مقایسه بین اثر ضد قارچی فوماریا آفیسینالیس، اکیناسئا آنگوستیفولیا و سرکه های سیب، خرما و انگور با فلوکونازول در مقابله با کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا به دست آمده از کاندیدیازیس واژن

مجید باقری[۱]، مهناز محمودی راد[۲*]، اردلان منصوری[۳]، شیما یونس پور[۴]، دکتر ربابه طاهری پناه[۵]

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. لیسانس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. کارشناسی ارشد آمار زیستی، دانشکده بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۵. متخصص زنان و زایمان، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۳۱ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۳/۱۲/۹

خلاصه

مقدمه: کاندیدیاز ولوواژینال، یک بیماری آزار دهنده در میان زنان است که عامل آن عمدتاً کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا می باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ضد قارچی سرکه خرما، سرکه سیب، سرکه انگور، عصاره متانولی تخم فوماریا آفیسینالیس (شاه تره) و عصاره متانولی بذر اکیناسئا آنگوستیفولیا (سرخارگل) در مقایسه با داروی فلوکونازول در جلوگیری از رشد دو گونه قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتای جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس واژن انجام شد.

روش کار: این مطالعه سطحی مقطعی در سال۱۳۹۲ بر روی ۴۹ نمونه از ترشحات واژینال زنان ولوواژینال مثبت که در بیمارستان مهدیه تهران به داروی فلوکونازول پاسخ نداده بودند، انجام شد. از این ۴۹ نمونه، ۱۳ مورد کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا تشخیص و جداسازی شد. عصاره گیاهان به روش خیساندن تهیه شد، سپس با روش آگار دیفیوژن و تعیین قطر هاله عدم رشد، میزان حساسیت و یا مقاومت کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا در مقابل ترکیبات گیاهی تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون های ویلکاکسون و من ویتنی انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته ها: فلوکونازول در مقایسه با ترکیبات آلی مورد مطالعه، هاله عدم رشد بزرگتری داشت. با این حال سرکه سیب و انگور، تأثیر قابل توجهی در میان ترکیبات طبیعی داشتند. سایر ترکیبات اثربخشی قابل توجهی را نشان ندادند.

نتیجه گیری: گیاهان پزشکی و سرکه ها هاله مهارکننده کوچک تری نسبت به فلوکونازول داشتند، عوارض جانبی جدی نداشتند و هزینه بسیار کمتری را تحمیل می کنند. علاوه بر این، روش مشخصی برای ارزیابی قابل اعتماد گیاهان با توجه به قطر هاله عدم رشد آن ها هنوز مشخص نشده است.

کلمات کلیدی: آگار دیفیوژن، اکیناسئا آنگوستیفولیا، فوماریا آفیسینالیس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** مهناز محمودی راد؛ مرکز تحقیقات پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. **تلفن:** ۲۲۴۳۹۹۵۷-۰۲۱ ؛ **پست الکترونیک:** mahnazrad@gmail.com

مقدمه

کاندیدیاز ولوواژینال، یکی از قابل توجه ترین بیماری های قارچی در بین زنان است که حتی می تواند از زن آلوده به این بیماری به شریک جنسی وی انتقال یابد و مشکلات جنسی دردناکی را نیز برای او ایجاد کند. در مجموع ۷۵٪ از زنان در طول عمر خود به کاندیدیاز ولوواژینال مبتلا می شوند و ۵۰-۴۰٪ از آن ها دوباره به این بیماری با همان علائم بالینی مبتلا می شوند. بسیاری از این بیماران پیش آگهی خوبی نسبت به این بیماری دارند و راحت تر بهبود می یابند، ولی عود بیماری در آن ها نیز امکان پذیر است (۱). کاندیدا آلبیکنس، عامل اصلی ولوواژینال است و ۸۵٪ از کل عفونت ولوواژینال را شامل می شود (۲). در مرحله بعدی، کاندیدا گلابراتا حائز اهمیت است که شیوع کمتری دارد. متأسفانه در برخی موارد، مقاومت در برابر برخی داروها مانند داروهای آزول و داروهای دیگر قارچی مشاهده شده است و این مقاومت در میان سویه کاندیدا گلابراتا شایع است (۳).

از نظر ویژگی ها و مشخصات تشخیصی، کاندیدا آلبیکنس، یک مخمر است که به صورت تکی و یا در دسته‌های کوچک (بلاستوکنیدیا) مشاهده می‌شود. این قارچ بر روی محیط های کشت اختصاصی نظیر کورن میل توین ۸۰ آگار، بلاستوکنیدیا، هایفی کاذب[1]، هایفی حقیقی و کلامیدوسپور تولید می‌کند. از ویژگی‌های دیگر این گونه، تولید لولهٔ زایا در سرم یا محیط های مشابه دیگر بعد از ۲/۵ الی ۳ ساعت انکوباسیون می‌باشد. کاندیدا آلبیکنس روی محیط کشت معمولی تنها بلاستوکنیدیا ایجاد می‌کند.

کاندیدا گلابراتا هایفی کاذب تشکیل نمی دهد و به همین دلیل قبلاً آن را به عنوان تورولوپسیس می‌شناختند و دارای بلاستوکونیدی‌های گرد تا بیضی کوچک می‌باشد (۴).

در حال حاضر، به طور کلی کاندیدا، داروهای سنتتیک تجاری به طور رایج مورد استفاده قرار می گیرند. ولی بروز عوارض جانبی و ظهور مقاومت دارویی در میان گونه های قارچی، پژوهشگران را تشویق به یافتن ترکیبات و طراحی داروهای جدید برای جایگزینی با داروهای قبلی می نماید.

تعداد فزاینده ای از مطالعات بر روی ترکیبات و داروهای گیاهی در حال انجام می باشند. احتمالاً این نوع ترکیبات، قابل اطمینان تر و ایمن تر از ترکیبات با منشأ غیر طبیعی می باشند. در حال حاضر، تلاش هایی برای استفاده از عصاره گیاهان برای اهداف پزشکی انجام گرفته است (۵) و برخی تحقیقات، اثرات ضد باکتری و ضد قارچ از برخی از گیاهان مانند اکیناسه[2] و فوماریا[3] را نشان داده اند (۶-۹). همچنین به تازگی، انواع مختلف سرکه به خاطر اثرات مفید آن ها بر سلامتی مورد توجه قرار گرفته است.

در اوایل سال ۱۹۹۰، اکیناسه به دلیل دارا بودن اثرات ضد باکتری و ضد ویروسی برجسته، توجه بسیاری را به خود جلب کرد و در حال حاضر در سراسر جهان به طور گسترده در حال استفاده است. اکیناسه، شناخته شده ترین گونه گیاهی برای تحریک سیستم ایمنی بدن با القاء ماکروفاژها و افزایش فعالیت فاگوسیت ها به واسطه سلول های کشنده طبیعی[4] می باشد. همچنین اثرات ضد التهابی در این گیاهان مشاهده شده است. به علاوه گونه اکیناسه می تواند ترشح فاکتورهای نکروز دهنده تومور و اینترلوکین های ۱، ۶ و ۱۰ را افزایش دهد (۱۰).

به طور مشابه، جنس گیاهی فوماریا دارای فواید پزشکی مختلف است و همچنین برای درمان برخی بیماری های پوستی مانند التهاب ملتحمه و جوش های پوستی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۱). ایزوکوینولین[5]، ترکیب اصلی فوماریا است که باعث اثربخشی آن می شود. همچنین اثرات ضد ویروسی و ضد قارچی به دلیل ترکیباتی مانند پروتوپین[6]، پارفومین[7]، کریپتوپین[8]، کوپتیسین[9] و غیره در فوماریا مشاهده شده است (۱۲).

[1] pseudohyphae

[2] Echinacea
[3] Fumaria
[4] NK cells
[5] Isoquinoline
[6] Protopine
[7] Parfumine
[8] Cryptopine
[9] Copticine

سرکه یک محصول بیوشیمیایی آلی است. تخمیر اکسیداتیو اتانول باعث تولید اسید استیک می گردد که سرکه نامیده می شود. سرکه را به راحتی می توان از میوه هایی مانند انگور، سیب و خرما به دست آورد. اثر ضد باکتری مشاهده شده در سرکه عمدتاً به دلیل وجود اسید استیک در آن است (۱۳). بسیاری از گزارش ها تأثیر مثبت سرکه را در ارتقاء سلامت و پیشگیری از بیماری ذکر کرده اند (۱۴).

با توجه به سودمندی گیاهان آلی نام برده شده، مطالعه حاضر با هدف مقایسه اثر ضد قارچی ترکیبات محلی شامل اکیناسه آنگوستیفولیا[1] (شناخته شده به عنوان سرخارگل در ایران) و فوماریا افیسینالیس[2] (شناخته شده به عنوان شاه تره در ایران) و ۳ نوع سرکه و مقایسه نتایج تأثیرات آن ها با داروی فلوکونازول که در درمان کاندیدیاز ولوواژینال کاربرد دارد، انجام شد.

روش کار

این مطالعه سطحی مقطعی در سال ۱۳۹۲ بر روی ۴۹ نمونه از ترشحات واژینال زنان ولوواژینال مثبت که در بیمارستان مهدیه تهران به داروی فلوکونازول پاسخ نداده بودند، انجام شد. حجم نمونه بر اساس فرمول تعیین میزان حجم نمونه و از مقاله کادام و همکاران (۲۰۱۰) بدست آمد (۱۵). در مراحل بعدی، از میان این ۴۹ نمونه به دست آمده، مجموعاً ۲۶ مورد آلبیکنس و گلابراتا تشخیص و جداسازی شد و بقیه نمونه ها که گونه هایی غیر از این دو گونه ذکر شده بودند، از مطالعه خارج شدند. نمونه ها با سواب استریل گرفته شدند و سپس بلافاصله بر روی سابورو دکستروز آگار همراه با کلرامفنیکل (SC[3]) کشت داده شده و به مرکز تحقیقات پوست دانشگاه شهید بهشتی علوم پزشکی تهران منتقل شدند. در همه موارد، رضایت نامه کتبی از بیماران شرکت کننده و یا بستگان آن ها گرفته شد.

هر دو گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا بر اساس ویژگی های مختلف از جمله خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک قارچ، محیط کشت اختصاصی و روش های مولکولی شناسایی شدند.

نمونه های تأیید شده از نظر وجود این دو گونه کاندیدا بر روی هر دو محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SC) و همچنین بر روی محیط رنگزای کروم آگار کشت داده شدند. نمونه ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس از نظر وجود کلنی های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا بررسی شدند. این دو گونه با توجه به خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک خاص خود شناخته شدند.

کلنی های کاندیداهای رشد یافته جمع‌آوری، و تا زمان انجام multiplex PCR در آب مقطر استریل در دمای اتاق ذخیره شدند. کیت ژنومی استخراج DNA (Bioneer AccuPrp ®) برای آماده سازی و استخراج DNA برای آزمون Multiplex PCR و بر اساس دستورالعمل آن استفاده شد. این روش برای غربالگری دقیق کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا و همچنین تأیید نتایج حاصل از مرحله کشت قارچ استفاده شد.

در مرحله بعد، تشخیص گونه ها به روش multiplex PCR با استفاده از کیت PCR Premix (AccuPower® Bioneer Compony) انجام شد. هر میکروتیوب این کیت شامل یک واحد پلیمریزه کننده داکسی نوکلئیک اسیدها (DNA Taq polymerase)، ۲۵۰ میکرومولار داکسی نوکلئوتید های سه فسفاته (dNTP)، ۱۰ میلی‌مولار (pH ۹/۰) تریس به همراه هیدروکلریک اسید (Tris-HCl)، ۴۰ میلی‌مولار پتاسیم کلراید(KCl)، ۵/۱ میلی‌مولار منیزیوم کلراید (MgCl2)، تثبیت کننده و رنگ تعیین کننده میزان پیشروی (tracking dye) است.

به هر میکروتیوب ۱ تا ۵ نانوگرم از DNA استخراج شده و ۴ میکرولیتر از مخلوط آماده شده از ۴ پرایمر با سکانس‌های زیر افزوده شد:

توالی سکانس های یونیورسال و اختصاصی با توجه به مقاله چانگ و همکاران انتخاب شدند (۱۶) که به شرح زیر می باشند:

[1] angustifolia Echinacea
[2] Fumariaofficinalis
[3] Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol

توالی پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS2:
ITS1: 5́-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3
ITS2: 5́-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3́
پرایمرهای اختصاصی کاندیدا آلبیکنس:
CA3: 5́-GGT TTG CTT GAA AGA CGG TAG-3́
CA4: 5-AGT TTG AAG ATA TAC GTG GTA G-3́
این پرایمرها قسمتی از ناحیه محفوظ مانده S rDNA ۱۸، ITS1 مجاور و قسمت کوچکی از S rDNA ۲۸ را تکثیر می‌کنند (۱). در مورد کاندیدا آلبیکنس غیر از پرایمرهای یونیورسال از پرایمر اختصاصی این گونه نیز استفاده شد که بخشی از ناحیه ITS2 را تکثیر می کنند. پرایمرها از TAGC توسط شرکت ژن فن‌آوران تهیه و پس از حل کردن آن ها در آب دیونیزه، مخلوطی از دو میکرولیتر از هر پرایمر با آب مقطر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد که در هر PCR میزان ۴ میکرولیتر از این ترکیب به مخلوط واکنشی اضافه شد.
حجم مخلوط واکنشی بعد از افزودن پرایمرها و DNA نمونه ها با آب دیونیزه به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و میکروتیوب ها برای تکثیر DNA در داخل دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient قرار داده شدند. تنظیم دستگاه برای انجام یک سیکل ۳ دقیقه‌ای با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل: یک دقیقه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون، یک دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمرها و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای پلیمریزاسیون توسط Taq پلیمراز و در نهایت یک سیکل ۵ دقیقه ای با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای پلیمریزاسیون نهایی صورت گرفت.
محصولات PCR روی ژل آگاروز ۴٪ (Roche) الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید (Sigma) رنگ‌آمیزی شدند. سپس باندهای به دست آمده روی ژل، تحت اشعه UV با دستگاه Gel Documentation (UVdoc, GAS9000, England) مشاهده و عکس برداری شد. محاسبات اندازهٔ باندها با نرم‌افزار UVIsoft انجام گرفت. در نهایت محصول PCR بر روی ژل آگارز ۴٪ الکتروفورز شد.
در مجموع ۱۳ نمونه حاوی کاندیدا گلابراتا و ۱۳ نمونه حاوی کاندیدا آلبیکنس شناسایی و در بررسی های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.
نتایج تست های بعدی به عنوان تست های مکمل استفاده شدند و نتیجه کلی برای تشخیص مدنظر قرار گرفت.

تست لوله زایا:

بررسی و مشاهده تشکیل لوله زایا به عنوان یک تست فرعی و غیر اختصاصی برای تشخیص کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، یک سوسپانسیون از کلنی های رشد یافته بر روی SC تهیه و به سرم اضافه شد و سپس در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. لوله زایا در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X مشاهده شد که یک شاهد قوی برای وجود کاندیدا آلبیکنس می باشد.

تست تشکیل کلامیدوسپور:

گونه کاندیدا آلبیکنس قادر به تولید کلامیدوسپور است. این ویژگی به عنوان معیاری دیگر برای تأیید کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، کلنی ها درون کورن میل آگار تلقیح شده و در دمای اتاق به مدت ۳ روز انکوبه شدند. محل تلقیح از نظر به وجود آمدن کلامیدوسپور مورد بررسی قرار گرفت.

تست جذب کربوهیدرات:

محیط کشت قارچ حاوی کربن و نیتروژن و با استفاده از کیت API 20C-AUX و دستورالعمل مربوطه (bioM´erieux, Paris, France) برای بررسی توانایی های قارچ در استفاده از کربوهیدرات های مختلف تحت شرایط هوازی به کار گرفته شد.

عصاره گیری گیاهان دارویی:

آماده سازی عصاره بذر اکیناسه آنگوستیفولیا و فوماریا افیسینالیس به روش خیساندن انجام شد. مزیت اصلی این روش، استفاده از متانول است که نقش حیاتی به عنوان حلال دارد و کمترین تغییر را در ساختار داخلی ترکیبات در مقایسه با روش های دیگر در دسترس

ایجاد می کند. در مرحله بعد، عصاره گیاهان با عبور از کاغذ صافی استریل شدند.

تهیه سرکه:

سرکه های انگور، خرما و سیب در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. در اولین قدم برای تهیه سرکه انگور، انگورها جمع آوری و به خوبی شسته و به طور کامل له شدند. سپس انگورها را در یک ظرف قرار داده و ۱۵۰ الی ۲۰۰ سی سی آب به آن ها اضافه شد. سپس ظرف با درب پوشیده شد، اما یک منفذ کوچک برای جریان هوا ایجاد شد، زیرا جریان هوا برای فرآیند تخمیر ضروری است. پس از یک هفته، انگورها ۲ یا ۳ بار هم زده و به خوبی مخلوط شدند. در آب و هوای معتدل، مخلوط شدن کامل انگور در حدود یک ماه طول می کشد و تفاله یا پس مانده انگور در کف ظرف ته نشین می شود، ولی عصاره انگور در بالای ظرف می ماند. بعد از گذشت ۷۰-۵۰ روز، عصاره انگور جمع آوری و در ظرفی دیگر قرار داده شد و به مدت ۲۰-۱۰ روز در همین حالت نگهداری شد تا به طور کامل ترش و تبدیل به سرکه شود.

سرکه خرما و سرکه سیب نیز با استفاده از روش مشابه با سرکه انگور آماده شدند. تنها تفاوت در میزان اضافه کردن آب بود، بدین صورت که مقدار بیشتری آب در مرحله اول به سرکه خرما اضافه شد. ولی هیچ مقدار آبی برای تهیه سرکه سیب اضافه نشد.

تست آگار دیفیوژن:

با بهره گیری از روش آگار دیفیوژن، میزان حساسیت و یا مقاومت کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا در مقابل ترکیبات گیاهی تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا از هر نمونه بیمار سوسپانسیونی معادل 10^5 واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی لیتر (CFU/mL) با استفاده از محلول مک فارلند ۰/۵ تهیه شد. سپس هر کدام از این نمونه های آماده شده بر روی پلیت های مجزا تقسیم شدند. بر روی هر پلیت، حفره هایی برای مواد ضد قارچی مورد بررسی ایجاد شد. حفره ها با ۶۰ میکرولیتر از هر کدام از ترکیبات پر شدند. فلوکونازول با غلظت استاندارد ۲۵ میکروگرم (Sigma Germany Corporation,) در ۶۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. برای تعیین حساسیت یا مقاومت گونه های مورد مطالعه به فلوکونازول و با توجه به هاله عدم رشد، از پروتوکول استاندارد M44-A2 به دست آمده از مؤسسه استاندارد های آزمایشگاه بالینی استفاده شد (۱۷). پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. این روش، قادر به نشان دادن حساسیت میکروارگانیسم ها بر اساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف ترکیبات مهار کننده و یا دارو است. ترکیبات با هاله عدم رشد گسترده تر، اثر مهار کنندگی بیشتری دارند.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) انجام شد. جهت تعیین تفاوت های میان ترکیبات ضد قارچ از نظر قطر هاله از آزمون بدون پارامتری فریدمن، جهت مقایسه دو به دوی ترکیبات از تست ناپارامتری ویلکاکسون با اصلاحات بن فرونی و جهت تعیین اینکه آیا قدرت مقاومت های مختلف بین کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا در برابر هر ترکیب وجود دارد، از آزمون من ویتنی یو استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

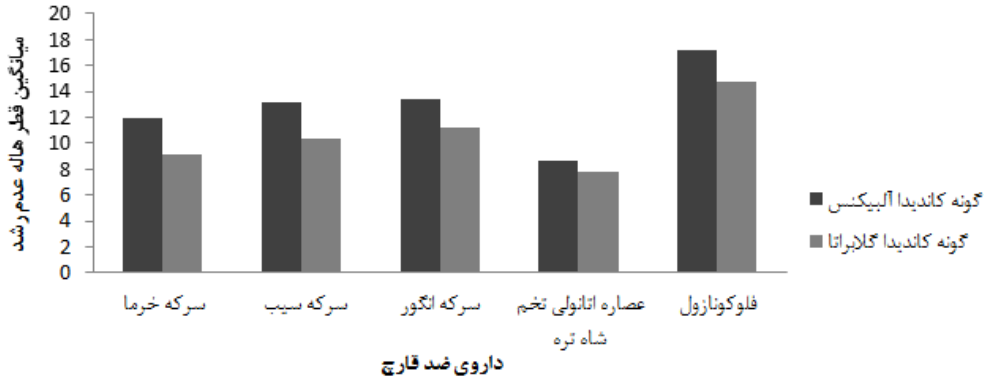
یافته ها

به طور کلی، در این مطالعه ۱۳ نمونه کاندیدا آلبیکنس و ۱۳ نمونه کاندیدا گلابراتا از ۴۹ بیمار جدا شد. برای شناسایی دقیق‌تر گونه های کاندیدا، از روش مالتی پلکس پی سی آر نیز استفاده شد (شکل ۲). داروی فلوکونازول که به عنوان شاهد به کار گرفته شد، برجسته ترین تأثیر را نشان داد. سرکه سیب و انگور با توجه به تحلیل های آماری (جدول ۱، نمودار ۱) مؤثرتر از سایر ترکیبات آلی بودند. عصاره متانولی بذر فوماریا افیسینالیس (شاه تره)، پایین ترین هاله عدم رشد را در بین ترکیبات دارا بود (شکل های ۳ و ۴). به طور کلی، کاندیدا آلبیکنس در برابر ترکیبات ضد قارچی حساسیت بیشتری نسبت به کاندیدا گلابراتا نشان داد (شکل های ۶-۳). لازم به ذکر است که عصاره بذر سرخارگل به دلیل اثر بسیار ضعیف بر روی گونه های مورد مطالعه در مرحله پایلوت اولیه از مطالعه حذف شد.

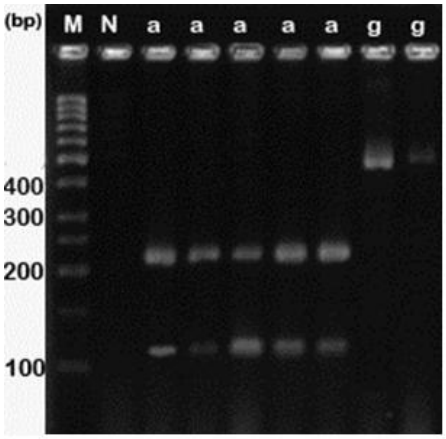
جدول ۱- تأثیر داروهای ضد قارچی بر قطر هاله عدم رشد بر حسب دو گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

ترکیبات ضد قارچی	کاندیدا آلبیکنس				کاندیدا گلابراتا			
	میانگین	انحراف معیار	میانه	دامنه	میانگین	انحراف معیار	میانه	دامنه
سرکه خرما	۱۱/۹۲	۰/۷۶	۱۲	۱۰-۱۳	۹/۱۵	۱/۲۱	۱۰	۷-۱۱
سرکه سیب	۱۳/۱۵	۰/۶۹	۱۳	۱۲-۱۴	۱۰/۳۸	۱/۶۱	۱۱	۸-۱۳
سرکه انگور	۱۳/۴۶	۰/۹۷	۱۳	۱۲-۱۵	۱۱/۲۳	۱/۵۹	۱۲	۸-۱۳
عصاره متانولی تخم شاه تره	۸/۶۲	۰/۸۷	۹	۷-۱۰	۷/۸۵	۰/۹۰	۸	۷-۱۰
فلوکونازول	۱۷/۱۵	۰/۹۰	۱۷	۱۶-۱۸	۱۴/۷۷	۰/۸۳	۱۵	۱۴-۱۶

اعداد مربوط به قطر هاله عدم رشد اعم از میانگین، انحراف معیار، میانه و دامنه بر حسب میلی متر می باشند.

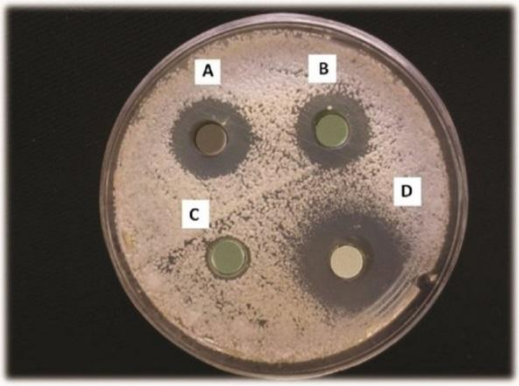


نمودار ۱- بررسی میانگین قطر هاله عدم رشد به تفکیک ترکیبات مورد آزمایش در بین دو گروه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

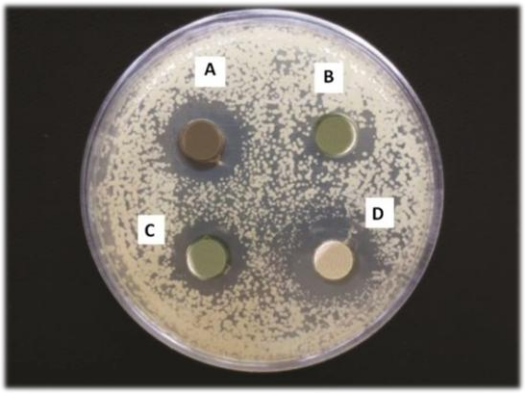


شکل ۲- باندهای مربوط به PCR و تفکیک نهایی دو گونه آلبیکنس و گلابراتا با توجه به اندازه باند

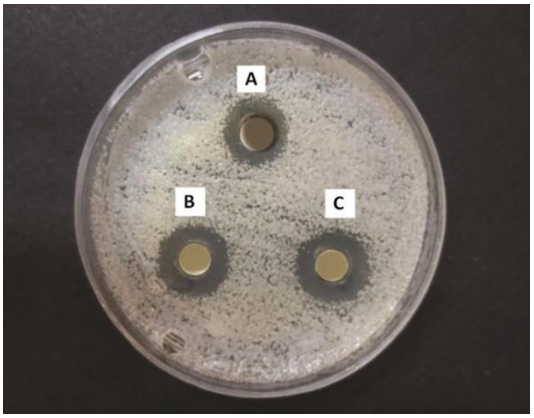
حرف M در شکل بیان گر مارکر DNA، N کنترل منفی، a گونه کاندیدا آلبیکنز و g گونه آلبیکنس گلابراتا می باشند. الگوی کاندیدا آلبیکنس دو باند ۲۱۸ یا ۲۱۹ (جفت پرایمر ITS1 و ITS2) و ۱۱۰ (جفت پرایمر C3 و C4) جفت بازی می باشد. کاندیدا گلابراتا دارای تک باند ۴۸۲ یا ۴۸۳ جفت بازی می باشد.



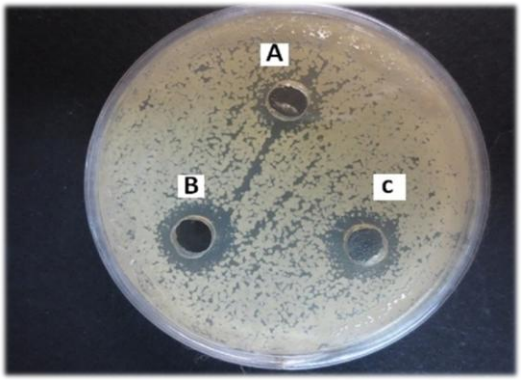
شکل ۳- مقایسه اثر ضد قارچی عصاره شاه تره، سرخارگل و سرکه خرما با فلوکونازول بر رشد گونه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیمار. A: سرکه خرما، B: عصاره متانولی گیاه شاه تره، C: عصاره متانولی سرخارگل، D: فلوکونازول



شکل ۴- مقایسه اثر ضد قارچی چند ماده بر رشد گونه کاندیدا گلابراتا جدا شده از بیمار. A: سرکه خرما، B: عصاره متانولی سرخارگل، C: عصاره متانولی شاه تره، D: فلوکونازول



شکل ۵- مقایسه اثر ضد قارچی سرکه انگور، سرکه سیب و سرکه خرما بر روی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیمار. A: سرکه خرما، B: سرکه انگور، C: سرکه سیب



شکل ۶- مقایسه اثر ضد قارچی سرکه انگور، سیب و خرما بر روی کاندیدا گلابراتا. A: سرکه خرما، B: سرکه انگور، C: سرکه سیب

بحث

در این مطالعه داروی فلوکونازول، بزرگترین قطر هاله عدم رشد را در میان تمام ترکیبات مورد بررسی داشت. با این وجود، سرکه انگور و سیب، اثر ضد قارچی قابل توجهی را برای کنترل عفونت های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا نشان دادند. عمدتاً تأثیر بسزای سرکه انگور و سیب می تواند به دلیل میزان زیاد اسید استیک در آن ها باشد. در بسیاری از مطالعات، اسید استیک خواص آنتی اکسیدانی و ضد قارچی خود را نمایان کرده است (۱۸، ۱۹). یقیناً سرکه در کنترل و مهار عوامل بیماری زای مختلف مؤثر است (۱۸-۲۱).

عمده دلایل محدودیت استفاده از داروی فلوکونازول، عوارض جانبی جدی آن می باشد که شامل: ایجاد بیماری های خونی و اختلالات سیستم لنفاوی، بیماری های مرتبط با سیستم ایمنی بدن، عفونت های متابولیک، اختلالات روانی و عصبی، اختلالات قلبی و عروقی و بسیاری دیگر از نمونه های تجربی می باشد. علاوه بر این، دوز بالای دارو به میزان تقریبی ۴۰۰ میلی گرم در روز، اثرات جانبی شدید به خصوص در افراد مبتلا به اختلالات سیستم ایمنی بدن دارد. همچنین مقاومت گسترده به فلوکونازول در گونه های دیگر کاندیدا مانند کاندیدا کروزئی[1]، کاندیدا تروپیکالیس[2] و کاندیدا پاراپسیلوسیس[3] مشاهده شده

[1] C.krusei
[2] C.tropicalis
[3] C.parapsilosis

است (۲۲، ۲۳). بنابراین تلاش های تحقیقاتی مختلف برای پیدا کردن ترکیبات دارویی آلی، دور از ذهن نیست.

در مطالعه حاضر عصاره بذر اکیناسه آنگوستیفولیا تأثیری بر روی قارچ ها نداشت. علاوه بر این عصاره بذر فوماریا افیسینالیس نیز تأثیر قابل قبولی را نشان نداد. مطالعه سینگال و همکاران (۲۰۰۹) بیانگر تأثیر کم عصاره گیاه فوماریا افیسینالیس بر روی کاندیدا آلبیکنس بود (۲۰) که نتایج آن ها مشابه نتایج مطالعه حاضر بود. ارهان و همکاران (۲۰۰۷) با بهره گیری از روش میکرودایلوشن و استفاده از تمام قسمت های گیاه فوماریا ایندیکا[1] به دنبال یافتن اثرات ضد قارچی بودند. جالب توجه است که نتایج آن ها بیانگر تأثیر قابل قبول این گونه از فوماریا بود. این تفاوت در نتایج می تواند به دلیل تفاوت گونه مورد مطالعه باشد. تحقیقات بیشتری برای تعیین اثر ضد قارچی دقیق از جنس فوماریا مورد نیاز است (۲۴).

از نقطه نظر مقاومت گونه های کاندیدا در برابر عوامل ضد قارچی، تمام ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه اثر بیشتری بر روی کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با کاندیدا گلابراتا داشتند. اما نتایج متفاوتی در مورد میزان حساسیت در کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا در مطالعات دیگر وجود دارد. مطالعه کوریاما و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که کاندیدا آلبیکنس، مقاومت بیشتری نسبت به کاندیدا گلابراتا در برابر فلوکونازول دارد (۲۵). در مطالعه پینتو و همکاران (۲۰۰۸) نمونه هایی از کاندیدا از دهان جمع آوری شد و گزارش کردند که سرکه، تأثیر بیشتری بر روی کاندیدا گلابراتا نسبت به کاندیدا آلبیکنس دارد (۱۴).

این تفاوت اثر که بر روی کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا مشاهده شده است، می تواند به دلیل شباهت بین گونه ها و نتایج ناپایدار آزمون ها مانند تفاوت در جذب قند به دلیل تفاوت در فنوتیپ و مسیرهای متابولیک متغیر در یک ارگانیسم باشد و نتایج متفاوتی در به دنبال داشته باشد. با این حال لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر از روش PCR Multiplex برای افزایش میزان دقت و صحت نتایج استفاده شد. ولی در حال حاضر نمی توان به یقین بیان کرد که کدام گونه نسبت به ترکیبات دارویی مذکور، حساس تر یا مقاوم تر می باشد.

نتیجه گیری

داروهای گیاهی، هزینه و عوارض جانبی کمتری را نسبت به داروهای سنتتیک تحمیل می‌کنند و با وجود آن که تأثیر ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق کمتر از داروی استاندارد فلوکونازول بود، با این حال می‌توان از سرکه انگور و سیب، به دلیل اثر تقریباً رضایت بخش آن ها، برای درمان ولوواژینیت کاندیدایی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

[1] Fumaria indica

منابع

1. SOBEL JD. Candidal vulvovaginitis. Clin Obstet Gynecol 1993; 36(1):153-65.
2. Murina F, Graziottin A, Felice R, Radici G, Di Francesco S. The recurrent vulvovaginal candidiasis: proposal of a personalized therapeutic protocol. ISRN obstetrics and gynecology 2011; 2011: 806065.
3. Ibrahim S, Mohammed B, Yahaya M, Audu B, Ibrahim H. Prevalence of Vaginal Candidiasis among Pregnant Women with Abnormal Vaginal Discharge in Maiduguri. Niger J Med 2013; 22(2):138-42.
4. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. Essentials of clinical mycology: Springer; 2011. p. 167-74.
5. Lisboa C, Santos A, Dias C, Azevedo F, Pina-Vaz C, Rodrigues A. Candida balanitis: risk factors. J Eur Acad Dermatol Venereol 2010; 24(7):820-6.
6. Suau R, Cabezudo B, Rico R, Najera F, López-Romero J. Direct determination of alkaloid contents in Fumaria species by GC-MS. Phytochem Anal 2002;13(6):363-7.
7. Diehl HS. Medicinal treatment of the common cold. JAMA 1933;101(26):2042-9.
8. Jiang X. An experiment on the sterilization effects of bamboo vinegar. Journal of Bamboo Research 2005; 24(1):50-3.
9. Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, et al. Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea. Biol Pharm Bull 2004;27(7):1004-9.
10. Roesler J, Emmendörffer A, Steinmüller C, Luettig B, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant Echinacea purpurea to test subjects mediates activation of the phagocyte system. Int J Immunopharmacol 1991;13(7):931-41.
11. Gupta PC, Sharma N, Rao CV. A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Fumaria indica (Fumitory). Asian Pac J Trop Biomed 2012;2(8):665-9.
12. Gupta PC, Rao CV. Morpho-anatomical and physicochemical studies of Fumaria indica (Hausskn.) Pugsley. Asian Pac J Trop Biomed 2012;2(10):830-4.
13. Vadlapudi V, Kaladhar D. In Vitro antimicrobial profile of crude extracts Calotropis procera and Centella asatica linn against resistant pathogens. Journal of Herbal Medicine and Toxicology. 2013;7(1):31-7.
14. Pinto TMS, Neves ACC, Leão MVP, Jorge AOC. Vinegar as an antimicrobial agent for control of Candida spp. in complete denture wearers. J Appl Oral Sci 2008;16(6):385-90.
15. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. J Clin Microbiol 2001; 39(10):3466-71.
16. Pfaller MA, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J Clin Microbiol 2010;48(4):1366-77.
17. Odds FC. Candida and Candidosis: A Review and Bibliography .2nd ed.Philadelphia:. W.B. Saunders Company;1988.
18. Moghtader M. In vitro antifungal effects of Fumaria vaillantii Loisel. essential oil on Aspergillus flavus. Journal of Yeast and Fungal Research 2013;4(2):21-5.
19. Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pak J Pharm Sci 2009; 22(1):102-6.
20. Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research 2010; 4(2):104-11.
21. Falahati M, Sharifinia S, Foroumadi A, Bolouri F, Akhlagh L, Yazdan Parast A, et al. Drug Resistance Pattern in Candida Species Isolated from Vaginitis. Razi Journal of Medical Sciences 2009;16(65). (Persian).
22. Tseng Y-H, Lee W-T, Kuo T-C. In-Vitro susceptibility of fluconazole and amphotericin B against Candida isolates from women with Vaginal Candidiasis in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis 2005;13(1):12-6.
23. Kuriyama T, Williams D, Bagg J, Coulter W, Ready D, Lewis M. In vitro susceptibility of oral Candida to seven antifungal agents. Oral Microbiol Immunol 2005;20(6):349-53.