

بررسی اثر مهاری عصاره آبی گیاه پیاز تابستانه بر روی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی

جعفر پناهی¹، محمدرضا هواسیان¹، صبریه قیطاسی²، ایرج پاکزاد^{3*}، آناهیتا جلیلیان⁴، رضا هوشمندفر⁵، معصومه هواسیان⁶

1) گروه علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

2) گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

3) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

4) گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

5) گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

6) گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور ایلام

تاریخ دریافت: 90/12/8

تاریخ پذیرش: 91/11/18

چکیده

مقدمه: کاندیدیازیس یکی از مهم ترین و شایع ترین بیماری های قارچی فرصت طلب در انسان است. در واقع مهم ترین بیماری قارچی در زنان واژینیت کاندیدایی می باشد. از زمان های گذشته تا کنون به طور سنتی از گیاه پیاز تابستانه به صورت وسیع در مناطقی از استان ایلام برای درمان انواع مختلف عفونت ها استفاده شده است. هدف از این مطالعه تعیین اثر مهاری عصاره آبی گیاه پیاز تابستانه بر روی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

مواد و روش ها: ساقه گیاه پیاز تابستانه پس از جمع آوری در محیطی گرم، خشک و کم رطوبت به دور از نور مستقیم و در سایه خشک شد. عصاره آبی گیاه با روش استاندارد عصاره گیری انجام شد و پس از جمع آوری نمونه ها از کلینیک های زنان و زایمان به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد در آنکوباتور قرار داده شدند و تاثیر عصاره به روش دیسک دیفیوژن و انتشار در آگار با تعبیه چاهک 3 بار مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته های پژوهش: نتایج حاصل از انجام آزمایش های متعدد غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه بر روی نمونه های بالینی و نمونه استاندارد قارچ حاکی از این است که غلظت های 5، 10، 20، 40 mg/ml دارای اثر بسیار اندک بر روی کاندیدا آلبیکنس بوده اما در غلظت 80 mg/ml قطر هاله عدم رشد نسبت به غلظت های پایین تر بیشتر بوده است.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به این که ساپونین در ساختار گیاه پیازه تابستانه وجود دارد انتظار می رفت که دارای اثر مهاری قابل توجهی بر روی عوامل قارچ باشد بنا بر این حتماً در عصاره آبی این گیاه میزان کمتری از این ماده ضد قارچی موجود می باشد نتیجه گیری می شود از عصاره الکی و فنولی جهت عصاره گیری این گیاه استفاده شود.

واژه های کلیدی: عصاره آبی، پیاز تابستانه، کاندیدا آلبیکنس، ساپونین

* نویسنده مسئول: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: Pakzad_i2006@yahoo.com

مقدمه

كانديديازيس يكي از شايع ترين بيمارى هاى قارچى فرصت طلب در انسان است. اين بيمارى توسط قارچ مخمر به نام كانديدان ايجاد مى شود،(1). مخمرهاى كانديدان به طور معمول در انسان وجود دارند، و رشد آن ها به طور معمول توسط سيستم ايمنى بدن انسان و توسط ميكروارگانيسم هاى ديگر، مانند باكتري هاى اشغال كننده مكان هاى يكسان در بدن انسان محدود مى شود. عفونت ناشى از كانديدازيس طيف وسيعى از عوارض سطحى مانند: برفك دهان و التهاب واژن كه به طور بالقوه تهديد كننده سلامتى انسان هستند را در بر مى گيرد،(2). علاوه بر اين گونه هاى كانديدان به عنوان چهارمين عامل عفونت هاى خونى بيماران بسترى شده در بيمارستان ها مطرح شده و موجب مرگ و مير 40 درصد از بيماران بسترى در بيمارستان هاى امريكا شده است،(3). استفاده از شوينده هاى خارجى، دوش و يا اختلالات داخلى مى تواند موجب بر هم ريختن فلور طبيعى واژن، تشكّل از باكتري هاى اسيد لاكتيك مانند: لاکتوباسيل ها و در نتيجه رشد بيش از حد سلول هاى كانديدان، باعث بروز واژينيت كانديداني شود،(4،5). در تمام جهان محققان تحقيقات بسيارى را براى بررسى داروهاى ضد قارچى بر روى سويه هاى مختلف كانديدان مانند: كانديدان اسروپيكوز، گوليرموندى و كفير انجام داده اند،(6،7). گستردگى بيمارى هاى قارچى فرصت طلب در افراد مستعد و افزايش روز افزون مقاومت هاى داروئى و از طرفى ديگر اثرات سوء آن، موجب علاقه به تحقيق در زمينه بررسى آثار ضد قارچى گياهان شده است،(8). از دير باز در مناطق غربى ايران براى درمان عفونت واژينال از عصاره گياهان متفاوتى استفاده مى كردند كه بر اين اساس از گياه پياز تابستانه كه از گونه گياهى ليلاسه مى باشد، براى درمان عفونت استفاده مى شده كه اثبات اثرات ضد قارچى آن هنوز بررسى نشده است. در تحقيق حاضر اثر عصاره آبى گياه پياز تابستانه در شرايط آزمايشگاهى بر روى نمونه هاى كانديدان آليكنس جدا شده از واژينيت هاى قارچى مورد بررسى قرار مى گيرد.

مواد و روش ها

گياه پياز تابستانه با اسم علمى *Nectaroscordum Tripedale* در اواسط بهار از مناطق رويش آن از كوه هاى ايلام جمع آورى شد، و پس از تايد توسط اداره منابع طبيعى استان ايلام برگ ها در دماى 40 درجه خشك و به پودر تبديل شدند،(9). جهت عصاره گيرى از روش جوشاندن استفاده شد كه منطبق با مصرف سنتى گياه در اين منطقه مى باشد. بدین منظور 10 گرم پودر گياه با 200 ميلي ليتر آب مقطر جوش مخلوط کرده و به مدت 20 دقيقه ضمن به هم زدن دائم آن، عمل حرارت دادن ادامه پيدا نمود. سپس مخلوط، در ظرف در پوش دار در دماى اتاق نگهدارى شد. مخلوط از پارچه با بافت ريز عبور داده شد. سپس محلول عصاره صاف شده به مدت 15 دقيقه با 3500 دور در دقيقه سانترفيوژ شده و محلول بالايى در معرض هوا قرار بر روى شيشه صاف قرار داده تا زمانى كه حلال به طور كامل تبخير شده و پودر عصاره به دست آيد. از نمونه هاى بالينى جدا شده از واژينيت هاى قارچى مراجعه كننده به مطب هاى خصوصى سطح شهر ايلام و گونه استاندارد كانديدان آليكنس ATCC 2091 جهت بررسى اثر مهارى عصاره استفاده شد. و نمونه ها در محيط هاى سابورو دكستروز آگار (SDA) و سابورو دكستروز براث (SDB) با توجه به دستورالعمل كارخانه سازنده آماده شد. نمونه ها در دماى منفى 20 درجه سانتى گراد نگهدارى شد،(10). روش انتشار در آگار و روش ديسك ديفيوژن براى تعيين فعاليت ضد قارچى عصاره گياهان داروئى عليه قارچ هاى فرصت طلب مورد استفاده قرار گرفت،(11). روش انتشار در آگار با تغييرات جزئى انجام شد،(12). در اين روش طبق استاندارد مربوطه پس از شمارش دقيق قارچ ها و تهيه سوسپانسيون استاندارد با مقدار معين قارچ (200cfu/ml) آن را بر روى محيط منتقل و با استفاده از سواب استريل كشت داده شد، سپس چاهك هاى با قطر 5 ميلي متر بر روى محيط كشت سابورو دكستروز آگار تعبيه و انتهاى هر چاهك با محيط سابورو در شرايط استريل بسته شد كه از انتشار عصاره در زير محيط كشت جلوگیری به عمل آورد. سپس

غلظت های مختلف (5-100) عصاره در این چاهک ها ریخته و در دمای 37 درجه انکوبه شد، پس از 24-48 ساعت قطر هاله ای عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت.

یا فته های پژوهش

در روش دیسک گذاری بیشترین اثر مهاري مربوط به 3200 میکروگرم بر دیسک بود، و دیسک کلوتریمازول (clotrimazol) هیچ گونه اثر مهاري نداشت، اما اثر مهاري در سویه ATCC 2091 دیده شد. در روش انتشار در آگار در غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر دارای بیشترین منطقه مهاري بود. اثر مهاري غلظت های (5-10-20) تقریباً مشابه بوده وهاله عدم رشد هرکدام حدود 10 mm که باتوجه به مطالعات دیگر این میزان اثر قابل چشم پوشی می باشد. اما در غلظت 20ml و 40ml قطر هاله عدم رشد بیشتر شده

و به میزان 12 mm رسید. و نهایتاً در غلظت های 80 ml و 100 قطر هاله عدم رشد به 13 mm رسید. در روش دیسک گذاری با اضافه کردن مقادیر 100µg/disk-200-400 بر روی دیسک های استاندارد قطر هاله عدم رشد 5 mm بوده و در غلظت های 800-1600-3200 µg/disk قطر هاله عدم رشد به ترتیب 6-7 و 8 بود. و نتایج به دست آمده از اثر این عصاره بر روی سویه استاندارد شماره ATCC 2091 نشان داد که در روش تعبیه چاهک در بیشترین غلظت 100mm، قطر هاله عدم رشد 10 mm بوده و در روش دیسک گذاری در بیشترین غلظت 3,2 mg/disk، قطر هاله عدم رشد 7 mm است. (جدول شماره 1)

جدول شماره 1. اثر مهاري عصاره آبی گیاه پیاز تابستانه بر کاندیدا آلبیکنس طبق روش دیسک دیفیوژن و انتشار در آگار

آگار دیفیوژن	هاله عدم رشد	دیسک دیفیوژن
5 mg/ml	10 mm	100µg/disk
10 mg/ml	10 mm	200 µg/disk
20 mg/ml	10 mm	400 µg/disk
40 mg/ml	12mm	800 µg/disk
80 mg/ml	13mm	1600 µg/disk
100 mg/ml	13 mm	3200 µg/disk
Candida albicans	10 mm	3.2mg/disk
ATCC 2091, 100 mg/ml		

بحث و نتیجه گیری

نیاز روز افزون به داروها و ترکیبات ضد قارچی جدید و از طرفی مقاوم شدن گونه های کاندیدا نسبت به آنتی بیوتیک های رایج زمینه را برای انجام تحقیق حاضر برای بررسی آزمایشگاهی خواص ضد کاندیدایی عصاره آبی پیاز تابستانه به تنهایی و همراه با فلوکونازول پدید آورده است. عصاره پیاز تابستانه در مناطقی از غرب کشور به خصوص استان ایلام از گیاه پیاز تابستانه (N. tripedale) به صورت سنتی برای درمان بیماری های باکتریایی و ویروسی استفاده می شد. با استفاده از روش سنجش جریان ادعا شده است که این گیاه دارای

ساپونین (saponin) می باشد، (13). با مطرح شدن این ادعا که ساپونین در ساختار پیاز تابستانه وجود دارد، می توان انتظار داشت که عصاره حاضر برای درمان عفونت های باکتریایی و قارچی موثر باشد. گیاه پیاز تابستانه (N. tripedale) از خانواده لیلاسه با نام محلی پیچگ می باشد، که در غرب و جنوب ایران در طب سنتی از این گیاه به منظور آرام بخش، درد مفاصل و مغز استخوان استفاده می شود، (14). تا به حال اثر مهاري این گیاه به صورت علمی بر علیه کاندیدا آلبیکنس بررسی نشده است. این نکته نیز قابل توجه است که در بسیاری از موارد که به صورت سنتی

انجام گرفت نتایج نشان داد که عصاره اتانلی، متانلی، خیسانده و جوشانده آلیوم جسدیانوم هیچ گونه اثر ضد قارچی ندارند، اما فعالیت ضد کاندیدایی عصاره حاصل از دم کردن گیاه و شیرابه تغلیظ شده بر کاندیدا آلبیکنس، نتایج چشم گیری را به همراه داشته است، (17). در مطالعه نطنزبان تحت عنوان آثار ضد قارچی اسانس و عصاره الکلی زنیان علیه ایزوله های بالینی مقاوم و حساس به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی، تأثیر مهاری عصاره های الکلی و روغنی دانه های گیاه زنیان بر رشد سویه های حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس تأیید شد، (18). با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه می توان فرضیات ذکر شده در قسمت بالا را مد نظر داشت. حال می توان استدلال کرد که احتمالاً عصاره آبی این گیاه دارای ساپونین کمتری می باشد، پیشنهاد می شود که از عصاره فنولیک در مطالعات بعدی استفاده شود.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که عصاره آبی این گیاه علی رغم داشتن ساپونین فاقد اثر مهاری قابل ملاحظه ای بر کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی است.

از عصاره های آبی استفاده شده دارای اثر مهاری بر باکتری ها بوده، اما تأثیری بر کاندیدا نداشته اند. در مطالعه ای که توسط دکتر جعفری ندوشن به منظور اثر مهاری عصاره آبی سیر بر کاندیدا آلبیکنس صورت گرفت میزان MIC برابر با 3/12 mg/ml بوده که با توجه به این که سیر و پیاز تابستانه هر دو از تیره لیلاسه هستند احتمالاً به دلیل این که از پیاز سیر استفاده شده دارای ترکیبات ضد قارچی بیشتری در ساختار خود بوده، ولی در این مطالعه از برگ پیاز تابستانه استفاده شده است. فرضیه دیگر می تواند مربوط به مراحل رشد گیاه باشد هر چه گیاه پیرتر باشد دارای ترکیبات ضد قارچی بیشتری باشد، و در نهایت زیستگاه رشد گیاه که می تواند عاملی مهم برای میزان ترکیبات گیاه باشد، (15). در مطالعه ای که توسط خانم مومنی به منظور تعیین الگوی حساسیتی گونه کاندیدا آلبیکنس نسبت به عصاره پیاز (گیاه خانواده لیلاسه) انجام شد، نتایج نشان داد کاندیدا آلبیکنس نسبت به عصاره های خام و آب سرد پیاز حساس بود، (16). در نتایج حاصل از مطالعه خانم مدنی که به منظور مقایسه تأثیر انواع عصاره های گیاه آلیوم جسدیانوم بر سویه های مختلف کاندیدا در شرایط آزمایشگاهی

References

- 1-Parks ET, Lancaster H. Oral manifestations of systemic disease. *Dermatol Clin* 2003;21:171-82.
- 2-Cortes JA, Concha MA, Cediell TL, Castillo JS. Diagnostic methods in candidemia: a systematic review of literature with meta-analysis. *Rev Chilena Infectol* 2011;28:423-8.
- 3-Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterial* 2009;30:6333-40.
- 4-Mardh PA, Novikova N, Stukalova E. Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. *BJOG* 2003;110:934-7.
- 5-Ogunshe AA, Omotoso MA, Bello VB. The in vitro antimicrobial activities of metabolites from lactobacillus strains on *Candida* species implicated in *Candida* vaginitis. *Malays J Med Sci* 2012;18:13-25.
- 6-Liu X, Han Y, Peng K, Liu Y, Li J, Liu H. Effect of traditional Chinese medicinal herbs on *Candida* spp. from patients with HIV/AIDS. *Adv Dent Res* 2011;23:56-60.
- 7-Iwalokun BA, Ogunledun A, Ogbolu DO, Bamiro SB, Jimi-Omojola J. In vitro antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and *Candida* species from Nigeria. *J Med Food* 2004;7:327-33.
- 8-Nasrolahi Z, Yadegari MH, Moazeni SM. Antifungal effect Green Tea polyphenols (*Camellia sinensis*) On *Candida albicans*. *J Modares Biol Pathol* 2009;12:71-7.
- 9-Kusterer J, M Keusgen. Cysteine sulfoxides and volatile sulfur compounds from *Allium tripedale*. *J Agric Food Chem* 2009; 58:1129-37.
- 10-Otang WM, DS Grierson, Ndip RN. Antifungal activity of *Arctotis arctotoides* (L.f.) O. Hoffm. and *Gasteria bicolor* Haw. Against opportunistic fungi associated with

human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacogn Mag* 2012;8:135-40.

11-Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005;97:305-11.

12-Jainkittivong AT, Langlais RP. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:394-8.

13-Bagiu RV, Vlaicu B, Butnariu M. Chemical Composition and in vitro antifungal activity screening of the *allium ursinum* (Liliaceae). *Int J Mol Sci* 2012;13:1426-36.

14-Kubec RS, Kim DM, McKeon R, Musah A. Isolation of S-n-butylcysteine sulfoxide and six n-butyl-containing thiosulfinates from *Allium sicutum*. *J Nat Prod* 2002;65:960-4.

15-Nedushan AJ, Tafti MD, Mirbagheri SM. Laboratory evaluation of antifungal

effects of *Allium aqueous*(*Allium sativum*) And in combination with fluconazole against *Candida* species most commonly isolated from candidiasis lesions. *J Kerman Uni Med Sci* 2007;14:153-62.

16-Momeni L, Zamanzad B. Antibacterial effects of extracts of onion and ginger on bacteria and fungi *Candida albicans* Isolated from the urine of patients with urinary tract infections- genital. *J Shahrekord Uni Med Sci* 2010;81-88.

17-Madani M, Khosravi A, Shirani M. Effects of plant extracts *allium jesdianum* on the different strains *Candida* in vitro. *J Biol Sci Lahijan* 2009;1:63-71.

18-Ghahfarokhi M, Sattari M, Yadegari MH, Gudarzi GR, Saharkhiz MJ. Antifungal activity of essential oils and extracts *Ajowan* against clinical isolates *Candida albicans* resistant to fluconazole in vitro. *Modares J Med Sci* 2008;1-2:91-7.



The in Vitro Inhibitory Effects of the Aqueous Extracts of Summer Onion on *Candida Albicans*

Panahi J¹, Havasiyan M.R¹, Gheitasi S², Pakzad I^{*3}, Jaliliyan A⁴, Hoshmandfar R⁵, Havasiyan M⁶

(Received: 27 Feb. 2012

Accepted: 6 Feb. 2013)

Abstract

Introduction: Candidiasis is one of the most common opportunistic fungal diseases in humans. This disease is caused by a fungus, yeast called *Candida*. *Candida vaginitis* is the most important fungal disease in women. Traditionally, in western Iran for the treatment of vaginal infections, many different plant extracts are used. In this study, the inhibitory effect of aqueous extracts of Summer Bulbs was studied on isolated samples of *Candida albicans* fungal vaginitis.

Materials & Methods: The plant samples were dried in a warm, dry and away from direct sunlight condition. And the extract was prepared by standard herbal extraction method. The samples were collected from pediatrics clinics and stored in incubator at 37°C for 24 hours. The effects of extract were evaluated through disk diffusion and

the diffusion embedding sink method, and every sample was tested three times.

Findings: The aqueous extract of the plant at the concentrations of 5, 10, 20, and 40 mg/mL had the least effects on *Candida albicans*, however at the concentration of 80 mg/mL the diameter of the *Candia* growth zone on agar was very small.

Discussion & Conclusion: Given the presence of saponins in the plant, it was expected to have significant inhibitory effect on the fungus. The aqueous extract of this plant has probably lesser amount of antifungal material; therefore the phenolic or alcoholic extract of this plant should be used.

Key words: saponin, candidiasis, aqueous extract, *Nectaroscordum tripedale*

1. Dept of Lab Sciences, Student Research Committee, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

2. Dept of Physiology Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

4. Dept of Gynecology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

5. Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

6. Dept of Biology, Ilam University of Payam-e-Noor, Ilam, Iran

*(corresponding author)