مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی گیاه کاسنی (*Cichorium intybusL.*) و داروی نیستاتین بر رشد قارچ کاندیداآلبیکنس جداشده از عفونت واژینیت در شرایط invitro

فاطمه ابراهیمی[1]، کامبیز روشنایی[2*]، فاطمه جمالو[2]

۱. کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

۲. استاد یار گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۵)

چکیده

مقدمه و هدف: با افزایش روز افزون مصرف گیاهان دارویی در درمان طبی، این شاخه از طب مکمل، جایگاه ویژه‌ای در درمان بیماری‌ها پیدا کرده است. این مطالعه به منظور مقایسه اثر عصاره ی هیدروالکلی گیاه کاسنی و داروی نیستاتین بر رشد قارچ کاندیداآلبیکنس جداشده از عفونت واژینیت در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه آن با سوش استاندارد مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها: کاندیدا آلبیکنس در محیط سابرو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل،کشت داده شد. سه سری ۱۰ تایی از عصاره گیاه کاسنی و یک سری ۱۰ تایی از دیسک آغشته به نیستاتین آماده شد. داخل هر پلیت، ۱ دیسک عصاره گیاهی،۱ دیسک نیستاتین به عنوان کنترل مثبت و یک دیسک متانول و ۱ دیسک خالی به عنوان کنترل منفی گذاشته شد. بعد از ۲۴ ساعت، میزان قطر هاله عدم رشد عصاره گیاه با میزان قطر هاله عدم رشد کنترل مثبت با آنالیز ANOVA مقایسه شد($p<0.05$).

یافته‌ها: میزان هاله عدم رشد نیستاتین (۲۸) میلی‌متر با تفاوت معنی‌داری از کاسنی (۱۷) میلی‌متر بیشتر بودو میزان هاله عدم رشد در ترکیب کاسنی و نیستاتین (۴۵) میلی متر از کاسنی (۱۷) میلی متر و نیستاتین (۲۸) میلی متر بیشتر بود($p\leq0.05$).

نتیجه گیری: کاسنی تأثیرات ضد قارچی روی کاندیدا آلبیکنس را نشان داد اما تاثیر داروی نیستاتین بر روی عدم رشد سویه های کاندیدا آلبیکنس نسبت به کاسنی بیشتر بود و ترکیب دارو با عصاره بر روی عدم رشد سویه های کاندیدا آلبیکنس نسبت به نیستاتین بیشتر بود

کلیدواژگان

تأثیر ضد قارچی، عصاره هیدروالکلی کاسنی، نیستاتین.

* نویسنده مسئول، رایانامه: roshanaei@gmail.com

مقدمه

گونه های کاندیدا مهم ترین عوامل عفونت های قارچی در انسان و حیوان هستند . اکثر عفونت ها به وسیله کاندیدا آلبیکنس که منشاء داخلی دارد، ایجاد می شود و تقریباً در ۶۰ تا ۹۰ درصد عفونت های مربوطه جد ا شده است (۱). اغلب افراد این قارچ را در زمان تولد در طی عبور از کانال زایمان کسب می کنند.کاندیدا آلبیکنس در بدن در تعادل با سایر میکروارگانیسم ها زندگی می کند و به صورت ساپروفیت شا یع روی سطوح مخاطی به ویژه دهان، دستگاه گوارش و واژن است، اما عوامل مختلف می تواند این تعادل را به هم زده و منجر به بروز عوامل متعددی نظیر - بیماری علامت دار پیشرونده فعال گردد(۲).

واژینیت یک بیماری ناحیه ژنیتال می باشد که هر ساله بیش از ده میلیون از مراجعات پزشکی را به خود اختصاص می دهد. شایع ترین عوامل ایجاد کننده واژینیت ها، باکتری ها بوده و کاندیدا آلبیکنس به عنوان دومین عامل ایجاد کننده این عفونت محسوب می شود. همچنین شایع ترین مخمر جدا شده از واژن شامل کاندیدا آلبیکنس (۸۵ تا ۹۰ درصد) می باشد و در زنان با علائمی نظیر تورم، قرمزی، سوزش و خارش لب های مهبل و ترشحات شیری و سفید رنگ بروز می کند(۳).

عفونت های کاندیدا باید درمان شوند، زیرا ممکن است در بیماران نوتروپنیک و نقص ایمنی، انتشار یابند. روش درمانی چنین عفونت هایی یک چالش بزرگ است، زیرا مقاومت پاتوژن ها نسبت به تعداد ی از داروها یی که مورد استفاده وسیع هستند؛ افزایش یافته است (۴).

نیستاتین یک تترااان ماکرولید تولید شده به وسیله استرپتومایسس نورسئی است. این دارو به صورت پودر زرد رنگی است که به مقدار کم آمفوتریک بوده و به مقدار کم محلول در آب است. نیستاتین دارای خاصیت مهار رشد قارچ بوده و در غلظت بالا و اسیدی فعالیت قارچ کشی قوی نشان می دهد. این دارو فعالیت بسیار عالی علیه مخمرهای جنس کاندیدا به خصوص کاندیدا آلبیکنس دارد(۵).

مشکلات همراه با درمان و مدیریت عفونت ها ی کاندیدا، کشف عوامل ضدقارچی جدید به منظور گسترده تر کردن طیف فعالیت علیه کاندیدا را ضروری می سازد. فرآورده های طبیعی مشتق شده از گیاهان ممکن است به صورت بالقوه منجر به ترکیبات جدید ی شوند که می توانند سبب مهار رشد این قارچ ها شود(۶). از طرفی درمان های سنتی ارزانتر و مؤثرتر از درمانهای مدرن می باشند و در واقع در جوامعی که از گیاهان داروئی استفاده می کنند خطر ابتلا به عفونت کمتر است(۷). از دیرباز در مناطق غربی ایران برای درمان عفونت واژنیال از عصاره های گیاهی مختلفی استفاده میکردند.

گیاه مورد مطالعه کاسنی و نام علمی آن (*Cichorium intybusL.*) می باشد. گیاه کاسنی متعلق به تیره مرکبات،زیرتیره زبانه گلی ها و از مهم ترین گیاهان تیره (Asteraceae)می باشد. این گیاه دارای ریشه نسبتاً ضخیم وعمود،ساقه حامل تعداد زیادی گل های آبی رنگ وبرگ های پائینی ساقه بریده وبرگ های بالایی آن به صورت ساده واز نوع متناوب است. ارتفاع ساقه کاسنی در حالت وحشی به۰/۵تا۱/۵مترمی رسد ولی گاهی از۲مترهم تجاوزمی کند.موسم گل دهی گیاه کاسنی در تابستان از تیر ماه تا شهریور ماه است. این گیاه در سراسر قاره ی اروپا به عنوان گیاه زینتی ودارویی کشت داده می شود.در ایران در نواحی کوهستانی،خراسان، گیلان و مازندران، زنجان، تهران، اصفهان و بسیاری از مناطق دیگر می روید(۸). از جمله ترکیبات مهم گیاه کاسنی، ترکیبات فلاونوئیدی و ترپنوئیدی می باشد(۹).

از آنجایی که مطالعات گذشته اثرات ضد

میکروبی(ضد قارچی و ضد باکتری) گونه های مختلف گیاه کاسنی (۱۰) را نشان داده است، لذا هدف از انجام این تحقیق، مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی گیاه کاسنی(.Cichorium intybusL) و داروی نیستاتین بر رشد قارچ کاندیداآلبیکنس جداشده از عفونت واژینیت در شرایط invitro می باشد.

مواد و روش

نحوه عصاره گیری

جهت تهیه عصاره ی مورد مطالعه، گیاه کاسنی از مناطق مختلف استان جمع آوری و در دمای محیط و سایه (به دور از نور مستقیم) خشک گردیدند . سپس با کمک آسیاب گیاه را به صورت پودر درآمده و۲/۲ گرم از پودر حاصله در دستگاه سوکسله قرار گرفته و از اتانول۷۰ درصد (۳۰ cc) به عنوان حلال استفاده شد. ابتدا سوکسله روی حرارت (هیتر) قرار گرفت و با داغ شدن و جوشیدن اتانول درون بالن سوکسله، اتانول۷۰ درصد (۳۰ cc) بخار شده وارد مخزن بالایی سوکسله شده با پودر گیاه ترکیب شده و اتانول به رنگ قهوه ای روشن در آمد و اتانول همراه مقداری از گیاه که در آن حل شده بود وارد بالن سوکسله می گردیدو دوباره اتانول۷۰ درصد (۳۰ cc) بخار شده وارد مخزن بالایی سوکسله شده و در تماس با پودر گیاه قرار گرفت و در هر بار مقداری از عصاره را حل کرده و با خود وارد بالن سوکسله می کند، بعد از حدود شش ساعت همه ی عصاره به داخل بالن وارد می شود. عصاره حل شده در اتانول۷۰ درصد (۳۰ cc) را ابتدا صاف کرده و سپس برای جدا سازی عصاره و اتانول۷۰ درصد (۳۰ cc) را در دستگاه روتاری با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، با دور ۶۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا عصاره مورد نظر از آب و اتانول۷۰ درصد (۳۰ cc) جدا شود، سپس عصاره را به صورت مایع از روتاری اواپراتور خارج کرده و در پلیت و در آون با دمای پایین خشک کردیم و در نهایت برای این که مواد موثر خود را از دست ندهد، در یخچال و دور از نور نگهداری شد.

تهیه نمونه

در این بررسی از ۳۰ نفر نمونه گیری شد، در ابتدا جهت زنان مشکوک به واژینیت که باردار نباشند پرسشنامه ای تکمیل گردید و سوالهایی شامل: سن-شغل- میزان تحصیلات-علایم بیماری (خارش-سوزش-ترشح...)....پرسیده شد.

سپس جهت گرفتن نمونه بیمار را در وضعیت لیتوتومی قرار داده و توسط سواپ استریل از ترشحات آنها نمونه برداری کردیم وسواپ را ابتدا درون لوله های درپیچ دار حاوی ۵/.سی سی نرمالین سالین و جهت کشت مستقیم بر روی سابروز دکستروز حاوی کلرامفنیکل قرار داده شد.

سپس نمونه را بعد از کشت بر روی محیط سابروز دکستروزآگار حاوی کلرامفنیکل، بمدت ۲۴-۴۸ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم خانه گذاری کرده،سپس با به بکارگیری تست های مرفولوژی(رنگ آمیزی گرم جهت مشاهده وجود مخمر دارای جوانه و سودوهایف) ماکرومیکروسکوپی توانایی تولید لوله زایا در سرم ایجاد کرده و جهت کشت بر محیط کروم آگار به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد.در نهایت با سپری کردن این مراحل می توان گونه آلبیکنس را از غیر آلبیکنس جدا نمود.

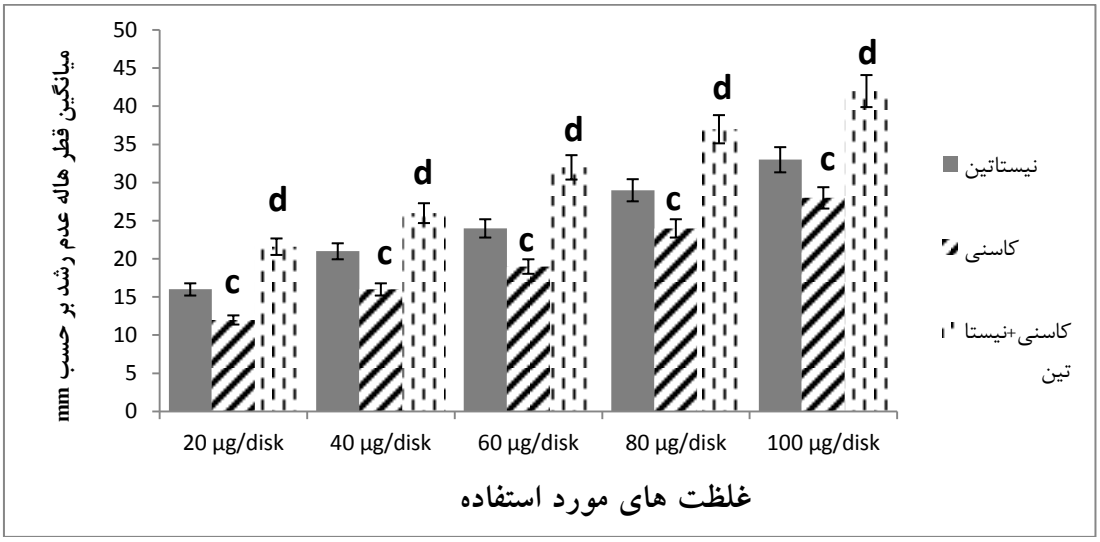
آنالیز آماری

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۸ و روش آماری تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه(ANOVA) وآزمون مقایسه زوج ها (Paired Samples Test) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و سطح معنی دار در همه این حالات$P\leq0.05$ در نظر گرفته شد. رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت گرفته و نمودارهای میانگین به صورت Mean±SEM نمایش داده شد.

نتایج

نمودار قطر هاله عدم رشد در حضـور نیســتاتین-کاسنی، نیستاتین وکاسنی

بر اساس نتایج به دست آمده (نمودار۱-۱) میانگین قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت ها افزایش یافته است و میزان هاله عدم رشد داروی نیستاتین نسبت به گیاه کاسنی بیشتر و دارای اختلاف معنی داری در سطح(c p≤0. 05) می باشد. اما میزان هاله عدم رشد ترکیب نیستاتین و کاسنی نسبت به داروی نیستاتین افزایش یافته و در غلظت هایμg/ml ۲۰،۴۰ و ۶۰ دارای اختلاف معنی داری در سطح (d p≤0. 05) و در غلظت های ۸۰μg/ml و ۱۰۰ دارای اختلاف معنی داری در سطح (d p≤0. 05) می باشند.



شکل ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد در حضور نیستاتین-کاسنی، نیستاتین وکاسنی

بحث

واژینیت، یک بیماری متداول ناحیه‌ی ژنیتال می‌باشد که هر ساله حدود ده میلیون از مراجعات پزشکی را به خود اختصاص می‌دهد. شایعترین عوامل ایجاد کننده‌ی واژینیت ها، باکتری ها بوده و کاندیدا آلبیکنس به عنوان دومین عامل بروز این عفونت ها محسوب می‌شود. ولوواژینیت کاندیدایی یک عفونت مخاطی فرصت‌طلب و شایع می‌باشد که بیشتر به علت قارچی به نام کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌شود. این بیماری بیشتردر زنان سالم در سن باروری ایجاد شده و باعث ناراحتی و گرفتاری آنها می‌شود که غالباً ناشناخته باقی می‌ماند(۱۱). عدم دسترسی آسان و گران بودن داروها، اثرات جانبی و بویژه توسعه مقاومت دارویی منجر به استفاده از مواد بیولوژیکی به عنوان راه حل های جایگزین گردیده است. در این میان به نظر میرسد گیاهان و ترکیباتی که از گیاهان مشتق شده اند راه حل های مناسبی برای درمان بیماری های عفونی مقاوم باشند(۱۲). در مطالعه حاضر تاثیر مهاری عصاره گیاه کاسنی بر سویه بومی کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج بدست آمده از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد نشانگر این است که عصاره کاسنی دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد.

فعالیت ضد قارچی گیاه کاسنی به اثبات رسیده است. در این خصوص دانشمندان، اثر ضد میکروبی

عصاره کاسنی را بررسی کرده و نشان دادند هم عصاره آبی و هم عصاره الکلی این گیاه برروی این باکتری ها موثر می باشد. بر طبق این مطالعه، تقریباً همه ی ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده در این گیاه آروماتیک یا ترکیبات آلی هستند و بیشتر از طریق حلال های اتانولی و متانولی استخراج می شوند(۱۳).

شیخی و همکارانش نیز طی مطالعات خود در سال ۲۰۱۲، فعالیت ضد قارچی اسانس کاسنی را در مدل عفونت کاندیدیایی در شرایط in vitro و in vivo بررسی کرده و اثبات کردند که این گیاه دارای قدرت ضد قارچی می باشد(۱۴).نتایج به دست آمده از این تحقیقات با نتایج مطالعه حاضر، مشترک می باشد.

تحقیقات جعفری و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان داده اند که عصاره گیاه کاسنی دارای ترکیبات تری پنوئیدی و مونوترپن هایی است که فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری های گرم منفی دارند(۱۵).

عصاره های گیاهی، متابولیت های ثانویه ای هستند که غنی از ترکیبات با هسته ی مرکزی ایزوپرنی هستند. این ترکیبات با نام عمومی ترپن ها خوانده می شوند که ساختار شیمیایی عمومی آن ها $C_{10}H_{16}$ است و به صورت مونوترپن، دی ترپن، تترا ترپن و تترا ترپن ها مشاهده می شوند.هنگامی که این ترکیبات حاوی عناصر دیگری(معمولاً اکسیژن) باشند، ترپنوئید نامیده می شوند.ترپنوئید ها از واحدهای استات ساخته می شوند و دارای مبدا مشترکی با اسید چرب هستند. تفاوت آن ها با اسیدهای چرب در انشعابات فراوان و حلقوی بودن آن هاست(۱۶). در این رابطه، اصغریان و همکاران خود در طی تحقیقات خود در سال ۲۰۱۵، فعالیت مهار کنندگی ترپنوئیدها علیه باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها مورد بررسی قرار گرفته است.مکانیسم عمل تریپنوئیدها احتمالاً به صورت تشکیل کانال های یونی در غشای میکروبی یا مهار رقابتی آدهسین های پروتئین های میکروبی یا گیرنده های پلی ساکاریدی میزبان است(۱۷).

بنابراین با توجه به حضور تریپنوئید در گیاه کاسنی، این ترکیبات احتمالاً از طریق اتصال به پروتئین ها و تغییر در عملکرد آن ها، فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی خود را اعمال می کنند.

گیاه کاسنی به عنوان گیاه دارویی دارای مواد فعال بیولوژیکی است که از آن جمله میتوان به فلاونوئید ها اشاره کرد(۱۸).فلاونوئید ها از جمله مهمترین مواد تشکیل دهنده کاسنی هستند و فلاونول-o-گلیکوزیدها بیشترین میزان این ترکیبات را تشکیل می دهد(۱۹). فلاونوئیدها ترکیبات هیدروکسیله فنلی هستند که دارای اثرات آنتی اکسیدانی میباشند و به صورت یک گروه متصل به یک حلقه ی آروماتیک مشاهده می شوند. طبق بررسی های انجا م شده، این ترکیبات توسط گیاهان در پاسخ به عفونت های میکروبی ساخته می شوند. فعالیت آ نها به علت اتصا لشان به پروتئین های خارج سلولی و محلول و اتصال به دیواره ی سلولی باکتر ی ها می باشد. با توجه به اتصال فلانوئیدها به پروتئین ها، فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات مربوط به توانایی آ نها در غیر فعال کردن آدهسین ها، آنزیم ها و پروتئین های انتقا ل دهنده ی غشای سلول می باشد(۲۰).

در این خصوص بر اساس مطالعات صورت گرفته، فلاونوئیدهای موجود در انار به همراه پروتئین هایی با وزن ملکولی زیاد، کمپلکس های پیچیده ای را تشکیل می دهند و بدین ترتیب پس از جذب می توانند با آنزیم های سلولی (اکسید وردکتاز) موجود در سیتوپلاسم و دیواره سلولی واکنش داده و خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می کند (۲۱). همچنین طی نتایج تحقیقات دیگر در این خصوص، اثر ترکیبات فنولیک بر رشد میکروب ها و تولید سم میتواند در نتیجه ی قابلیت ترکیبات فنولیک در تغییر پذیری دیواره ی سلولی و خروج ماکرومولکول ها از درون سلول نیز باشد. همچنین این ترکیبات می توانند با پروتئین های غشاء واکنش داده و باعث تغییر شکل

این پروتئین ها و به تبع آن تغییر در عملکرد آنها شوند (۲۲).

از طرفی با توجه به نتایج حاصل از پژوهش فرهنگی و سایر محققین، اسانس گیاه نعناع فلفلی بدلیل دارا بودن تیمول، منتول، ترکیبات فنول و فلاونوئید، و همچنین اکسید کننده هایی مانند پیپریتنون اکسید و ترپنها دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد مخمری بخصوص کاندیدا آلبیکنس می باشدکه با نتایج پژوهش حاضر هم راستا می باشد(۲۳).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که عصاره گیاه کاسنی دارای خاصیت ضد میکروبی می باشد و فعالیت ضد میکروبی و از جمله ضد قارچی گیاه کاسنی(۲۴) احتمالاً مربوط به ترکیبات و اجزای ضد میکروبی آن ها می باشد.

بر اساس این مطالعه غلظت های ۸۰µg/ml و ۱۰۰ داروی نیستاتین در مطالعه حاضر دارای هاله عدم رشد به میزان ۲۶ و ۲۸ میلی متر می باشد اما میزان قطر هاله عدم رشدترکیب داروی نیستاتین و گیاه کاسنی در غلظت های فوق به ترتیب ۵۰ و ۴۵ میلی لیتر محاسبه گردید که با مطالالعات مشابه هم خوانی دارد(۲۵). با توجه به این نتایج می توان از عصاره این گیاه و فرآورده های آن برای درمان برخی از عفونت ها استفاده نمود که البته این مسئله تحقیقاتی را بر روی نمونه های حیوانی آزمایشگاهی نیاز دارد . از طرفی با توجه به محدودیت های 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 عصاره های این گیاهان دارد و می تواند در کنترل بیماریها مفید باشد.

بنابراین از آنجایی که عصاره هیدروالکلی گیاه کاسنی اثر مهارکنندگی و کشندگی بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس در شرایط برون تنی (in vitro) نشان داد، این تحقیق می تواند مقدمه ای برای انجام مطالعات بیشتر در شرایط درون تنی (in vivo)بررسی تاثیر دما و سایر شرایط فیزیولوژیک بدن انسان بر این عصاره و همچنین احتمال پیداش مقاومت دارویی تحقیقات بیشتری انجام شود.

منابع و مآخذ

1. Mengistie Z,Woldeamanuel Y, Asrat D, Adera A. , Prevalence of bacterial vaginosis among pregnant women attending antenatal care in Tikur Anbessa University Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Research Notes, 2014*, 7:822 .
2. Ronsani MM, Mores Rymovicz AU, Meira TM, Trinidade Grégio AM, Guariza Filho O, Tanaka OM, Ribeiro Rosa EA. Microb Pathog. Virulence modulation of Candida albicans biofilms by metal ions commonly released from orthodontic devices. 2011 Dec; 51(6):421-5.
3. Porzoor A, Macreadie IG. Application of Yeast to Study the Tau and Amyloid- β Abnormalities of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease. 2013; 35(2):217-225.
4. Patenaude C, Zhang Y, Cormack B, Ko¨hler J, Rao R. Essential role for vacuolar acidification in Candida albicans virulence. J Biol Chem 2013; 288: 26256_64.
5. Arbabi Klati F, Sherzaee M, Poorzaman M, Dabiri S. [Inhibitory effects of plant extracts containing thyme, clore and cinnamon compared to Nystatin on Candida albicans. (In vitro)].
6. J Res Dent Sci. 2012; 8 (4):175-9.
7. Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of Salvadora persica and Juglans regia L. extracts against oral Candida strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Jan; 29(1):81-8.
8. Nasrolahi Z, Yadegari MH, Moazeni SM. Antifungal effect green tea polyphenols (Camellia sinensis) on Candida albicans. J Med Sci 2009; 12: 71-77.
9. Shad M.A., Nawaz H., Rehman T., Ikram N. Determionation of some biochemicals, phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Cichorium intybus* L: a comparative study. J. Anim. Plant Sci. 2013; 23(4):1060–1066.
10. Sharma R, Mahajan S, Gupta A., In vitro Antibacterial Activity of Cichorium intybus against some Pathogenic Bacteria, British Journal of Pharmaceutical Research ,2013,3(4), 767-775.
11. Carazzone C, Mascherpa D, Gazzani G , and Papetti A. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Food Chemistry 2013; 138(2-3):1062-1071.
12. Fan Di , Laura A Coughlin, Megan M Neubauer, Jiwoong Kim, Min Soo Kim, Xiaowei Zhan, Tiffany R Simms-Waldrip, Yang Xie, Lora V Hooper, Andrew Y Koh.mActivation of HIF-1α and LL-37 by commensal bacteria inhibits Candida albicans colonization. *Nature Medicine* 21,2015, 808-814.
13. Raja, R.D.A., Jeeva, S., Prakash, J.W., Antonisamy, J.M., Irudayaraj, V., Antibacterial activity of selected ethnomedicinal plants from South India., Asia. PAC. J. Trop. Med., 2011, 4(5): 375-8.
14. Taraz Z ; Shams Shargh M; Samadi F ; Ebrahimi P ; Zerehdaran S, Effect of Chicory Plant (Cichorium intybus L.) Extract on Performance and Blood Parameters in Broilers Exposed to Heat Stress with Emphasis on Antibacterial Properties, Article 8, 2015, Volume 3, Issue 2, Page 151-158.
15. Shaikhi T, Rub RA, Sasikumar S. 2012. Antimicrobial screening of Cichorium intybus seed extracts, Arabian Journal of Chemistry.2012,04,012
16. Jafari Sales Abolfazl, Nader Nezamdoost Shadbad, Vahid Purabdollah Kaleybar, The Investigation of the Antibacterial effects of Ethanol extract of Cichorium intybus L. on Antibiotic-resistant Staphylococcus aureus strains, Bull. Env.Pharmacol. Life Sci., 2015,Vol 4 (4), 161-164
17. Zhao, Y.-J.; Cheng, Q.-Q.; Su, P.; Chen, X.; Wang, X.-J.; Gao, W.; Huang, L.-Q. Research progress relating to the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of terpenoids in medicinal plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, *98*, 2371–2383.

18. Asgharian Parina, Fariba Heshmati Afshar, Solmaz Asnaashari, Sedigheh Bamdad Moghaddam, Atefeh, Characterization of Terpenoids in the Essential Oil Extracted from the Aerial Parts of Scrophularia Subaphylla Growing in Iran, Adv Pharm Bull, 2015, 5(4), 557-561

19. Shad, M.; Nawaz, H.; Rehman, T.; Ikram, N. Determination of some biochemicals, phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Cichorium intybus* L.: A comparative study. *J. Anim. Plant Sci.* 2013, *23*, 1060–1066.

20. Haj Seyed Hadi M, Taghi Darzi M, Ghandeharialavijeh Z, et al. Influence of Bio fertilizers on Flower Yield and Essential Oil of Chamomile (Matricaria chamomile L.). Int j Agronomy Plant Production 2010; 1 (2): 61-64.

21. Resende F. A., C. P. da Silva Almeida, W. Vilegas, and E. A. Varanda, "Differences in the hydroxylation pattern of flavonoids alter their chemoprotective effect against direct- and indirect-acting mutagens," *Food Chemistry*,2014, vol. 155, pp. 251-255.

22. Gabriel Betanzos-Cabrera, Perla Y. Montes-Rubio1, Héctor E. Fabela-Illescas1, Helen Belefant-Miller and Juan C. Cancino-Diaz, Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of Staphylococcus epidermidis, International Journal of Poultry Science,2015, 14 (4): 229-239.

23. Reda S. Mohammed, Sahar S. El Souda, Hanan A.A. Taie, Maysa E.Moharam, Kamel H. Shaker, Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves, Journal of Applied Pharmaceutical Science,2015, Vol. 5 (06), pp. 138-147.

24. Farhangi Ghaleh Joughi N, M.R. FarahpourM. Neiriz Naghadeh, Histopathological evaluation of the effect of Mentha piperita essential oil on cutaneous wound healing in rats infected with C. albicans,2015, Volume 11, Issue 47, Page 1453-1462.

25. Hamid Reza Gheisari, Hassan Habibi, Azadeh Khadem, Sima Anbari, Comparison of Antimicrobial activity of *Cichorium intybus*, *Dorema aucheri* and *Prangos ferulacea* extracts against some food borne pathogens, International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences, 2016, 5(3):80-84

26. Seca, A.M.L., et al., The genus Inula and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. Journal of Ethnopharmacology, .2014.04.010.