقارچی یا اسانس) نیز استفاده گردید. رشد در هر چاهک، با چاهک کنترل رشد مقایسه و هر آزمایش به شکل ۳ گانه انجام شد. برای تعیین حداقل غلظت کشنده‌ی قارچی اسانس‌ها، ۱۰µL از محیط‌های کشت مایع موجود در چاهک‌هایی که عدم رشد چشمی عوامل قارچی رشته‌ای را نشان دادند، بر روی محیط جامد SDA پاساژ داده و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کمترین غلظتی که مانع تشکیل بیش از ٤ کلنی شود، به‌عنوان MFC تعیین شد. تمامی مراحل فوق با داروی استاندارد آمفوتریسین B جهت مقایسه با اثر اسانس انجام شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در این روش از DPPH، ترکیب پایدار چربی دوست با جذب بیشینه ۵۱۸ نانومتر استفاده شد (Ayoghi et al., 2009). غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم از اسانس *آویشن دنایی* با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر تهیه و در لوله‌های جداگانه ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۰۰۰٦ گرم در ۲۵ میلی‌لیتر متانول) که به‌عنوان منبع تولید رادیکال آزاد می‌باشد و ٤٥٠ میکرولیتر متانول اضافه و توسط شیکر مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و جذب آن توسط دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت و در نهایت با استفاده از فرمول زیر، به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH اندازه‌گیری شد. $RSC\%= [(A_0-A_1)/A_0]\times100$ در این فرمول A_0 و A_1 به‌ترتیب میزان جذب نوری کنترل منفی (فاقد اسانس) و اسانس (نمونه) را بیان می‌کند. RSC% درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان می‌دهد.

سمیت سلولی: به‌منظور بررسی اثر اسانس گیاه آویشن بر رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد (Chang et al., 2007; Kim et al., 2003). این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است. ۳ میلی‌لیتر خون از یک فرد دهنده سالم در یک لوله آزمایش حاوی (سیترات سدیم ٤٪) ریخته و با ۵ میلی‌لیتر از نمک بافر فسفات (PBS) مخلوط گردید. سپس با دقت ۳ میلی‌لیتر فایکول اضافه، به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور و دمای اتاق سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ سه لایه شامل پلاسما، گلبول سفید، گلبول قرمز تشکیل شد، لایه سفید (کدر) متشکل از گلبول‌های سفید (سلول‌های تک هسته‌ای) با سمپلر جمع‌آوری شده با ۵ میلی‌لیتر PBS مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. این عمل برای شست و شوی لنفوسیت‌ها سه بار تکرار شد. سپس به پلیت حاوی سلول، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال بود اضافه گردید (سرم جنین گاو در ٥٦ درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت در بن ماری غیر فعال می‌شود) و سپس با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش سلولی انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از

سوسپانسیون حاوی (1×10^5cell/ml) به چهار ردیف چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه با کف مسطح کشت و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵ درصد CO_2 قرار داده شد .پس از ۲٤ ساعت انکوبه شدن غلظتک‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکرو لیتر از اسانس به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از ۲٤ ساعت انکوبه شدن به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر MTT (با غلظت ۵mg/ml) اضافه و به آرامی مخلوط، به مدت ٤ ساعت دیگر انکوبه شد. پس از طی زمان لازم مقداری از محلول رویی هر چاهک به آرامی خارج و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO جهت حل کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه گردید. پس از ۲ ساعت انکوبه شدن جذب نوری با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر Biotek در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. در صد مهار رشد سلول‌های در معرض محلول نانوذرات مس با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد مهار رشد =

$$100 - \left(\frac{\text{میانگین جذب سلول‌های در معرض نمونه قرار گرفته}}{\text{میانگین جذب سلول‌های کنترل}}\right) \times 100$$

غلظتی از نمونه که رشد سلول‌ها را به میزان ۵۰ درصد مهار می‌کند به عنوان یک پارامتر برای سمیت سلولی استفاده می شود.

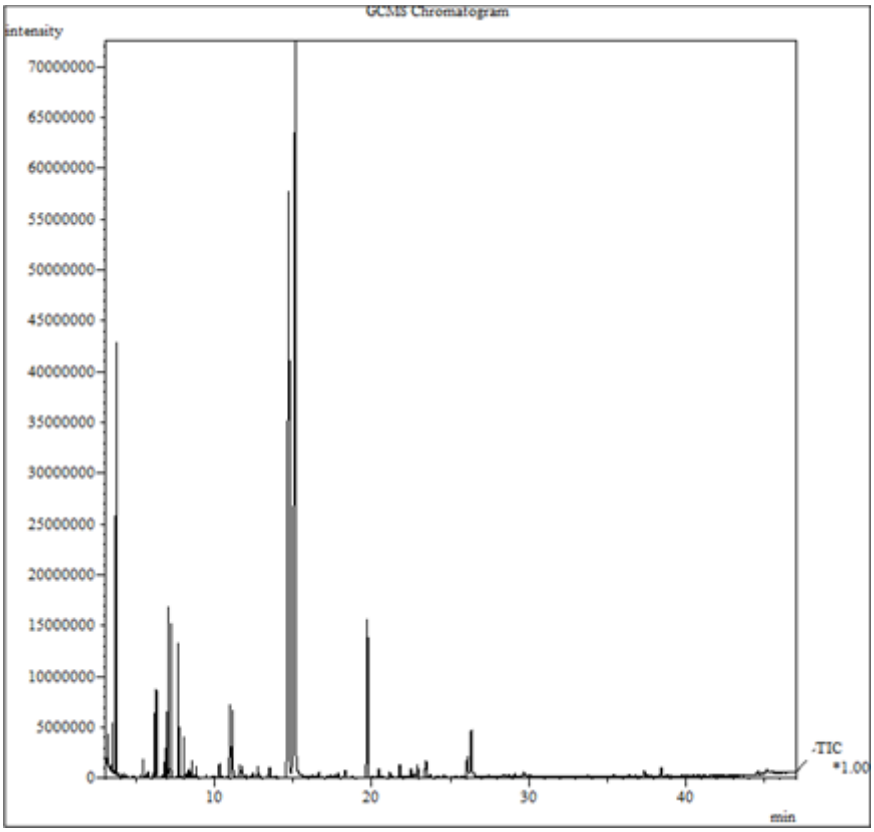
نتایج

ترکیبات اسانس: عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس تیمول متیل اتر (۲٤/۷ درصد)، کارواکرول (۳۸/۰۵ درصد)، ترانس– آلفا–برگاموتن (۵/۰٤ درصد) و ان اکتان (۷/٤٦ درصد) بودند. حدود ٤ درصد ترکیبات اسانس گیاه شناسایی نگردید (جدول ۱ و شکل ۱).

جدول ۱: معرفی ترکیبات اسانس گیاه *Th. daenensis* جمع‌آوری شده از منطقه زاغه استان لرستان در مرحله گلدهی

ردیف	نام ترکیب	درصد	KI
1	n- Octane	4.67	800
2	alpha-Pinenen	0.27	939
3	Camphen	0.1	953
4	3-Octanone	1.3	986
5	n-Decane	1.36	999
6	alpha-Terpinene	0.5	1018
7	para-Cymene	3.07	1026
8	Limonene	0.11	1031
9	1,8-Cineol	2.78	1033
10	gamma- Terpinene	2.49	1062
11	Linalool	0.8	1095
12	Terpinolene	0.23	1088
13	Camphor	0.46	1143
14	Borneol	1.92	1165
15	Dihydrocarvone	0.37	1200
16	Thymoquinone	0.35	1294
17	Thymol Methyl ether	24.74	1290
18	Carvacrol	38.05	1298
19	Thymol acetate	0.14	1355
20	Copaen	0.15	1376
21	Tetradecane	0.25	1399
22	trans-alpha-Bergamoten	5.08	1436
23	Aromadendren	0.27	1439
24	alpha-Humulene	0.15	1454
25	Germacren D	0.39	1480

26	Viridiflorene	0.33	1495
27	alpha-Murolene	0.16	1499
28	beta-Bisabolene	0.38	1509
29	gamma- Cadinene	0.28	1513
30	delta- Cadinene	0.52	1524
31	Calamenene	0.14	1528
32	Caryophyllene oxide	1.9	1581
33	Carotol	0.72	1596



شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC/MS مربوط به اسانس *Th. Daenensis*

نتایج حاصل از اثرات ضد قارچی اسانس *Th. daenensis* برروی گونه‌های آسپرژیلوس: بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ٦٤ تا ۰/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از روش میکرودایلوشن براث بررشد دو گونه آسپرژیلوس نشان داد که اسانس این گیاه قادر به مهار رشد تا غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین MIC اسانس این گیاه به‌ترتیب برای گونه‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *نایجر* ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و MFC ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۳ نشان می‌دهد که بین میانگین MIC و MFC اسانس *Th. Daenensis* در غلظت‌های مختلف برروی گونه‌های آسپرژیلوس در مقایسه با شاهد آمفوتریسین B (شاهد) در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دنت استفاده شد (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

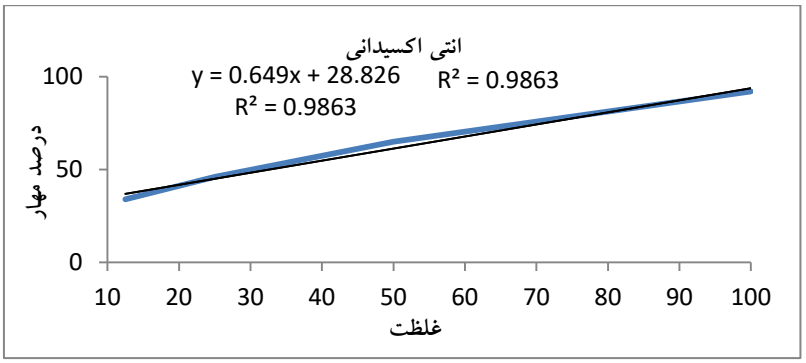
جدول ۲: نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثرات ضدقارچی اسانس *Th. Daenensis* بر روی گونه‌های آسپرژیلوس

گونه قارچی	اسانس	محدوده غلظت (میکروگرم/ میلی لیتر)	میانگین MIC	میانگین MFC
آسپرژیلوس فومیگاتوس	زمان گلدهی	۱۲۸ –۰/۰۳	۰/۵ ±۰/۰۵^{B}	۱ ±۰/۱
	آمفوتریسین (شاهد)B	۱۲۸ –۰/۰۳	۱ ±۰/۱^{A}	۲ ±۰/۱
آسپرژیلوس نایجر	زمان گلدهی	۱۲۸ –۰/۰۳	۱ ±۰/۱^{A}	۲ ±۰/۱
	آمفوتریسین (شاهد)B	۱۲۸ –۰/۰۳	۱ ±۰/۱^{A}	۲ ±۰/۱

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس: بررسی فعالیت بـه دام اندازی رادیکال‌هـای آزاد DPPH یکـی از روش‌هـای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی مـی‌باشـد. در ایـن روش رنگ ارغوانی رادیکال آزاد DPPH در طول موج ۵۱۸ نانومتر توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان کاهش یافته و بـه رنگ زرد تبدیل می‌شود. قدرت اسانس آویشن دنـایی در مهار رادیکال‌هـای آزاد DPPH در جـدول ۲ نشـان داده شده است. همان‌طوری که مشـخص اسـت رابطـه مسـتقیمی بـین غلظـت اسـانس و اثـرم هـار کننـدگی رادیکالی آن برقرار می‌باشد و با افزایش میزان غلظـت اسانس، اثر مهار کنندگی رادیکالی آن افزایش مـی‌یابـد بالاترین درصد تخریب رادیکال‌های آزاد، برای غلظت ۱۰۰ میکرولیتـر و پـایین تـرین درصـد بـرای ۱۲/۵ میکرولیتر می‌باشد. در این تحقیق میزان IC50 آویشـن دنایی ۳۲/۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر تشخیص داده شد (نمـودار ۲). IC50 بـه‌طـور معکـوس بـا فعالیـت آنتی‌رادیکالی ترکیب‌هـا در ارتبـاط مـی‌باشـد. هرچـه IC50 کمتر باشد فعالیت آنتی اکسیدانی بیشـتر اسـت. نتایج بدست آمده با اسید آسکوربیک بـه‌عنـوان کنتـرل مثبت (استاندارد) مقایسه گردید (جـدول ۳، شـکل۲).

جدول ۳: توانایی مهار کنندگی رادیکالهای آزاد اسانس *Th. daenensis*

غلظت (μg/ml)	مهار رادیکال آزاد (٪)	
	اسانس	آسکوربیک اسید
۱۰۰	۹۲	۹۳
۵۰	٦٥	۸۳
۲۵	٤٦	۷۸
۱۲/۵	۳٤	۷۷



شکل۲: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دنایی در آزمایش تخریب رادیکال‌های DPPH

سمیت سلولی: سمیت سلولی اسانس در غلظت ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم بعد از ۲٤ ساعت بر روی لنفوسیت‌های سالم انسان به روش MTT تخمین زده شد. همچنان که در جدول ٤ نشان داده شده، اسانس در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر موجب اندکی لیز سلولی گردید، هرچه غلظت اسانس کمتر باشد لیز سلولی آن کم خواهد بود بطوریکه با افزایش غلظت لیز سلولی افزایش می‌یابد (جدول ٤).

جدول٤: نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک اسانس *Th. Daenensis*

غلظت اسانس (μl)	مهار رادیکال آزاد (٪)	
	سمیت سلولی(٪)	IC50
۱۰۰	۲۱	۲۳۱ µl
۵۰	۷	
۲۵	۴	
۱۲/۵	۱	

آنالیز آماری: پس از گردآوری اطلاعات بر پایه اصول آماری، جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس بر روی گونه‌های آسپرژیلوس از تکنیکهای آماری شامل آزمون آنالیز واریانس ANOVA (با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16) و تست دنت (Dunnett) استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی اختلاف میانگین اسانس‌ها محاسبه گردید.

بحث

در مطالعه حاضر ترکیبات شیمیایی، خواص ضدقارچی، قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و سمیت سلولی آویشن دنایی ارزیابی گردید. در این بژوهش عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس تیمول متیل اتر (۲٤/۷ درصد) وکارواکرول (۳۸/۰۵ درصد) بودند که با مطلعات انجام شده توسط دیگر محققین مطابقت دارد (Talebi et al., 2017; Mehran et al., 2015; Saidi, 2014). مقایسه ترکیب‌های اصلی اسانس مورد آزمایش این مطالعه با مطالعات قبلی نشان می‌دهد مقدار آنها در نمونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. این تفاوت می‌تواند ناشی از تاثیرعملکرد عوامل بیرونی و درونی مانند تنوع ژنتیکی، وضعیت کشت، روش‌های استخراج و نحوه خشک شدن نمونه‌ها در دمای مناسب باشد (Rahimmalek and Goli, 2013). ترکیبات فنل و فلاونوئیدی دارای خواص بیولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی اکسیدانی به دام انداختن رادیکالهای آزاد و خاصیت ضد التهاب هستند. این ترکیبات همچنین با به تاخیر انداختن آسیب‌های اکسیداتیو در چربی‌ها و دیگر مولکول‌های مهم مانع بوجود آمدن سرطان و بیماریهای کرونر قلب می‌شوند (Kris- Etherton et al., 2002). تیمول یک ضدعفونی کننده موضعی بوده از آن در ساخت کرم‌ها، لوسیون‌ها، پمادها استفاده می‌شود و دردرمان بیماری‌های پوستی بخصوص زونا موثر می‌باشد. این ترکیب خاصیت قارچ کشی و کرم کشی دارد (Ahmad et al., 2010).

تیمول از ادامه حیات و تشکیل هیف‌های قارچ‌ها تداخل ایجاد کرده و در غشاء سلول کاندیدا آلبیکنس و متابولیسم آن اثر گذاشته و احتمالا بر دیواره سلول قارچی نیز موثر است (Braga et al., 2007). کارواکرول و تیمول دارای طیف وسیعی از اثرات ضدمیکروبی و ضد قارچی بوده، این مواد فعالیت ATPaseرا مهارکرده و نفوذپذیری غیراختصاصی غشای سلول قارچی را افزایش می‌دهند علاوه براین

کارواکرول با افزایش نفوذپذیری غشاء، قارچ‌ها را نسبت به سایر مواد ضدقارچی حساس و آسیب پذیر می‌سازد (Mohammadi et al., 2015). اثر قارچ کشی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه مربوط به محتوای تیمول آن است که در مطالعه ما و دیگر محقیقن اثر خود را نشان داده است (Zamboneli et al., 2004). تیمول و کارواکرول از نظر شیمیایی ایزومرهم هستند کارواکرول از رشد برخی باکتری‌ها از جمله اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس جلوگیری می‌کند (Mehran et al., 2015).

در مطالعه تیموری اسانس آویشن دنایی فعالیت ضد قارچی قابل توجهی بر علیه آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس و ساکارومیسس سرویسیه از خود نشان داده است (Teimouri et al., 2012). در مطالعه دیگری که توسط داداش پور و همکاران (Dadashpour et al., 2011) انجام شد، فعالیت ضد باکتریایی اسانس آویشن دنایی بر علیه کاندیدا آلبیکنس، اشریشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس بررسی شد و MIC آنها به‌ترتیب ٤٠، ٨٠ و ١٦٠ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. محمدی و همکاران فعالیت اسانس *Thymus eriocaly* علیه آسپرژیلوس نایجر را مورد مطالعه قرار دادند نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس این گونه گیاهی در غلظت ١٢٥PPM مانع رشد آسپرژیلوس نایجر گردید (Mohammadi et al., 2015). در مطالعه حاضر مقایسه میانگین اسانس آویشن دنایی با داروی ضدقارچی آمفوتریسین B نشان‌دهنده اثرات ضدآسپرژیلوسی گونه مورد مطالعه بوده که در مقایسه با مطالعات گذشته اثرات ضد قارچی قوی تری را از خود نشان داده است (جدول ٣). مضفری و همکاران (Moshafi, 2007) اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره آویشن دنایی را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که اسانس و عصاره متانولی این گیاه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتری بوده و می‌تواند به‌عنوان محافظ در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد

در مقاله مروری زرشناس وکرینن (Zarshenas and Krenn, 2015). IC50 (غلظتی از اسانس که ٥٠ درصد رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند) اسانس گونه‌های مختلف آویشن با هم مقایسه شد که برای آویشن دنایی ٩٩/٦ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید در مطالعه نیک‌آورواثباتی (Nickavar and Esbati, 2012) C50 عصاره‌های هیدروالکلیک آویشن دنایی با روش‌های DPPH، ABTS و بتا کاروتن به‌ترتیب ٤٨/٦٨، ٢١٠/٩٠ و ٢٣/٦٨ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. در مطالعه حاضر میزان IC50 اسانس آویشن دنایی ٣٢/٦٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر تشخیص داده شد. از آنجائی که IC50 رابطه معکوسی با فعالیت ضدرادیکالی ترکیب‌ها دارد، لذا هرچه IC50 کمتر باشد، فعالیت ضد رادیکالی آن بیشتر خواهد بود، که مطالعه حاضر خواص آنتی‌اکسیدانی بهتری در مقایسه مطالعات انجام سایر محققین دارد (Borra et al., 2013). از طرفی هرچه میزان تیمول و کارواکرول ترکیبی بیشتر باشد، آن ترکیب درصد بیشتری از رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود بروز می‌دهد که در مطالعه حاضر نیز بیشترین میزان ترکیبات تشکیل دهنده این گیاه تیمول و کارواکرول می‌باشد به همین خاطر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار بود (Zarin Abaadi et al., 2017).

در بررسی سمیت سلولی آویشن دنایی و آویشن شیرازی بر ناپلئوس توسط مشجور و همکاران (Mashjur et al., 2016)، این دوگونه فاقد سمیت سلولی بر روی ناپلئوس بود. نتایج تحقیقات صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016)، نشان داد که عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی با اثر ضدسرطانی

وابسته به دوز و زمان، روی سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود، به‌طوری‌که به‌تدریج و با افزایش زمان و در دوزهای بالاتر رشد سلول‌های سرطانی بیشتر مهار می‌شود و این عصاره سمیت قابل توجهی را روی سلول‌های فیبروبلاست طبیعی از خود نشان نداد. داداش‌پور و همکاران (Dadashpouret al., 2011). سمیت سلولی اسانس آویشن دنایی را بر روی لنفوسیت‌های طبیعی انسان و سلول‌های سرطانی Hela مورد بررسی قرار دادند. اسانس آویشن دنایی فعالیت سیتوتوکسیک بسیار خوبی روی رده سلول‌های سرطانی هلا IC50 (٤/٩٥ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با سلول‌های طبیعی انسان (١٤٤٥میکروگرم در میلی‌لیتر) از خود نشان داد در مطالعه حاضر سمیت سلولی لنفوسیت‌های انسانی جزنی بوده و IC50 آن ۲۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد (جدول٤).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس آویشن دنایی (*Th. daenensis*) دارای پتانسیل بالایی از فعالیت‌های ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و اثرات سمیت سلولی بر روی سلول‌های انسانی و سرطانی می‌باشد. این پتانسیل ناشی از ترکیبات مانند تیمول و کارواکرول بوده که از خاصیت ضد میکروبی و ضدقارچی خوبی برخوردار می‌باشند. کارواکرول و تیمول ترکیبات اصلی اسانس آویشن‌دنایی (*Th. daenensis*) بوده که با افزایش نفوذپذیری غشاء قارچ‌ها، آنها را نسبت به مواد ضد قارچی حساس و آسیب‌پذیر می‌نماید. از طرفی توانایی مهار کنندگی رادیکالهای آزاد و اثرات سیتوکسیک اسانس این گیاه وابسته به دوز می‌باشد. اسانس این گیاه می‌تواند رشد سلول‌های لنفوسیت انسانی را مهار کند.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان از اسانس این گیاه و فرآورده‌های آن برای درمان برخی از عفونت‌های قارچی و سرطانی استفاده نمود که این مسئله نیاز به تحقیقات گسترده‌تراسانس *آویشن دنایی* بر روی نمونه‌های حیوانات آزمایشگاهی دارد. با توجه به محدودیت‌های روز افزون استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروبی نظیر عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی، نیاز به جایگزینی این مواد با مواد طبیعی از جمله اسانس‌های این گیاهان دارد و می‌تواند در کنترل بیماریها ی سرطانی و میکروبی مفید باشد. از طرفی با توجه به نتایج خواص آنتی اکسیدانی، می‌توان با جایگزین کردن اسانس آن به جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در مواد غذایی خطرات ناشی از مصرف این غذاها را نیز کاهش داد.

References

1.Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L.A. and Manzoor, N. 2010. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. Fitoterapia, 81: 1157-62.

2.Ajith, T.A. and Janardhanan, K.K. 2007. Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. Journal Clin. Biochem. Nutr., 40(3): 157-62.

3.Amin, Gh.R. 2002. The most common traditional medicinal plants of Iran. Tehran: Tehran University of Medical Sciences and Health Services.

4.Ayoghi, F., Bazgarfaravi., M, Sahari, M.A. and Naghdibody, H.A. 2009. Antioxidant activity of essential oil *Anethum graveolens* in soybean oil and its comparison with chemical antioxidants. Iranian Journal of Medicinal Plants, 2(30): 71-83.

5.Borra, S.K., Gurumurthy, P., Mahendra, J., Jayamathi, K.M., Cherian, C.N. and Chand, R. 2013. Antioxidant and free radical scavenging activity of curcumin

determined by using different in vitro and ex vivo models. Journal of Medicinal Plants Research, 7(36): 2680-2690.

6.Braga, P.C., Alfieri, M., Culici, M. and Dal Sasso, M. 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. Mycoses, 50(6): 502-506.

7.Chakraborty, A., Marak, R.S.K., Sing, S., Gupta, S.O., Hurst, S.F. and Padhye, A.A. 2006. Brain abscess due to *Aspergillus nidulans*. Journal of Medical Mycology, 16: 100-104.

8.Chang, K.H., Park, J.S., Choi, J.H., Kim, C.J. and Paik, H.D. 2007. Cytotoxic effects of partially purified substances from Bacillus polyfermenticus SCD supernatant toward a varity of tumor cell lines. Food Sci. Biotechnol, 16:163-6.

9.CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2 .Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

10.Dadashpour, M., Rasooli, I., Sefidkon, F., Taghizadeh, M. and Darvish Alipour Astaneh, S. 2011. Comparison of Ferrous Ion Chelating, Free Radical Scavenging and Anti Tyrosinase Properties of *Thymus daenensis* Essential Oil with Commercial Thyme Oil and Thymol. Journal of Zanjan University of Medical Sciences, 19(77): 41-52.

11.Dadashpour, M., Rasooli, I., Sorouri, Z.R., Sefidkon, F., Taghizadeh, M. and Darvish, S.A.A. 2011. Antimicrobial, nitric oxide radical scavenging and cytotoxic properties of *Thymus daenensis* essential oil. Modarres Journal Medical. Sciences, 14(1): 37-47.

12.Dubey, A., Patwardhan, R.V., Sampth, S., Santoshi, V., Kolluri, S. and Nanda, A. 2006. Intracranial fungal granuloma: analysis of 40 patients and review of the literature.*Surgical Neurology*, 63: 254-260.

13.Ghasemi Pirbalouti, A., Bahmani, M. and Avijgan, M. 2009a. Anti-*candida* activity of Iranian medicinal plants. Electric Journal Biotechnologhy, 5: 85-88.

14.Ghasemi Pirbalouti, A., Taheri, M., Raisee, M., Bahrami, H.R. and Abdizadeh, R. 2009c. *In vitro* antifungal activity of plant extracts on *Saprolegnia parasitica* from cutaneous lesion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Journal Food Agric Environ, 7: 94-96.

15.Haghiroalsadat, F., Vahidi, A., Sabor, M.H. Azimzadeh, M., Kalantar, S.M. and Faldini, M.S. 2011. *Bunium persicum*(Green Caraway) native of Yazd province: chemical assessment and Evaluation of its antioxidant effects. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences,19(4): 472-481.

16.Karimi, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Yousefi, M. and Golparvar, A.R. 2010. Evaluation of ecotype and chemotype diversity of *Thymus daenensis* Celak. on Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs), 1(3): 1-10.

17.Khan, M.S.A. and Ahmad, I. 2011. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. Applied microbiology and biotechnology, 90(3): 1083-1094.

18.Khoshsokhan, F., Babalar, M., Pourmeidani, A. and Fatahi, M. 2015. antioxidant activity, total phenolics and oil content of some *Thymus kotschyanus* and thymus daenensis populations. Plant Production Technology, 15(1): 153-162.

19.Kim, J., Woo, H.J., Kim, Y.S., Kim, K.H. and Lee, H.J. 2003. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasmic of *Lactococcus lactis* ssp. lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr Cancer, 46:197-201.

20.Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. and Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and

cancer. The American journal of medicine, 113(9): 71-88.

21.Mashjur, S., Azan, Z., Kazemian, E. and Biniaze, M. 2016. Evaluation of cytotoxic effects of Medicinal plant extracts of Thyme and *Satureja* on *Artemia salina.* Scientific Journal of Aquatic Ecology, 5(3): 145-150.

22.Mehran, M., Hosseini, H., Hatami, A., Taghizade, M. and Safaei, A. 2015. Evaluation of essential oil compounds of seven species of Thyme and comparing their antioxidant properties. Journal of Medicinal Plants Research, 15(2): 135-140.

23.Mohammadi, A., Amiri, H., Khodayari, H., Zarei, A., Eghbali, D. and Azarbani, F. 2015. Study of Phytochemical and anti-Candidiasis of essential oil of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas against Candida species in three growth steps. Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants, 3(2): 8-17.

24.Moshafi, M.H. Mansouri, S., Sharififar, F. and Khoshnoodi, M. 2007. Antibacterial and antioxiidant effect of the essential oil and extract of *Zataria multiflora* Bioss. Journal Food Science and Technology. 14: 33-43.

25.Nickavar, B. and Esbati, N. 2012. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. Journal of acupuncture and meridian studies, 5(3): 119-125.

26.Nikavar, B., Mojab, F. and Doolatabadi, R. 2004. Study of component of *Thymus daenensis* flowering branches. Iranian Journal of Medicinal Plants, 4(13): 45-49.

27.Rahimmalek, M. and Goli, S.A.H. 2013. Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. Industrial Crops and Products, 42: 613-619.

28.Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M. and Sayed Tabatabaei, B.E. 2009b. Genetic variability and geographical differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Cleak, an endangered aromatic and medicinal plant as revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Biochem Genet, 47: 831-842.

29.Rustaiee, A., Sefidkon, F., Tabatabaei, S.M.F., Omidbaigi, R. and Mirahmadi, S.F. 2011. Chemical polymorphism of essential oils from five populations of *Thymus daenensis* Celak. subsp. *Daenensis* endemic to Iran. Journal Essent Oil Research, 23(3): 6–11.

30.Sadeghi, S.F., Sazegar, H. and Ghasemi, P.A. 2016. Cytotoxic effect of hydroalcholic extracts of Kelussia odaratissm. Pars Journal of Medical Sciences, 14(2): 59-67.

31.Safaei, L., Sharifi Ashoorabadi, E and Afuni, D. 2017. Effect of application of chemical fertilizers, livestock and their integration on the performance of compounds Phytochemical Essential Oil of Medicinal Herbs *Thymus daenensis* Celak. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5(2): 13-24.

32.Saidi, M. 2014. Antioxidant activities and chemical composition of essential oils from *Satureja khuzestanica*, *Oliveria decumbens* and *Thymus daenensis.* Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(3) :513-521.

33.Talebi, E., I. Nasrollahi, I., Khosravinezhad, M., Shivakumar, S. and Nemati, Z. 2017. A comparative analysis of some essential oil plant species, composition, antimicrobial properties and their applicability in the field of drug discovery - a review. International Journal of Bioorganic Chemistry, 2(2):77-82.

34.Teimouri, M. 2012. Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. J Med Plants Res, 6(4): 631-635.

35.Zambonelli, A., D'Aulerio, A.Z., Severi, A., Benvenuti, S., Maggi, L. and Bianchi, A. 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. Journal of Essential Oil Research, 16(1): 69-74.

36.Zarin Abaadi, M.M., Seidi, M. and Mohammadi, Y. 2017. Essential oil Screening and antioxidant activity of *Satureja bachtiarica* Bunge. population

in Ilam Province for Isolation of Promising Chemotypes. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5(2): 13-24.

37. Zarshenas, M.M. and Krenn, L. 2015. A critical overview on *Thymus daenensis* Celak.: phytochemical and pharmacological investigations. Journal of integrative medicine, 13(2): 91-98.