

تکنیک Bauer (۱۴) به هر تیوب مقدار (۰/۲۰ml) از محلول حاوی کاندیدا آلیکانس را اضافه نمودیم و با رعایت دستورات (National committee of clinical laboratory NCCLS standards) پس از ۷۲ ساعت بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر غلظت هر تیوب جهت امکان رشد کاندیدا آلیکانس بررسی گردید و کمترین غلظت از هر دارو که توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا را داشته است، بعنوان Minimum (MIC) Inhibitory concentration در نظر گرفته شد و یافته‌های این تحقیق با کمک تست استیودنت آنالیز آماری گردید.

نتایج:

اندازه‌گیری MIC در تیوبهای با غلظت متفاوت نشانگر این است که همگی داروهای نیستاتین، آمفوتریسین، کلوتریمازول همراه با عصاره سیر تا غلظت 128 mg l^{-1} توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا آلیکانس را دارند. نرمال‌سالیین که بعنوان کنترل در مطالعه دخالت داده شده است، در هیچ غلظتی حتی 512 mg l^{-1} خاصیت ضدقارچی را در محیط کشت نشان نداد. در غلظت 64 mg l^{-1} فقط کلوتریمازول از بین داروهای ضدقارچی توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا را دارد. در این غلظت عصاره سیر نیز خاصیت آنتی‌فانگال خود را حفظ کرد اما داروهای نیستاتین و آمفوتریسین در این غلظت توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا آلیکانس را ندارند. در غلظت 32 mg l^{-1} کلوتریمازول نیز خاصیت کشندگی خود را از دست داده و در این غلظت کاندیدا آلیکانس در تیوب رشد نمود اما حتی در این غلظت نیز عصاره سیر توانایی جلوگیری از رشد (MIC) خود را حفظ نمود. در غلظت 16 mg l^{-1} در تمامی تیوبهای مورد مطالعه کاندیدا آلیکانس رشد نموده و باعث ایجاد کدروت در تیوب هنگام بررسی با دستگاه اسپکتروفوتومتر گردید.

مدتی مؤثر بوده و ناراحتی دهانی در بسیاری از موارد مجدداً عود می‌نماید (۱۱).

با توجه به مقالاتی که در مورد خاصیت ضدقارچی عصاره سیر منتشر شده‌اند، در این پژوهش مقرر شد که خاصیت ضدقارچی آلیسین موجود در عصاره سیر با خاصیت ضدقارچی ۳ داروی متداول نیستاتین، آمفوتریسین و کلوتریمازول اندازه‌گیری شود و با نرمال‌سالیین بعنوان گروه کنترل مقایسه گردد.

روش کار:

تهیه عصاره تازه سیر:

مقدار ۸۰ گرم از حبه‌های تازه سیر مطابق با روش Bakri (۱۲) پس از له شدن به صورت هموژنیزه در ۱۰۰ میلی‌لیتر نرمال‌سالیین استریل سانتریفوژ گردید و از فیلترواتمن شماره یک عبور داده شد. با در نظر گرفتن مواد غیرمحلول حاصله نسبت به وزن سیر اولیه، غلظت عصاره بدست آمده (W/V) ۶۴٪ در نظر گرفته شد.

محلول فوق تا زمان استفاده در دمای -70°C درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. غلظت دقیق آلیسین موجود در محلول فوق بوسیله واکنش با 4-Mercapto pyridine با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتریک و مطابق با تکنیک Miron (۱۳) عدد 260 mg/ml اندازه‌گیری شد. همچنین از کاندیدا آلیکانس استاندارد شماره GDH2346 و محیط کشت CHROM agar candida (محصول فرانسه) و Corn meal agar Salivarious – Bacitracin جهت تست Serial tube استفاده گردید.

محیطهای کشت بدست آمده به ۵ گروه A (برای آمفوتریسین)، C برای کلوتریمازول، N برای نیستاتین، G برای عصاره سیر و S برای نرمال‌سالیین تقسیم گردید. که هر گروه نیز حاوی ۶ تیوب با غلظتهای به ترتیب $1^{-1} 512 \text{ mg}$ ، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶ از داروهای موردنظر آزمایش بودند. با

جدول شماره ۱-

غلظت هر تیوپ mg^{-1}	نرمال سالین (S)	عصاره سیر (G)	کلوتریمازول (C)	نیستاتین (N)	آمفوتریسین (A)
۵۱۲	-	+	+	+	+
۲۵۶	-	+	+	+	+
۱۲۸	-	+	+	+	+
۶۴	-	+	+	-	-
۳۲	-	+	-	-	-
۱۶	-	-	-	-	-

+ توانایی جلوگیری از رشد کلونی‌های کاندیدا البیکانس

- عدم توانایی از رشد کلونی‌های کاندیدا البیکانس

بحث و نتیجه‌گیری:

کاندیدا آلبیکانس به همراه ۳ سوژ دیگر خود (یعنی کاندیدا پاراپزیلویزیس، گراناتا و تروپیکالیس) متداول‌ترین مشکل بیماران استفاده‌کننده از دست دندان مصنوعی یعنی (Denture stomatitis) را ایجاد می‌کند (۱۵). درمانهای معمول جهت از بین بردن کاندیدیازیس دهانی عموماً بر پایه استفاده از داروهای ضدقارچ نیستاتین، کلوتریمازول و آمفوترسپین β می‌باشد که در برخی موارد با برگشت ضایعه نیز همراه می‌گردد (۱۱). با توجه به استقبال عموم بیماران از داروهای با منشأ گیاهی (Herbal medicine) جهت درمان مشکلات خود و خصوصاً با توجه به پیشینه تاریخی استفاده از خواص دارویی سیر در طب سنتی، استفاده از عصاره سیر به منظور رفع کاندیدیازیس دهانی مورد توجه محققین می‌باشد.

در این پژوهش، با توجه به یافته‌های بدست آمده از مطالعه حاصل، مشخص می‌گردد که در بین سه داروی مورد آزمایش، کلوتریمازول از نیستاتین و آمفوتریسین خاصیت ضدقارچی بیشتری دارد به طوری که حتی در غلظت 64mg^{-1} نیز توانایی خود را حفظ نموده است. همچنین مشخص شد که نیستاتین و آمفوتریسین از نظر خاصیت ضدقارچی در یک رده می‌باشند و هر دوی آنها تا غلظت 128mg^{-1} توانایی آنتی‌فانگال دارند اما در غلظتهای کمتر از این، مؤثر نمی‌باشند. نکته حائز اهمیت این مطالعه، مؤثر بودن عصاره سیر حتی بیشتر از داروی کلوتریمازول است و در غلظت 128mg^{-1} نیز که کلوتریمازول قدرت خود را از دست می‌دهد، عصاره سیر توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا آلبیکانس را حفظ نموده است ($P < 0/05$).

در غلظتهای کم (16mg^{-1}) دیگر نه عصاره سیر و نه هیچ کدام از ۳ داروی فوق آنتی‌فانگال نمی‌باشند و در غلظتهای بالا تا 512mg^{-1} همگی از رشد کاندیدا ممانعت می‌نمایند. در گروه کنترل که از غلظتهای سریال نرمال‌سالین استفاده شده بود، کاندیدا آلبیکانس حتی در غلظت 512mg^{-1} نیز رشد نموده بود که این مطلب نیز قابل پیش‌بینی بوده است.

در این مطالعه *in vitro* خاصیت ضد قارچی سیر تأیید گردید و این یافته با نتیجه مطالعات دیگری که در مورد خاصیت آنتی‌باکتریال، آنتی‌فانگال و آنتی‌ویرال عصاره سیر انجام گرفته بود، همخوانی دارد (۱۸-۱۶). علاوه بر این، در مطالعات *in vivo* که بر روی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است، تأثیر عصاره سیر حتی بر میکروب *Staph.aureus* مقاوم به متی‌سیلین (۱۹) و یا بر روی ویروسهای Cytomegal نیز تأیید شده است (۲۰).

به طور خلاصه یافته‌های این مطالعه مشخص می‌نماید که عصاره تازه سیر به طور معنی‌داری توانایی ضدقارچی دارد و اگر فرم ژل یا دهانشویه توسط کارخانه‌های بهداشتی تولید شود، امکان استفاده درمانی در عفونتهای کاندیدای دهان را دارد. اگرچه عوارض جانبی (توکسیک بودن در کبد، کلیه و یا مغز استخوان) نیز باید مدنظر قرار گیرد و عوارضی مانند استفراغ، سرگیجه و اسهال نیز در حالت استفاده اورال آن گزارش شده است (۲۱).

سپاسگزاری:

انجام این تحقیق با مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شده است که بدینوسیله قدردانی می گردد.

References

منابع

1. Fataneh F. Anti-fungal activity of herbal extract in vitro. 1st ed. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences: 1991;85-93 [Persian]
2. Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:475-480.
3. Ellmore GS, Feldberg RS. Alliin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium Sativum*). *American Journal of Botany*. 1994;81:89-94.
4. Martin KW, Ernst E. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:241-246.
5. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect*. 1999;1:125-129.
6. Sivam GP, Lampe JW, Ulness B, Swanzy SR, Potter JD. Helicobacter pylori-in vitro susceptibility to garlic (*Allium Sativum*) extract. *Nutr Cancer*. 1997;27:118-121.
7. Jonkers D, Sluimer J, Stobberingh E. Effect of garlic on vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:3045.
8. Jain RC. Antitubercular activity of garlic oil. *Indian J Pathol Microbiol*. 1998;41:131.
9. Ghannoum MA. Inhibition of candida adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum* (garlic). *J Appl Bacteriol*. 1990;68:163-169.
10. Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD, Hughes BG. In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med*. 1992;58:417-423.
11. Maver-Biscanin M, Mrvavak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level laser therapy on candida albicans growth in patients with Denture stomatitis. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:328-332.
12. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol*. 2005;50:645-651.
13. Miron T, Shin I, Feigenblat G, Weiner L, Mirelman D, Witchek M, et al. A spectrophotometric assay for allicin, alliin and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: Reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfates. *Anal Biochem*. 2002;307:76-83.
14. Roche J, Parker SJ, McAdam L, editors. Laboratory methods for detection of antibacterial resistance. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Baily and Scott's diagnostic microbiology. Stlouis: Mosby Inc; 1998:250-272.
15. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V, Biscanin A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with Denture stomatitis. *Laser Surg Med*. 2004;35:259-262.
16. Chowdhury Ak, Ahsan M, Islam SN, Ahmeh ZU. Efficacy of aqueous extract of garlic and allicin in experimental shigellosis in rabbits. *Indian J Med Res*. 1991;93:33-36.
17. Young k. Preliminary clinical observation on 17 cases of pulmonary tuberculosis treated by the intrabronchial administration of garlic juice. *Shandong Yi Kan*. 1959;21:24-25.

18. Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of streptococcus mutans to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1158-1159.
19. Tsao SM, Hsu CC, Yin MC. Garlic extract and two diallyl sulphide inhibit methicillin-resistant staphylococcus aureus infection in BALB/cA mice. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:974-980.
20. Fang F, Li H, Cui W, Dong Y. Treatment of hepatitis caused by cytomegalovirus with allitridin injection: An experimental study. *J Tongji Med Univ.* 1999;19:271-274.
21. Davis LE, Shen Jk, Cai Y. Antifungal activity in human cerebrospinal fluid and plasma after intravenous administration of Allium Sativum. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:651-653.

Anti fungal activities of fresh garlic extract on candida albicans

M.M. Fani, DDS¹ A.M. Araghizadeh, DDS²

Assistant Professor Department of Oral Medicine , School of Dentistry¹ , Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran , Assistant Professor Department of Community Medicine² , Hormozgan University of Medical Sciences , Bandar Abbas , Iran.

(Received 5 Mar, 2008 Accepted 28 Apr, 2009)

ABSTRACT

Introduction: Denture stomatitis is one of the most problem in denture wearers and related to candida albicans. In This study we aimed to determine garlic extract as an antifungal agent in oral candidiasis.

Methods: Candida albicans growth in CHROM Agar was made serial dilution from 16 to 512 mg l⁻¹ from fresh garlic extract and measured minimum Inhibitory Concentration. Normal saline was used as control.

Results: Garlic extract showed antifungal activities in 32 mg l⁻¹ concentration, where clotrimazol showed its antifungal activity in 64 mg l⁻¹ concentration and both Amphotericin and Nystatin showed their activities in 128 mg l⁻¹ concentration.

Conclusion: Garlic extract in invitro studies is more than Nystatin, Amphotericin and clotrimazol, even though, all of the one effective in higher than 128 mg l⁻¹ concentration.

Key words: Candida Albicans – Garlic – Antifungal Agents

Correspondence:
M. M. Fani, DDS.
Department of Oral
Medicine, School of
Dentistry, Shiraz University
of Medical Sciences.
Shiraz, Iran
Tel: +98 9171118583
Email:
fanim@sums.ac.ir