اثر سیر در جلوگیری از رشد درماتوفیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

محدثه لاری‌پور M.Sc.[1*]، زهیرمحمدحسن Ph.D.[2]، محمدحسین یادگاری Ph.D.[1]، عباس اخوان‌سپهی Ph.D.[3]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه قارچ شناسی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۳۳۳-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه قارچ‌شناسی
پست الکترونیک: Email: mlarypoor@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۳/۲۶، پذیرش مقاله: ۸۴/۱۱/۱۶

*** هدف:** بررسی اثر سیر درجلوگیری از رشددرماتوفیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی به منظور جایگزین کردن یک داروی گیاهی به جای داروها ی شیمیایی موجود

*** مواد و روش‌ها:** سیر از همدان تهیه شد. سپس با روش مانتیس حبه های سیر پوست گرفته و با آب استریل هموژن شد و عصاره آبی سیر به دست آمد. سپس با عبور عصاره هموژن شده سیر از فیلترهای $DIAF_{10}$ از نوع XM و PM با قابلیت‌های مختلف در عبور مولکول‌ها محلول روی فیلتر به نام R (برگرفته از Residue) و در انتها، ماده فیلتر شده با نام F (Filtrate) جمع آوری شد. به این ترتیب در ۵ مرحله فیلتراسیون فراکش‌های F_{10}، R_{10}، R_{30}، R_{50}، R_{100}، R_{300} به دست آمد. از روش SDS- PAGE با ژل ۱۴درصد اکریل آمید برای تعیین ماهیت فراکشن‌ها استفاده شد. از هر یک از فراکشن‌های به دست آمده از مرحله قبل رقت‌های ۱/۲ تا ۱/۳۲۰۰ تهیه و بر رشد هر کدام از درماتوفیت‌ها در محیط کشت اثر داده شد و حداقل غلظت مهار کننده (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) تعیین شد. درماتوفیت‌های مورد بررسی عبارتند از: تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس، تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال، تریکوفیتون روبروم، تریکوفیتون تونسورانس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم، میکروسپوروم کانیس و میکروسپورم جیپسئوم. ازموثرترین فراکشن پمادی تهیه شد و اثر آن دردرمان درماتوفیتوزیس ایجاد شده بر روی پوست خوکچه هندی مورد بررسی قرار گرفت.

*** یافته‌ها:** نتایج نشان می‌دهد F_{10} با تمامی رقت‌ها رشد میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم، تریکوفیتون تونسورانس، تریکوفیتون روبروم را کاملاً متوقف می کند و برای درماتوفیت میکروسپورم جیپسئوم MIC معادل ۱/۴ و برای درماتوفیت تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجال MIC معادل ۱/۲ به دست آمد و درماتوفیت تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس به همه رقت ها مقاومت نشان داد. همچنین پماد استفاده شده در درمان درماتوفیتوزیس بر روی خوکچه هندی رابطه معکوس معنی داری را بین شدت و قطر ضایعه با طول مدت درمان نشان می‌دهد ($p<0.01$).

*** نتیجه گیری:** در این مطالعه مشخص شد موثرترین فراکشن در درمان کچلی، فراکشن F_{10} است که حاوی ترکیباتی غیرپروتیینی بوده و بهترین داروی موثر در درمان کچلی است.

کلیدواژگان: سیر، درماتوفیت، کچلی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۱، بهار ۸۵، صفحات ۱۶-۷

مقدمه

سیر از خانواده زنبق و نام علمی آن آلیوم ساتیوم است. سیر از قدیم‌الایام به عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده قرار گرفته است و دارای خواص آنتی بیوتیکی بی‌شماری از جمله خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد انگلی و حشره کشی است (۵، ۶، ۷، ۸). اثرات دارویی سیر در درمان بیماری‌هایی نظیر ناراحتی‌های قلبی، سردرد، گزیدگی‌ها، دردهای انگلی، تومورها و برونشیت مزمن، هموروئید، تصلب شرایین و سنگ کلیه ذکر گردیده است (۹، ۱۰).

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های بیماری‌زا متعلق به خانواده مونیلیاسه هستند که عفونت‌های قارچی پوست و ضمایم آن (مو و ناخن) یا کچلی‌ها را ایجاد می‌کنند (۱۱). این بیماری‌ها به دلیل وجود فاکتورهای مستعد کننده زیادی از جمله بهداشت فردی در سراسر جهان، انتشار فراگیر دارند (۱۲). سه جنس شناخته شده که این عفونت را در انسان ایجاد می کنند، عبارتند از : تریکوفیتون ها ، میکرسپوروم‌ها و اپیدرموفیتون‌ها که واجد ۴۱ گونه و ۴ واریته‌اند.

بیماری کچلی در ایران نیز مانند کشورهای دیگر شایع است و تقریبا در همه نقاط ایران مشاهده می‌شود اما در مناطقی که از سطح بهداشت پایین‌تر است، شیوع بیشتری دارد. درمان بیماری‌های درماتوفیتی با توجه به عوارض نامطلوب و رنج‌آور بیماری و سرایت آسان آن از بیمار به سایر افراد واجد اهمیت است. دراین راه به علت عدم وجود داروهای ثمربخش و همه جانبه، همواره محققان در پی کشف داروهای تازه‌ای برای درمان بیماری‌های قارچی بوده‌اند که این

داروها، با کمترین عوارض جانبی اثراتی قاطع، فراگیر و سریع داشته باشند. علاوه بر این، گونه‌های بارز مولد بیماری از منطقه‌ای به منطقه دیگر متفاوتند، لذا جهت درمان انواع کچلی در مناطق مختلف از داروهای اختصاصی که بر سویه‌های بومی بیماری‌زا موثرند استفاده شود و این امر اهمیت استفاده از گیاهان بومی از جمله سیر را با خواص دارویی، تایید می کند.

در این مطالعه اثرات ضد درماتوفیتی سیر در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج حاصل تاییدی بر استفاده از پماد سیر به عنوان یک داروی ضددرماتوفیتی قوی، در درمان انواع کچلی است. درماتوفیت‌های مهم مورد آزمایش در این مطالعه عبارتند از:

تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس، تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال، تریکوفیتون روبروم، تریکوفیتون تونسورانس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم، میکروسپوروم کانیس و میکروسپورم جیپسئوم.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی سیر و فراکشن‌گیری

عصاره سیر به روش مانتیس تهیه شد. بدین ترتیب که پس از جداسازی پوست از حبه‌های سیر، سیر به مدت ۲۴ ساعت در فریزر نگهداری و پس از ایجاد شکاف در هر کدام به مدت یک ساعت در هوای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس با استفاده از مخلوط کن و مقدار مشخص آب استریل مخلوطی از سیر تهیه شد که پس از گذراندن از تنظیف استریل و فیلترواتمن، با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱). با استفاده از دستگاه آمیکون مدل ۵۲ و مطابق با کاتولوگ‌های آن، اولترافیتراسیون انجام شد. در این روش از فیلترهای $DIAF_{10}$ با قابلیت‌های مختلف در عبور مولکول‌ها ، شامل فیلترهای نوع PM و XM استفاده شد و بعد از هر فیلتراسیون محلول روی فیلتر به نام R (برگرفته از Residue) جمع‌آوری و در انتها، ماده فیلتر شده با نام F (Filtrate) جمع‌آوری شد. به این ترتیب در ۵ مرحله فیلتراسیون فراکشن‌های R_{300}، R_{100}، R_{50}، R_{30}، R_{10}، F_{10} به دست آمد. سپس PH هر کدام از فراکشن‌های و همین‌طور مقدار پروتیین موجود در هر میلی‌گرم از فراکشن‌های اندازه‌گیری گردید.

بررسی تاثیر عصارهٔ خام سیر بر روی رشد درماتوفیت‌ها

به منظور بررسی اثر عصاره خام سیر بر روی رشد درماتوفیت‌های مورد نظر، ابتدا از سیر تازه همدان عصاره‌گیری و پس از چند بار گذراندن از تنظیف، از محلول باقی‌مانده جهت کار استفاده شد. برای انجام این آزمایش دو روش اتخاذ شد. درروش اول بر روی محیط کشت سابورودکستروزآگار بدون آنتی‌بیوتیک و تقریبا در مرکز پلیت، چاهکی حفر و مقدار ۰/۴۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره سیر به داخل چاهک به وسیله سمپلر، منتقل شد. در فاصله حدود ۱/۵ سانتی‌متر از چاهک، درماتوفیت مورد نظر کشت داده شد، ۲ هفته در گرم‌خانه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به همین روش پلیت‌هایی نیز برای گریزئوفولوین به عنوان کنترل مثبت تهیه شد. همچنین به منظور مقایسه نتایج کار، پلیت‌هایی بدون عصاره سیر و دارو، به عنوان شاهد از در ماتوفیت‌های مورد نظر کشت داده شد.

در روش دوم به میزان ۰/۴۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره سیر یا دارو در پلیت استریل ریخته و به روش پورپلیت کردن، به پلیت‌های حاوی محیط کشت سابورودکستروزآگار مذاب با درجه حرارت ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط استریل اضافه شد که در اثر به هم زدن مخلوطی یکسان به دست آمد. پس از بستن محیط، درماتوفیت‌های مورد نظر در مرکز پلیت کشت و به مدت ۲ هفته در انکوباتور نگهداری شد. بعد از ۲ هفته قطر کلونی‌های حاصله بایکدیگر مقایسه و اندازه‌گیری شد (۳).

تهیه سوسپانسیون استاندارد

برای تهیه سوسپانسیون استاندارد از کشت های ۷ تا ۱۴ روزه درماتوفیت‌های مورد بررسی استفاده شد به این ترتیب که بخش‌های برداشت شده از سطح کلونی‌ها به آب استریل اضافه و با لام نئوبار شمارش شد تا مقدار مشخصی از اسپورها در هر میلی‌مترمکعب به دست آید. برای تنظیم مقدار دقیق اسپورها از روش تغلیظ و یا سانتریفوژ استفاده گردید. مقدار اسپور استاندارد برای تریکوفیتون‌ها 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر، برای میکروسپورم ها 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر و برای اپیدرموفیتون‌ها 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر است (۲).

تهیه محیط‌های کشت و تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC)

از فراکشن‌های به دست آمده از مرحله قبل رقت‌های ۱/۲ تا ۱/۳۲۰۰ تهیه شد. سپس به یک میلی‌لیتر محیط کشت سابورودکستروز آگار محتوی رقت‌های تهیه شده، مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون استاندارد اضافه و در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۴ روز انکوبه شد. پایین‌ترین غلظت از فراکشن که رشد درماتوفیت بعد از ۷ روز
در آن مشاهده نشود را می‌توان به عنوان مهار کننده رشد (MIC) در نظر گرفت. در این مرحله از گریزئوفولوین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین ماهیت فراکشن ها

با انجام SDS- PAGE و روش برادفورد میزان پروتیین موجود در فراکشن‌ها ارزیابی شد و برای اطمینان رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره انجام گرفت.

اندازه‌گیری مقدار پروتیین

مواد لازم جهت انجام آزمایش برادفورد

سرم‌آلبومین گاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، کوماسی‌بلو G-250،

اتانل ۹۵درصد، اسیدفسفریک ۸۵ درصد، آب مقطر، دستگاه اسپکتروفتومتر، کاغذ صافی، لوله آزمایش، قیف.

روش تهیه معرف برادفورد

۱۰ میلی‌گرم کوماسی‌بلو G-250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۵درصد حل و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن، حجم آن با اضافه کردن آب مقطر به یک لیتر رسانده و محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی و قیف، فیلتر گردید.

روش تهیه منحنی استاندارد

برای اندازه‌گیری غلظت پروتیین مجهول، ابتدا باید منحنی استاندارد تهیه شود. به همین منظور از ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. بدین صورت که از ۰/۱ BSA میلی‌گرم در میلی‌لیتر غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حجم ۱ میلی‌لیتر تهیه گردید. به ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌ها ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد. پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد. سپس جذب ۵۹۵ نانومتر آن اندازه‌گیری و بر اساس غلظت و جذب آنها منحنی استاندارد تهیه شد.

روش اندازه‌گیری غلظت پروتیین نمونه مجهول

نمونه مجهول باید آن قدر رقیق شده باشد که غلظت پروتیین در محدوده منحنی استاندارد قرار بگیرد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از نمونه مجهول رقیق شده، ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و جذب ۵۹۵ نانومتر آن اندازه‌گیری شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار میلی‌گرم بر میلی‌لیتر غلظت پروتیین اندازه‌گیری شد که با ضرب آن در ضریب رقت و حجم نمونه مقدار کل پروتیین در نمونه ارزیابی شد.

پس از مخلوط کردن، لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار گرفت. سپس با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب هر یک از لوله‌ها اندازه‌گیری و با توجه به منحنی استاندارد مقدار میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتیین نمونه مجهول تعیین شد.

حجم نمونه مجهول × ضریب رقت × مقدار پروتئین در یک میلی‌لیتر = کل پروتئین

آلوده‌سازی تجربی حیوانات آزمایشگاهی به درماتوفیت‌ها

در این مطالعه خوکچه‌هندی به عنوان مدل حیوانی جهت بررسی اثرات ضد درماتوفیتی سیر در جلوگیری از رشد درماتوفیت‌ها انتخاب شد. حیوانات مورد استفاده به طور متوسط در حدود ۲۷۰ تا ۳۵۰ گرم وزن داشتند و با غذای فشرده شده موجود در دانشگاه همچنین از کاهو، هویج، اسفناج و ویتامین ث به عنوان مکمل غذایی تغذیه می‌شدند. برای تلقیح خوکچه هندی و ایجاد بیماری تجربی ابتدا ترکیب تلقیحی تهیه شد. گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها را ابتدا در محیط سابورودکستروزآگار کشت داده و از کشت دو تا سه هفته، خمیر تهیه شد.

حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر مربع از محیط کشت همراه با کلونی‌های قارچ رشد یافته، در کنار شعله با پنس استریل بریده و با حدود ۲۰ میلی‌لیتر عسل در هاون چینی استریل مخلوط شد. محیط کشت و قارچ در عسل و زیر هود ساییده شد تا خمیر یکنواختی به دست آمد.

به منظور تلقیح خوکچه ابتدا ناحیه‌ای به وسعت ۳×۳ سانتی‌متر مربع، کاملا با ماشین اصلاح ریش‌تراش، کوتاه شد تا کاملا سطح پوست حیوان مشخص شود. سپس با تیغ یا اسکالپل استریل و خنک در جهات مختلف سطح پوست خراش داده شد و به کمک اسپاچولا استریل ناحیه خراشیده به خمیر آغشته و محل تلقیح با گاز استریل پانسمان شد. پس از حصول اطمینان از ابتلای خوکچه‌ها به بیماری کچلی، حیوانات مبتلا در قفس‌های جداگانه دسته‌بندی و با رنگ اسیدپیکریک علامت‌گذاری شدند و سپس تحت درمان قرار گرفتند. درمان مبتلایان به صورت پانسمان با پماد هر روز در ساعت ۹ صبح صورت گرفت. برای پانسمان خوکچه‌ها، از ویال‌های محتوی پماد با سوآپ استریل برداشت شده و محل ضایعه کاملا با سوآپ آغشته به پماد، آغشته شد. هر چند یک بار محل ضایعه با پنبه مرطوب تمیز شده تا ذرات پوشال، زباله و فضولات حیوان که به محل ضایعه و موهای اطراف می‌چسبید برطرف شود. تعداد خوکچه‌ها پس از پایان کار در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: تعداد خوکچه‌های مورد آزمایش

وضعیت بالینی حیوانات	تعداد
تعداد حیوانات تلقیح شده	۲۷
تعداد حیوانات تلقیح نشده	۱
ابتلا به کچلی	۲۱
عدم ابتلا به کچلی	۷
تلقیح‌شدگانی که در حین کار مرده‌اند	۲
مجموع حیوانات	۲۸

برای بررسی اثرات ضد درماتوفیتی فراکشن‌های به دست آمده از عصاره سیر، خوکچه‌های هندی با یک خمیر محتوی میسلیوم و اسپور درماتوفیت مورد نظر تلقیح شدند و پس از ابتلا به بیماری، حیوانات مورد آزمایش با پماد محتوی فراکشن F_{10} تحت درمان قرار گرفتند. نخست آزمون اولیه‌ای انجام شد تا قدرت بیماری‌زایی سویه‌های مورد آزمایش در خوکچه‌هندی مشخص شود و چون در این مرحله هیچ یک از خوکچه‌های تلقیح شده با میکروسپوروم جیپسئوم به بیماری مبتلا نشدند، در مراحل بعدی این سویه از بررسی‌ها حذف شد. پس از تلقیح، علایم بالینی بیماری همه روزه ثبت شد. در هفته اول پس از تلقیح تغییر محسوسی مشاهده نشد و تنها محل تلقیح کمی ملتهب و قرمز بود. در هفته دوم علایم بیماری به تدریج ظاهر شد که با عدم رویش و سست شدن موها در محل ضایعه و همچنین پیدایش شوره در پوست و پوسته‌پوسته شدن آن همراه بود. در هفته سوم علایم بالینی کاملا آشکار شد و به‌صورت زخم‌های ملتهب، کبره‌های خشک و سخت، تاولهای خشک، شوره دادن، عدم رویش موها به طور کامل، شکستگی موها و کدر شدن موها کاملا مشهود بود. به منظور تعیین وضعیت بیماری در پایان هفته‌های اول، دوم و سوم از مو و ضایعات محل بیماری نمونه‌گیری شد. مقداری از نمونه‌ها با استفاده از لاکتوفنل و محلول پتاس

۱۰ درصد برای مشاهده میکروسکوپی برداشته و مقداری دیگر در لوله‌های SCC نشاکاری شد. نتیجه این مطالعه در پایان هفته اول منفی بود. همچنین مشاهده میکروسکوپی و کشت از نمونه‌های هفته دوم نیز پاسخ منفی داد. کشت از ضایعات و مشاهده میکروسکوپی از نمونه‌ها در پایان هفته سوم عموما با نتیجه مثبت همراه بود. البته گاهی نیز با وجود مشاهده علایم بیماری، هنوز امکان مشاهده قارچ در نمونه‌ها مشکل بود. نتیجه کشت و مشاهده میکروسکوپی موها و ضایعات صددرصد با یکدیگر مطابقت نداشت.

تهیه پماد

در روش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ابتدا این حیوانات را به طور تجربی بیمار کرده و سپس به شکل مناسبی از عصاره‌ها برای پانسمان آنها استفاده شد. به منظور کم کردن تعداد پانسمان‌ها و استفاده از عصاره به شکلی که مصرف آن آسان و قابل قبول نیز باشد به تهیه پماد از عصاره مبادرت شد. با توجه به محلول بودن عصاره در آب، لازم بود ترکیب پایه پماد نیز محلول در آب باشد و برای این منظور از ترکیب پایه پودربچه و گلیسرول استفاده شد. گلیسرول مورد استفاده با فرمول شیمیایی $C_3H_2O_3$، نام علمی ۱، ۲ و ۳ پروپان‌تریول و وزن ملکولی ۹۲ است.

ترکیبات پماد ۲۰ درصد طبق جدول زیر است:

گلیسرول	۷ میلی‌لیتر
محلول آبی فراکشن F_{10}	۵ میلی‌لیتر
پودر بچه	۱۳ گرم
جمع	۲۵ میلی‌لیتر

دلیل اضافه کردن گلیسرول خنثی کردن اثر سوزاننده ترکیبات ارگانوسولفوره سیر است تا پوست حیوان نسوزد. پودر بچه تزریق شده بر روی یک صفحهٔ شیشه‌ای استریل با گلیسرول مخلوط شد. در آخر محلول فراکشن F_{10} به میزان معرفی شده به مخلوط اضافه و با یک همزن کاملا هم زده شد تا یک خمیر یکنواخت به دست آمد. تمام مراحل کار زیر هود و در شرایط استریل انجام گرفت و پماد به یک ویال استریل منتقل شد. علاوه بر پمادی که از فراکشن F_{10} جهت درمان استفاده شد، از پایه پماد (عسل) که در آن به جای F_{10} آب‌مقطر استریل افزوده شده بود، به عنوان شاهد استفاده شد تا اثر احتمالی ترکیب پایه پماد را در درمان کچلی نشان دهد. همزمان با درمان خوکچه‌ها با پمادهای محتوی عصاره سیر F_{10}، برای درمان گروهی از خوکچه‌های مبتلا به منظور مقایسه از قرص گریزئوفولوین به عنوان یک داروی موثر علیه عفونت‌های درماتوفیتی استفاده شد. به علاوه از آنجا که در برخی موارد حیوانات مبتلا به کچلی ممکن است به طور خودبه‌خود بهبود یابند گروهی از خوکچه‌های بیمار به عنوان شاهد تحت هیچ‌گونه تیماری قرار نگرفتند تا احتمال بروز بهبودی خودبه‌خودی بررسی شود. به منظور بررسی اثرات ناشی از مصرف پماد از حیوانات تحت درمان نیز نمونه‌گیری شد و از نمونه‌ها کشت به عمل آمد و مشاهده میکروسکوپی انجام شد. در این مرحله پس از دسته‌بندی داده‌ها، از تست آماری همبستگی (Correlation) استفاده شد و جهت یافتن یک ارتباط معنی‌دار بین قطر ضایعات و طول دوره درمان با پماد F_{10} و همچنین شدت ضایعات و طول دوره درمان با پماد F_{10}، ضریب همبستگی (r) تعیین شد.

یافته‌ها

بعد از عصاره‌گیری و فراکشن‌گیری با دستگاه آمیکون، غلظت پروتیین موجود در هر فراکشن و همین طور pH هر فراکشن تعیین شد که خصوصیات کلی فراکشن‌ها در جدول ۲ آمده است.

جهت سنجش فعالیت عصاره‌های گیاهی خام سیر برروی رشد درماتوفیت‌ها از یک تست عمومی استفاده شد. در این آزمایش، پس از افزودن مقدار ۰/۴۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره خام سیر به هریک از پلیت‌ها، بعد از ۲ هفته نتایج با اندازه‌گیری قطر کلونی رشد کرده در پلیت‌های کنترل مثبت و کنترل منفی و عصاره سیر، مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در جدول ۳ آمده است.

جدول۲: خصوصیات کلی فراکشن‌ها

نمونه‌ها	وزن مولکولی	اسیدیته pH	غلظت پروتیین بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر
R_{300}	>۳۰۰	۷/۹۹۱	۳۱/۷۱۸۴
R_{100}	۱۰۰–۳۰۰	۶/۳۱۰	۲۳/۴۷۹
R_{50}	۵۰–۱۰۰	۷/۳۰۵	۲۳/۲۱۸
R_{30}	۳۰–۵۰	۷/۳۲۷	۲۲/۰۴۹
R_{10}	۱۰–۳۰	۷/۴۱۱	۵/۷۵
F_{10}	<۱۰	۷/۴۱۰	۰/۳۷

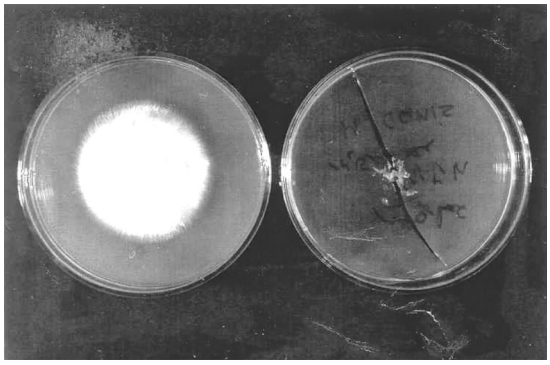
جدول۳: درماتوفیت‌های تحت آزمایش در شرایط مختلف پس از سه هفته

نوع درماتوفیت	تیمار عصاره سیر	کنترل منفی (بدون تیمار)	کنترل مثبت (گریزئوفولوین)
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس	۸	۱۲	۵/۵
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال	۷/۵	۱۴	۴
تریکوفیتون روبروم	۲	۱۱	۳/۵
تریکوفیتون تونسورانس	۳	۹	۳
میکروسپوروم کانیس	۴/۵	۱۲/۵	۴/۵
میکروسپوروم جیپسئوم	۱۴/۵	۱۵/۵	۷/۵
اپیدرموفیتون فلوکوزوم	۱/۵	۷/۵	۲
تریکوفیتون شوئن لاینی	۷	۷/۵	۴/۵
تریکوفیتون وروکوزوم	۴	۴	۳/۵

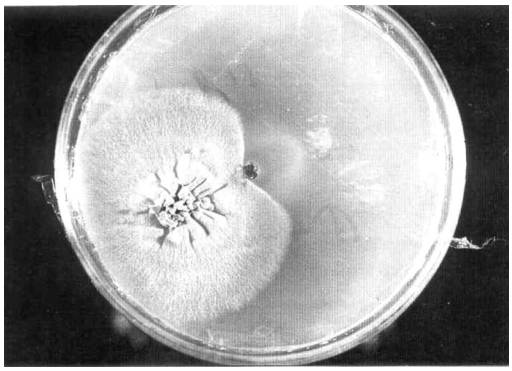
ارقام جدول بر مبنای قطر کلونی برحسب میلی‌متر است.

چنانچه میزان قطر کلونی قارچ‌های فوق با کنترل مثبت مقایسه شود، نشان می‌دهد که میزان تاثیر عصاره سیر بر مهار رشد قارچ‌های میکروسپوروم کانیس، تریکوفیتون روبروم، تریکوفیتون تونسورانس و اپیدرموفیتون فلوکوزوم در مقایسه با گریزئوفولوین بیشتر است، درحالی که در مورد تریکوفیتون وروکوزوم و تریکوفیتون شوئن‌لاینی تاثیر

گریزئوفولوین بر مهار رشد این درماتوفیت‌ها بیشتر خود را نشان می‌دهد. در شکل ۱ میزان تاثیر عصاره سیر بر روی میکروسپوروم کانیس با استفاده از روش پورپلیت نمایش داده شده است. همچنین در شکل ۲ میزان جلوگیری از رشد قارچ اپیدرموفیتون فلوکوزوم در مجاورت عصاره سیر در روش چاله‌گذاری نمایش داده شده است.



شکل ۱: تاثیر عصاره خام سیر برروی رشد میکروسپوروم کانیس پلیت سمت چپ (کنترل منفی)، پلیت سمت راست (عصاره سیر)



شکل ۲: تاثیر عصاره خام سیر برروی رشد اپیدرموفیتون فلوکوزوم در ناحیه چاهک محتوی عصاره خام سیر

پس ازتاثیر رقت‌های تهیه شده از فراکشن‌های مختلف بر روی درماتوفیت‌های مختلف، نتایج نشان می‌دهد که F_{10} می‌تواند با تمامی رقت‌ها رشد میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم، تریکوفیتون تونسورانس، تریکوفیتون روبروم را کاملا متوقف کند و برای درماتوفیت میکروسپورم جیپسئوم MIC معادل ۱/۴ و برای درماتوفیت تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال MIC معادل ۱/۲ و درماتوفیت تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس به همه رقت‌ها مقاومت نشان داد. به عنوان مثال نتایج حاصل از تاثیر فراکشن F_{10} بر روی رشد درماتوفیت‌ها در جدول ۴ آمده است.

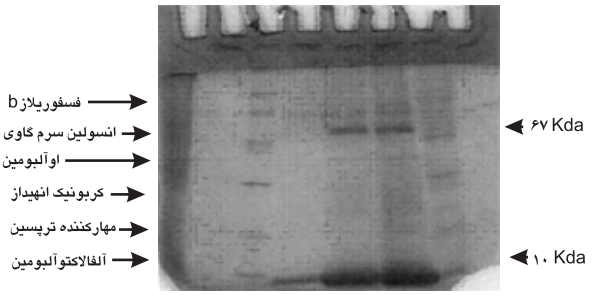
با انجام روش برادفورد و SDS-PAGE و رنگ آمیزی نقره، F_{10} غیر پروتیینی نشان داده شد. نتایج اندازه‌گیری پروتیین با روش برادفورد نشان می‌دهد F_{10} پروتیینی معادل ۰/۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارد که از حیطه جذب دستگاه خارج است و مقدار آن به خاطر کم بودن قابل اغماض است.

در روش SDS-PAGE پس از آماده‌سازی ژل، یک حجم بافر نمونه (۵X) را به ۴ حجم نمونه پروتیین اضافه و پس از ۳ تا ۱۰ دقیقه جوشاندن، به وسیله سمپلر هامیلتون ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه به‌دقت در چاهک‌ها ریخته شد. به دلیل اینکه نمونه‌های کل عصاره، R_{100} و R_{300} غلظت بسیار بالایی از پروتیین دارند، بهتر است پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، نمونه‌ها را با رقت ۰/۱ رقیق کنیم. برای کسب پاسخ بهتر از عمل الکتروفورز ژل‌ها با درصدهای مختلف ۱۰درصد، ۱۵درصد و ۱۷/۵درصد تهیه شد، که ژل ۱۵درصد و سپس ۱۷/۵درصد نتایج بهتری را نشان داد. هرچه درصد ژل بالاتر برود، توانایی ژل در جداسازی مولکول‌های پروتیین با وزن مولکولی پایین‌تر بهتر است.

باتوجه به شکل ۳ که نمایانگر باندهای پروتیین موجود در همه فراکشن‌ها به جز فراکشن F_{10} است، عدم پروتیینی بودن فراکشن F_{10} به وضوح دیده می‌شود. همچنین ۲ باند پروتیینی اصلی در همه فراکشن‌ها دیده می‌شود که در مقایسه با نمونه استاندارد وزن مولکولی معادل ۶۷ و ۱۰ تا ۱۱ کیلو دالتون دارند.

جدول ۴: نتایج حاصل از تاثیر فراکشن F_{10} بر روی رشد درماتوفیت‌ها

F_{10}	رقت‌های تهیه شده از فراکش F_{10}														رقت تهیه شده از گریزئوفولوین				کنترل
نوع درماتوفیت	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	
	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۶۰۰	۳۲۰۰	۳۲۰۰	۱	۲	۳	۴	
میکروسپوروم جیپسئوم	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+
میکروسپوروم کانیس	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
اپیدرموفیتون فلوکوزوم	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
تریکوفیتون تونسورانس	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
تریکوفیتون روبروم	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
تریکوفیتون مننتاگرومایتیس واریته منتاگروفایتیس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+

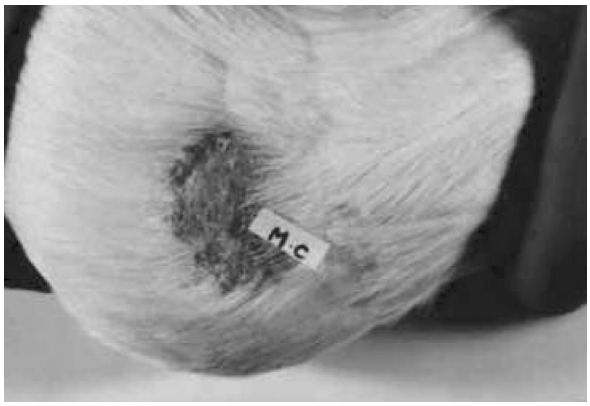


شکل ۳: SDS-PAGE با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو R-25
نمونه‌ها به‌ترتیب از راست به چپ: R_{300}، R_{100}، R_{50}، R_{30}، استاندارد و F_{10}
وزن مولکولی‌مارکرهای تهیه شده از شرکت فارماسیا بر حسب کیلودالتون به ترتیب از بالا به پایین عبارتند از: ۹۴، ۶۷، ۴۳، ۳۰، ۲۰، ۱۴/۴

برای اطمینان از پروتیینی نبودن F_{10}، رنگ‌آمیزی نیترات نقره نیز بر روی ژل انجام شد. نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است و فراکشن F_{10} در مقایسه با نمونه استاندارد حائز هیچ‌گونه باند پروتیینی نیست و این مطلب اهمیت استفاده از فراکشن F_{10} به عنوان ترکیبات ضد درماتوفیتی را مطرح می‌سازد.

شکل ۴: رنگ‌آمیزی نیترات نقره
نمونه‌ها به‌ترتیب از راست به چپ: استاندارد، F_{10}

پس از بررسی اثر پماد ۲۰درصد فراکشن F_{10} سیر بر روی خوکچه هندی نتایج نشان داد که ۹۰درصد تشابه بین نتایج در شرایط آزمایشگاهی با نتایج آزمایشات بر روی مدل حیوانی وجود دارد. به طوری که پس از ایجاد آلودگی تجربی برروی خوکچه‌ها با درماتوفیت‌ها، به مدت ۲ تا ۳ هفته سطح ضایعات ناشی از درماتوفیت‌ها به طور روزانه با پماد F_{10} آغشته شد و پس از ۲ تا ۳ هفته در تمامی گونه‌ها که عبارتند از میکروسپوروم کانیس، تریکوفیتون روبروم، تریکوفیتون تونسورانس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم و تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال بهبودی مشاهده شد. در مواردی مانند اپیدرموفیتون فلوکوزوم حتی رویش مجدد دیده شد و در مورد تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس از شدت و قطر ضایعات پس از ۲۱ روز کاسته شده بود. اما بهبود کامل مشاهده نشد. میکرسپوروم جیپسئوم نیز نتوانست درماتوفیتوز تجربی را در خوکچه هندی ایجاد کند. عمدتا در مورد پماد عصاره سیر، بعد از دو هفته نخست درمان، علایم بالینی کاملا برطرف شد و اثری از شوره و کبره‌ها دیده نشد. به نظر می‌رسد برطرف شدن علایم بالینی در اثر مصرف پایه پماد در مدت ۴ تا ۵ هفته بر روی بعضی از حیوانات گروه کنترل منفی دیده شده است. باتوجه به ویژگی‌های پماد که یک ترکیب محلول در آب است احتمالا مرطوب نگهداشتن پوست و ممانعت از خشک‌شدن آن موجب برطرف شدن علایم بالینی بوده است. در شکل ۵ خوکچه مبتلا به کچلی تجربی با میکروسپوروم کانیس در مقایسه با شکل ۶ خوکچه تحت درمان با پماد فراکشن F_{10} پس از اتمام دوره درمان قرار گرفته است.



شکل ۵: خوکچه مبتلا به کچلی (میکروسپوروم کانیس)
(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

شکل ۶: بهبود خوکچه مبتلا به کچلی (میکروسپوروم کانیس)
(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

جدول ۵: نمایش قطر ضایعات تجربی ایجاد شده در طول دوره درمان با عصاره سیر F_{10} بر حسب میلی‌متر

درمان (روز) / نوع درماتوفیت	زمان	۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
میکروسپوروم کانیس		**	**	*	*	*	۶	۷	۷/۵	۸	۹	۵/۱۱	۱۳	۱۴	۱۴	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
تریکوفیتون روبروم		**	**	*	۴/۵	۵	۵/۵	۶	۷	۸	۱۰	۹/۵	۱۰	۱۱	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۲	۱۲
تریکوفیتون تونسورانس		**	**	*	۷	۸	۹	۹	۱۰	۱۱	۱۲/۵	۱۳	۱۴/۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۶	۱۶	۱۶
اپیدرموفیتون فلوکوزوم		*	*	*	۵/۵	۶	۶	۶/۵	۷	۸	۹	۱۰	۱۰/۵	۱۱	۱۱	۱۲	۱۲/۵	۱۳	۱/۵ ۳
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس		۱۰	۱۰	۱۰/۵	۱۱	۱۱	۱۱/۵	۱۱/۶	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال		۹/۵	۱۰	۱۰	۱۰/۵	۱۰/۵	۱۱	۱۱	۱۲	۱۲	۱۲	۱۳	۱۳	۱۳	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴

** حاشیه نامشخص، * بهبود کامل

جدول ۶: اثر گریزئوفولوین بر روی رشد درماتوفیت‌ها

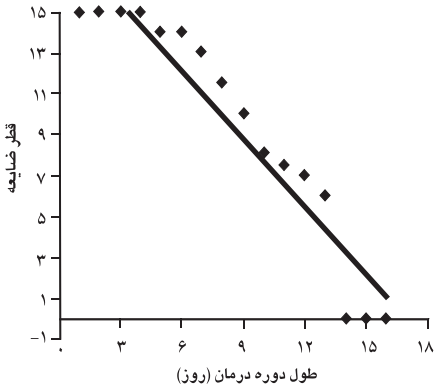
زمان درمان / نوع در ماتوفیت	۲۳	۲۲	۲۱	۲۰	۱۹	۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
میکروسپوروم کانیس	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴
تریکوفیتون روبروم	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴
تریکوفیتون تونسورانس	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
اپیدرموفیتون فلوکوزوم	*	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴

* رویش مو، ۱: بهبود کامل، ۲: بهبود، ۳: زخم پوسته پوسته شونده، ۴: ضایعات ملتهب و حاشیه‌دار

چنانچه مشاهده می‌شود، ضایعات حاصل از میکروسپورم کانیس، تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون ترنسورنس حدودا پس از ۲ هفته از شروع درمان با پماد سیر بهبود یافته است و حتی رویش مو نیز در روزهای بعد دیده می‌شود. ولی ضایعات ناشی از دو واریته تریکوفیتون منتاگروفایتیس پس از ۱۸ روز بهبودی نسبی پیدا کرده‌اند. در مورد اپیدرموفیتون فلوکوزوم بعد از ۱۴ روز بهبود کامل مشاهده شد ولی رویش مو مشاهده نشد.

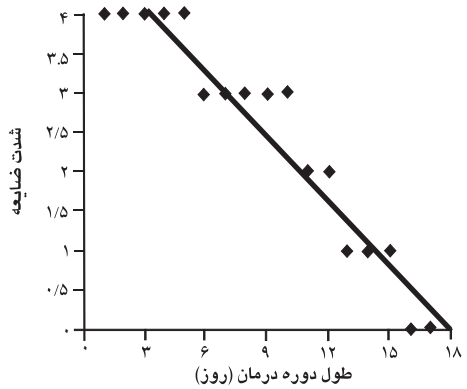
برای اطمینان از بهبود بیماران در صورت استفاده از یک داروی موثر گروهی از گریزئوفولوین استفاده شد. به‌طوری که باتوجه به وزن خوکچه‌ها، ۹ میلی‌لیتر از محلول گریزئوفولوین با سرنگ به خوکچه‌های مورد نظر به عنوان شاهد مثبت روزانه یک‌بار خورانده شد. در مقابل روزانه یک‌بار نیز پماد حاوی فراکشن سیر روی محل ضایعه خوکچه‌های مورد آزمایش قرار داده شد. زمان درمان برای گریزئوفولوین ۳ تا ۴ هفته و برای عصاره سیر ۱۸ روز به دست آمد. نتایج در جدول‌های ۵ و ۶ مطرح شده است.

با توجه به تست همبستگی ارتباط معکوس معنی‌داری بین قطر ضایعات تجربی ایجاد شده در مدل حیوانی با طول دوره درمان به وضوح دیده شد. همچنین با انجام این تست می‌توان ارتباط معنی‌دار و معکوسی بین شدت ضایعه و طول دوره درمان مشاهده کرد ($p< ۰/۰۱$) به طوری که هرچه زمان درمان افزایش می‌یابد از شدت ضایعه کاسته می‌شود. به عنوان نمونه در نمودار های ۱ و ۲ به ترتیب ارتباط معنی دار معکوسی ($p<۰/۰۱$) بین قطر ضایعه و طول دوره درمان با پماد فراکشن F_{10} عصاره سیر و شدت ضایعه و طول دوره درمان با پماد فراکشن F_{10} در میکروسپوروم کانیس مشاهده شد.



r=-0.976, p<0.01

نمودار ۱: رابطه معنی دار (p<۰/۰۱) بین قطر ضایعه و طول دوره درمان با پماد فراکشن F_{10} در میکروسپوروم کانیس



r=-0.976, p<0.01

نمودار۲: رابطه معنی‌دار (p<۰/۰۱) بین شدت ضایعه و طول دوره درمان با پماد فراکشن F_{10} در میکروسپوروم کانیس

بحث

بیماری کچلی از عفونت‌های شایع پوست و ضمایم آن است که بخش مهمی از بیماری‌های پوستی را به خود اختصاص می‌دهند. عامل مولد این عفونت ها قارچ‌های درماتوفیتی هستند که برای درمان آنها داروهای ضد درماتوفیتی استفاده می‌شود. تعداد داروهای ضد درماتوفیتی بسیار محدود است.

اگر چه در چند دهه اخیر گریزئوفولوین موجب بروز تحولاتی در درمان بیماری کچلی شده است ولی پژوهشگران هنوز در جستجوی داروهای ثمربخش و ایده‌آلی هستند که کلیه ویژگی‌های لازم از نظر فقدان اثرات جانبی، طیف و اثر درمانی وسیع، کوتاه بودن دوره درمان دارا باشند.

البته ارائه داروهای مناسب برای عفونت‌های درماتوفیتی با انتشار گونه‌های مولد بیماری چندان بی‌ارتباط نیست. برخی از گونه‌ها تنها به یک منطقه خاص محدود شده و در نقاط دیگر جهان دیده نمی‌شود و حداقل انتشار بسیار گسترده‌ای ندارند و به علاوه گونه‌هایی که انتشار فراگیر دارند نیز در مناطق و کشورهای مشخص بارز هستند. این ویژگی، استفاده از داروهای اختصاصی در مناطق مختلف را مطرح می کند و ازاین نظر گیاهان دارویی بومی می‌توانند، نقش ارزنده‌ای داشته باشند. سیر گیاه دارویی ارزنده‌ای است که به صورت بومی می‌تواند در درمان عوامل درماتوفیتی مورد استفاده قرار گیرد. پماد سیر منشاء طبیعی گیاهی دارد و عوارض جانبی آن محدود و بسیار کمتر از داروهای شیمیایی است و چنانچه در مورد گریزئوفولوین می‌بینیم ۵۵ درصد از بیماران در ابتدای درمان سردرد دارند و بعضی از بیماران علایم گاسترو اینتستینال، تهوع، استفراغ و اسهال شکایت دارند. گاهی نیز علایم نورولوژیک شامل نوریت لتارژی، اختلال مغزی، سنکوپ، سرگیجه، تاربینی و ادم ماکولر چشم وجود دارد. سایر علایم جانبی نادر شامل استوماتیت، آلبومینوری و نارسایی کلیوی است (۱۳). لذا امروزه قشر زیادی از مردم تمایل بیشتری به استفاده از سیر پیدا کرده‌اند. همچنین با توجه به اینکه سیر به صورت پماد مورد مصرف قرار می گیرد، می‌تواند بهترین جایگزین برای قرص گریزئوفولوین باشد. یکی از مشکلات مصرف پماد سیر در نظر بیماران بوی بد آن است، که ابتد پس از تماس این پماد با پوست، کمی بو دارد ولی مدت کوتاهی پس از مصرف، این بو از بین می‌رود. در این مطالعه مشخص شد موثرترین فراکشن دردرمان کچلی فراکشن F_{10} است. همچنین تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال و میکروسپوروم جیپسئوم نسبت به فراکشن F_{10} حساسیت نشان داده‌اند و به ترتیب MIC معادل ۱۲ و ۱۴ داشته‌اند. همچنین میکروپسوروم کانیس، تریکوفیتون روبروم، تریکوفیتون تونسورانس و اپیدرموفیتون فلوکوزم تقریبا به همه فراکشن‌های جدا شده از عصاره خام سیر حساسیت نشان دادند، به طوری که در حضور تمامی رقت‌های F_{10} رشدشان مهار شد. نتایج نشان می‌دهد این درماتوفیت‌های حساس در حضور یکی از رقت‌های ساخته شده از فراکشن‌های R_{300} تا R_{10} عصاره خام سیر رشدشان متوقف می‌شود و در واقع MIC خاصی از خود نشان داده‌اند، اما در مورد F_{10}، حساسیت این قارچ‌ها نسبت به این فراکشن به قدری زیاد است که رشدشان حتی در کمترین رقت (۱:۳۲۰۰) متوقف می‌شود. این امر نشان می‌دهد که میزان ترکیبات ضد درماتوفیتی موجود در سیر، غلظت بالاتری در F_{10} دارند که منجر به عدم رشد درماتوفیت‌ها در همه رقت‌ها می‌شوند و باتوجه به اینکه وزن مولکولی مولکول‌های موجود در این فراکشن کمتر از ۱۰ کیلو دالتون است و موثرترین ترکیبات ضد درماتوفیتی موجود در سیر نیز وزنی کمتر از ۱۰ کیلودالتون دارند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که موثرترین فراکشن موجود از میان فراکشن‌های مورد بررسی، فراکشن F_{10} است. بنابراین می‌توان از این فراکشن در تهیه پماد، جهت درمان ضایعات درماتوفیتی استفاده کرد.

همچنین می‌توان گفت موثرترین ترکیبات ضد درماتوفیتی سیر ترکیباتی غیر پروتیینی و احتمالا همان ترکیبات آلی سولفوردار یا ارگانولوسولفورها از جمله آلیسین است که وزنی کمتر از ۱۰ کیلودالتون دارد و در فراکشن F_{10} تجمع پیدا کرده است. همچنین آلیل سولفیدها و ترکیبات معدنی مانند سلنیوم نیز می‌توانند در این گروه از ترکیبات قرار بگیرند.

نتیجه تجارب به دست آمده از ایجاد بیماری تجربی در

خوکچه‌هندی نشان داد که در ۱۰ درصد موارد نتیجه به دست آمده از دو روش کشت نمونه‌ها در محیط SCC و مشاهده میکروسکوپی با یکدیگر مطابقت ندارد. به همین جهت لازم است که در این گونه بررسی‌ها تعیین قطعی ابتلای حیوان، به روش‌های مختلف مورد آزمایش قرار گیرد.

از میان حیوانات گروه شاهد که تحت هیچ تیماری قرار نداشتند فقط یک مورد ۵۰ درصد علایم بالینی خود را از دست داده بود. زمان درمان خوکچه‌ها با پماد عصاره سیر، با زمان درمان خوکچه‌ها با گریزئوفولوین مشابه و ۳ تا ۴ هفته در نظر گرفته شد که در مورد پماد عصاره سیر می‌توان گفت خوکچه‌های تحت درمان، ظرف مدت ۲ هفته بهبود پیدا کردند و در پایان هفته سوم در بعضی موارد حتی رویش مو در آنها دیده شد. در صورتی که خوکچه‌های تحت درمان با گریزئوفولوین در پایان هفته سوم بهبود نشان دادند و رویش مو دیده نشد. در هرحال اثر درمانی پماد حاوی فراکشن F_{10} انکار ناپذیر و این پماد حیوانات مبتلا به کچلی را بهبود بخشیده است. قبل از درمان با پماد عصاره سیر علایم بیماری به صورت سرخی پوست، ریزش موها در محل ضایعه، کبره، شوره و وزیکول‌های خشک و قرمز در سطح پوست دیده می‌شود؛ اما پس از درمان کلیه این علایم برطرف شده و پوست شکل طبیعی خود را باز می‌یابد. به علاوه این فرضیه که ارگانوسولفورهای موجود در فراکشن F_{10} سیر می‌تواند کلاژن پوست را تحریک کند و موی سالم شروع به رویش کند از نظر فارماکولوژی حایز اهمیت است.

نتایج به دست آمده در آزمایشگاه و بر روی مدل حیوانی تقریبا با هم مشابه است و نشان می‌دهد که فراکشن F_{10} جدا شده از عصاره سیر اثرات درمانی انکارناپذیر دارد و می‌توان آن را به عنوان یک ترکیب موثر در درمان بیماری‌های کچلی پیشنهاد نمود. با بررسی‌های دیگر بر روی تعداد بیشتری از حیوانات و به کار گیری روش‌هایی نظیر اسلاید کالچر بر روی پوست انسان و درمان زخم‌های ناشی از درماتوفیت‌ها برروی پوست انسان، می‌توان با قاطعیت ترکیب موثره عصاره آبی‌سیر را به عنوان یک داروی موثر ضدقارچ عرضه کرد. اثر ضدقارچی عصاره آبی سیر را می‌توان به قدرت ضد درماتوفیتی مولکول‌های کمتر از ۱۰کیلو دالتون آن از جمله آلیسین موجود در آن نسبت داد. همچنین شاید بتوان رشد تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس را با تغلیظ فراکشن F_{10} و بالابردن غلظت ترکیبات ضددرماتوفیتی آن مهار کرد. مساله دیگر کاهش طول دوره درمان با پماد فراکشن F_{10} در مقایسه با داروهای موجود در بازار از جمله گریزئوفولوین است. در این مطالعه نشان داده شد که طول دوره درمان بین ۱۴ تا ۲۱ روز است. در حالی که طول دوره درمان کچلی با قرص گریزئوفولوین حداقل ۴ هفته است که این مسئله ارجح بودن استفاده از پماد فراکشن F_{10} را اثبات می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان با قاطعیت پماد عصاره آبی سیر را به عنوان یک داروی ضد درماتوفیتی موثر در درمان کچلی ها به بازار عرضه کرد.

نتایج به دست آمده از این پژوهش، در مقایسه با کارهای مشابهی که در دنیا انجام گرفته تقریبا مشابه است. به طوری که دانشمندی به نام تانسی نیز اثر ضد قارچی عصاره خام را بر روی قارچ‌های درماتوفیت مورد بررسی قرار داد و مشاهده کرد که رشد درماتوفیت‌های اپیدرموفیتون فلوکوزوم و تریکوفیتون روبروم در حضور عصاره سیر متوقف می‌شود. در حالی که میکروسپوروم جیسپئوم به عصاره خام سیر مقاومت نشان می‌دهد و این نتایج مشابه با نتایج به دست آمده در این تحقیق است (۱۴).

همچنین دانشمندی به نام یوشیدا از عصاره خام سیر فراکشن‌های عصاره آبی‌سیر، آهوئن، روغن سیر، اسانس سیر را جداسازی و اثرات هر کدام را بر روی رشد قارچ‌ها بررسی کرد. ولی این تحقیق وزن مولکولی فراکشن‌های مختلف را مشخص نکرد (۳).

دانشمندی به نام آپلتون نیز توانست رشد تریکوفیتون منتاگروفایتیس را در حضور عصاره خام سیر متوقف کند. در صورتی که در پژوهش انجام شده، رشد تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته منتاگروفایتیس، متوقف نمی‌شود (۱۵).

می‌توان این امر را چنین توجیه کرد که به علت تغییر در نوع گیاه مورد استفاده و به‌دلیل بومی بودن سیر، گیاه استفاده شده توسط این دانشمند، خواص ضد درماتوفیتی بیشتری را داشته باشد. همچنین در همین سال ونوگوپال و همکارش، فعالیت ضدقارچی سیر را بر ضد ۸۸ سویه کلینیکی درماتوفیت با تکنیک تهیه رقت در آگار مورد بررسی قرار دادند. این درماتوفیت‌ها عبارت بودند از میکروسپورم کانیس، تریکوفیتون روبروم، میکروسپوروم ادوئینی، تریکوفیتون‌منتاگروفایتیس، تریکو فیتون ویولاسئوم، تریکو فیتون سیمئی، تریکو فیتون وروکوزوم و تریکو فیتون اریناسئی و اپیدرموفیتون فلوکوزوم که عصاره آبی سیر با رقت ۱۱۵۰ و ۱۱۰۰، ۵۰ و ۹۰درصد ایزوله‌های تست شده را متوقف کرد (۲) که در اصل روش آزمایشگاهی این تحقیق بر مبنای این مرجع انجام شده ولی تعیین نوع فراکشن با وزن مولکولی خاص برای اولین بار در دنیا در این پروژه انجام شده است.

نتیجه‌گیری

دیدگاه‌های جدید و دورنمای این تحقیق را می‌توان به صورت زیر مطرح کرد:

۱. باتوجه به اینکه طول دوره درمان با سیر کمتر از داروهای ضدکچلی موجود در بازار است، همچنین باتوجه به‌اینکه سیر یک گیاه دارویی بومی است، پیشنهاد می‌شود از آن پمادی تهیه و روی جمعیتی از افراد مبتلا به درماتوفیتوز، با تشخیص عوامل درماتوفیتی، آزمایش شود.

۲. ترکیبات موجود در F_{10} آنالیز و به طور مشخص ترکیبات ضددرماتوفیتی سیر شناسایی و تغلیظ شود و تاثیر ماده حاصل بر روی درماتوفیت‌های مقاوم به فراکشن F_{10} مورد آزمایش قرار گیرد.

۳. با تخلیص آلیسین که مهم‌ترین ترکیب ضددرماتوفیتی سیر معرفی شده است، می‌توان مکانیسم مهار رشد درماتوفیت‌ها را مشخص کرد.

۴. باتوجه به اینکه سیر یک گیاه بومی در ایران است، می‌توان اثرات ضددرماتوفیتی انواع سیر موجود در مناطق مختلف ایران را باهم مقایسه کرد.

References

1. Mantis AJ: Effect of garlic extract on food poisoning bacteria,Lebensm wiss u technol,1979; 2(6): 330-332
2. Venugopal P, venugopal T: Antidermatopytic activity of garlic (Allium sativum) invitro. Inter J Dermatol,1995; 34(4): 278-279
3. Yashida S: Antifungal activity of ajoene derived from garlic, Appl. Environ Micrabiol, 1987; (53): 615-617
4. Yamada Y, Azuma K: Evalution of the In vitro antifungal activity of Allicin, Antimicrob Agents Chemother, 1977; 11(4): 743-749
5. Guon L: Demonstration of the anti-viral activity of garlic extract against human cytomegalovirus invitro. Clin Med Engl, 1993; 106(2): 93-96
6. Appleton J, Tansey M: Inhibition of growth of zoopathogenic fungi by garlic extract. Mycol 1975; 67: 882-885
7. Lun Z: Antiparasitic activity of dially trisulfide on human and animal pathogenic protozoa (Trypanosoma sp., Entamoba histolyrica and Giardia Lambia) invitro Ann. Soc Belg Med Trop, 1994; 74(1): 51-59
8. Rioppon JW: Medical Mycology the pathogenic fungi and Actinomycetes second edition,1982; 208-249
9. Moore G, Atkins R: The fungicidal and effects of an aqueoud garlic extract on medically important yeast- like fungi Mycol, 1997; 69: 334-341
10. Singh U,Panthak K, Khare M, Singh R: Effect of leaf extract of garlic on Fusarium oxysporum F sp Ciceri, Sclorotierum and gram seede. Mycol 2001; 71: 556-5564
11. Tansey M: Inhibition on fungal growth by garlic extract Mycologia, 1975; 67: 409-413
12. Parsad G: Efficacy of garlic therapy against expermental dermatophytosis in rabbits .Indian J Med Res, 1999; 75: 465-467
13. Hildick-Smith G: Antifungal antibiotics. Pediatrics clin North Am, 1968; 15: 107-118
14. Tansey M: Inhibition of fungal growth by garlic extract Mycologia, 1975; 13-17
15. Appleton J, Tansey M: Inhibition of growth of zoopathogenic fungi by garlic extract., Mycol 1975; 67: 882-555