Journal of Military Medicine
2017, Volume 19, Issue 5
Pages: 505-512

Study of Aqueous and Alcoholic Extract of the Melissa Officinalis Effect on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*

Jamileh Bigom Taheri[1,2], Maryam Iman[3]*, Masomeh Mehdipour[2], Sedigheh Bakhtiari[2], Fatemeh Namazi[4], Milad Teheri Bayan[1,2], Neda Zeinali[5]

[1] Preventative Dentistry Research Center, Research Institute of Dental Sciences, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Chemical Injuries Research Center, System Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Department of Nuclear Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran
[4] Pharmaceutical Biotechnology Department, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: 1 November 2016 **Accepted**: 7 December 2017

Abstract

Background and Aim: Fungal infections, especially candida species, are the most common opportunistic fungal infections and the treatments with chemical drugs have many side effects. Melissa Officinalis has antimicrobial effects that has caused it to be considered in many microbial treatments. In this study, it has been tried to compare this herbal efficacy on *Candida Albicans*, *Candida Glabrata* and *Candida Krusei*.

Methods: Aqueous and ethanol extracts of Melissa Officinalis was obtained by drench method. The diameter of non- growing zone of *Candida Albicans*, *Candida Glabrata* and *Candida Krusei* was estimated by the micro dilution method.

Results: The mean diameter of the non-growing zone related to the extracts on *Candida Albicans* was 17.83 mm (versing 5.75 mm of aqueous extracts) and the mean diameter of the non-growing zone related to aqueous extracts on *Candida Glabrata* and *Candida Krusei* were 15.5 and 13.66 mm respectively (versing 10 and 7mm of ethanolic extracts).

Conclusion: All extracts had an effect on non- growing fungal zone, however ethanolic extract of *Candida Albicans* and aqueous extract of *Candida Krusei* were more effective rather than the others. Also, there was no difference between the effect of Aqueous and ethanolic extracts in *Candida Glabrata*.

Keywords: Melissa Officinalis, *Candida Albicans*, *Candida Glabrata*, *Candida Krusei*, Oral infection

*Corresponding author: **Maryam Iman**, Email: iman1359@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۱۹، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۶
صفحات: ۵۱۲-۵۰۵

بررسی اثر ضدقارچی عصاره های آبی و الکلی گیاه بادرنجبویه روی *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزویی*

جمیله بیگم طاهری[۲،۱]، مریم ایمان[۳*]، معصومه مهدیپور[۲]، صدیقه بختیاری[۲]، فاطمه نمازی[۴]، میلاد طاهری بیان[۲،۱]، ندا زینلی[۵]

[۱] مرکز تحقیقات پیشگیری دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی، موسسه سیستم بیولوژی و مسمومیت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
[۴] گروه پزشکی هسته ای، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۵] گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: عفونت های قارچی خصوصا گونه های کاندیدا شایعترین عفونت های فرصت طلب می باشند و درمان با داروهای شیمیایی دارای عوارض بسیاری است. امروزه گیاه بادرنجبویه (*Melissa Officinalis*) به لحاظ دارا بودن خواص ضدمیکروبی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این بررسی مقایسه اثر بخشی این گیاه بر روی گونه های *کاندیدا آلبیکنس*، *گلابراتا* و *کروزوئی* میباشد.

روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، عصاره های آبی و اتانولی بادرنجبویه با روش خیساندن تهیه شدند. قطر هاله عدم رشد قارچ ها *کاندیدا آلبیکنس*، *گلابراتا* و *کروزوئی* با استفاده از روش میکرودایلیشن محاسبه گردید.

یافته‌ها: میانگین قطر هاله عدم رشد در اثر عصاره الکلی بر روی گونه *کاندیدا آلبیکنس* ۱۷/۸۳ میلی متر (در مقابل ۵/۷۵ میلی متر عصاره آبی) و میانگین قطر هاله عدم رشد در اثر عصاره آبی بر روی گونه *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزوئی* به ترتیب ۱۵/۵ و ۱۰ میلی متر (در مقابل ۱۳/۶۶ و ۷ میلی متر گونه الکلی) بود.

نتیجه‌گیری: تمامی عصاره ها تاثیری بر ایجاد هاله عدم رشد قارچی داشتند اما درمورد *کاندیدا آلبیکنس* عصاره الکلی و در مورد *کاندیدا کروزوئی* عصاره آبی موثرتر بود و تفاوتی میان تاثیر عصاره آبی و الکلی روی *کاندیدا گلابراتا* وجود نداشت.

کلیدواژه‌ها: بادرنجبویه، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزوئی، عفونت دهان و دندان.

*نویسنده مسئول: **مریم ایمان**. پست الکترونیک: iman1359@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۱۵

مقدمه

نیروهای نظامی به علت اسکان در آسایشگاه های عمومی و عدم وجود امکانات کافی بهداشتی در معرض خطر ابتلا به عفونت های فرصت طلب، خصوصاً عفونت های قارچی هستند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ بر روی سربازان آمریکایی جنگ افغانستان و عراق صورت پذیرفت، نشان داده شد گروهی که در معرض عفونت های کاندیدایی قرار گرفته بودند با خطر مرگ بالاتری مواجه بودند (۱و ۲).

حفره دهانی جایگاه میکروارگانیسم های متفاوتی می باشد به طوری که تاکنون صدها نوع میکروب در دهان افراد شناسایی شده است (۳). امروزه ثابت شده که حفره دهانی حتی می تواند به عنوان یک جایگاه اولیه برای انتشار میکروارگانیسم ها به سایر نقاط بدن عمل کرده و باعث ایجاد بیماری در قلب، ریه و سایر ارگان های بدن شود (۴). در حفره دهانی، حدود ۴۰۰-۳۰۰ گونه مختلف میکروارگانیسم و از جمله ۲۰ گونه کاندیدا میتواند وجود داشته باشد (۵).

کاندیدیازیس یک بیماری مهم و شایع قارچی مخاط دهان است که توسط گونه های مختلف کاندیدا ایجاد می شود. برفک شایع ترین شکل کاندیدیازیس است که با افزایش رشد و تکثیر گونه های مختلف کاندیدا نظیر کاندیدا آلبیکنس در دهان آغاز می شود (۶).

اهمیت گونه های غیرآلبیکنس در سالهای اخیر به واسطه بروز مقاومت نسبی در بعضی از این گونه ها نظیر کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا نسبت به برخی از داروهای ضدقارچی زیادتر شده است (۷).

در این بین بعد از *کاندیدا آلبیکنس*، گونه *کاندیدا گلابراتا* است، بیشترین عامل بروز عفونت شناخته شده است که به دلیل دارا بودن فرم مقاوم به درمان نسبت به بسیاری از ترکیبات آزولها خصوصا فلوکونازول سریعا مقاوم می گردد (۸).

کاندیداکروزئی نیز به عنوان قارچ پاتوژن بیمارستانی در حال ظهور است که در درجه اول در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و کسانی که مبتلا به سرطان خون می باشند یافت می شود (۹).

برای درمان عفونت کاندیدایی بسته به وسعت ضایعه و وضعیت بیمار از درمانهای موضعی یا سیستمیک استفاده می شود. داروی موضعی که به عنوان استاندارد استفاده می گردد دهان شویه نیستاتین می باشد طعم تلخ دهان شویه نیستاتین و مصرف مکرر به صورت چهار بار در روز و همچنین آماده سازی مکرر در طی دوره مصرف آن منجر به عدم رضایت بیماران می شود، از این رو وجود دهان شویه ای با طعم مناسب و روش مصرف ساده تر و اثر مناسب ضروری به نظر می رسد (۱۰).

گیاه بادرنجبویه (*Melissa Officinalis L.*) گیاهی است معطر و علفی چندساله، خاستگاه اصلی آن شرق مدیترانه‌است و در بعضی از نقاط آذربایجان و جلگه خزر نیز یافت می‌شود. نام علمی این گیاه (Melissa) از واژه‌ای یونانی به معنای زنبور گرفته شده است (۱۱). این گیاه از راسته لب‌گلی‌ها (Lamiales) و تیره نعناعیان (Lamiaceaes) است. بادرنجبویه در طب سنتی ایران به عنوان تسکین دهنده، تب بر، ضداسپاسم، ضدتشنج، معرق، خوشبوکننده، بادشکن (ضدنفخ) کاربرد دارد. همچنین از این گیاه در درمان بی خوابی و اختلالات خواب، اضطراب، افسردگی، بیماری های عصبی، میگرن، حالت تموع، ناراحتی عصبی معده، کم اشتمایی، کولیک (قولنج)، سرفه، قاعدگی نامنظم، دندان درد و لرزش های عصبی استفاده می شود. بادرنجبویه گیاهی است که از پوسیدگی دندان جلوگیری می کنند و جهت خوشبو کردن و ضدعفونی نمودن دهان به کار می رود. از طرفی در متون طب جدید از اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی این گیاهان سخن به میان آمده است (۱۱-۱۵).

کاندیدیازیس یک بیماری مهم و شایع قارچی مخاط دهان است که توسط گونه های مختلف کاندیدا ایجاد می شود. مطالعاتی که در دهه اخیر انجام شده است به وضوح نشان دهنده اثرات ناخوشایند داروهای شیمیایی در کنار اثرات مفید آنها می باشد. به خاطر افزایش مقاومت دارویی نسبت به داروهای شیمیایی جدید، مطالعات اخیر توجه بیشتری به استفاده از گیاهان دارویی کرده است. در این مطالعه از گیاه بادرنجبویه با اثرات ضد پوسیدگی دندان و خوشبو و ضدعفونی کننده دهان و دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی شناخته شده استفاده گردید.

روش‌ها

نوع مطالعه

پژوهش حاضر به روش آزمایشگاهی انجام شد.

سوش استاندارد قارچ

نمونه های مورد مطالعه شامل گونه های استاندارد (Persian Type Culture Collection) (PTCC: *کاندیدا آلبیکنس* (5027)، *کاندیدا گلابراتا* (PTCC:5295) و *کاندیدا کروزویی* (PTCC:5297) بود که همگی از کلکسیون سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

جمع آوری و شناسایی بادرنجبویه

نمونه های گیاه بادرنجبویه جمع آوری شده از ناحیه قم که توسط هرباریوم دانشگاه شهیدبهشتی تایید شده است.

تهیه عصاره های آبی بادرنجبویه به روش خیساندن

برای این کار از پودر تهیه شده گیاه بادرنجبویه به روش سوکسیله با استفاده از آب عصاره تهیه شد و در مرحله بعد حلال حذف شده و سپس خشک شد.

تهیه عصاره های الکلی بادرنجبویه به روش خیساندن

در این روش از یک ظرف دهانه گشاد استفاده گردید. بادرنجبویه به صورت پودر یا خرد شده داخل ظرف ریخته شده و به آن اتانول ۸۰ درصد و متانول۸۰ اضافه شده تا حدی که حلال

کل پودر را بپوشاند و مقداری نیز روی پودر قرار گیرد و به گیاه فرصتی داده شد تا سلول‌ها و دیواره‌اش نرم شوند و حلال وارد سلول‌ها شده و مواد موثره داخل آن‌ها حل شود. پس از ۴ روز محلول صاف گردید.

تهیه محیط کشت (Mueller Hinton broth)

۲/۱ گرم پودر محیط کشت مولر هینتون بروث را به ۱۰۰ سی سی آب مقطر و یا آب بدون یون اضافه کرده و تا حل شدن کامل، محیط حرارت داده شد. سپس در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه استریل شد و بعد از سردشدن در چاهک میکروپلیت و پلیت ها و ظروف مخصوص استریل ریخته شد.

تهیه محیط کشت Mueller Hinton agar

۳/۴ گرم پودر محیط کشت مولر هینتون آگار را به ۱۰۰ سی سی آب مقطر و یا آب بدون یون اضافه کرده و تا حل شدن کامل، محیط حرارت داده شد. پس از اتوکلاو و کاهش درجه حرارت در پلیت ها تقسیم گردید.

تهیه محیط ۰/۵ مک فارلند

ابتدا از اسید سولفوریک ۹۸٪، اسید سولفوریک ۱٪ تهیه گردید. بدین ترتیب که ۹۹ سی سی آب مقطر، با ۱ سی سی اسید سولفوریک ۹۸٪ مخلوط کرده (دقت شد که به علت گرمازا بودن واکنش۱ گرم اسید به آب اضافه گردد) سپس ۱/۱۷۵ از پودر باریوم کلراید را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شد، بدین ترتیب باریوم کلراید ۱/۱۷۵٪ تهیه گردید.

سپس ۹۹/۵ سی سی از اسیدسولفوریک ۱٪ را با ۰/۵ سی سی باریوم کلراید مخلوط نمودیم و در اثر رسوب باریم سولفات $BaSO_4$کدورتی در لوله ظاهر گشت، که این کدورت همان استاندارد ۰/۵ مک فارلند بوده و سوسپانسیون میکروبی با این کدورت حاوی^{۸}۱۰ ×1/5 cfu/ml سلول بود. این مقایسه چشمی در نور کافی انجام گرفت. سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذب نوری ۰/۱–۰/۰۸ داشت (۱۶).

کشت میکروبی روی محیط های مناسب

ابتدا از کاندیدا های تهیه شده روی محیط کشت مولرهینتون آگار به وسیله آنس استریل کشت داده شد و سپس پلیت را بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد و بعد از ۲۴ ساعت کلونی های کاندیداروی محیط کشت ظاهر شد (۱۷).

تهیه سوسپانسیون قارچی

برای تهیه سوسپانسیون قارچی از کشت های ۲۴ ساعته بر روی محیط مولرهینتون آگار در ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده شد. جهت بدست آوردن سوسپانسیون های یکنواخت یا همگن با نسبت یکسان از غلظت های قارچی، از یک معیار کدورت سنجی به نام استاندارد مک فارلند با درجه ۰/۵ استفاده شد، که معادل ۱۰^{۸} ×1/5 cfu/ml بود.

تهیه سری های رقت از بادرنجبویه

برای تعیین MIC برای عصاره های الکلی و آبی به طور مجزا یک سری ۹ لوله ای برای آزمایش رقت های مختلف هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت که حاوی عصاره رقیق شده و محیط کشت است و کنترل منفی که شامل سوسپانسون میکروبی و محیط کشت می باشد قرار دادیم.

غلظت اولیه عصاره حاوی ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر است که با وارد کردن یک میلی لیتر از عصاره به لوله اول که حاوی یک میلی لیتر محیط کشت است غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست می آید. به این صورت که برای لوله اول یک میلی لیتر از عصاره با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر با یک میلی لیتر محیط کشت دکستروز براث آگار رقیق سازی و به همین ترتیب یک میلی لیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم که حاوی یک میلی لیتر محیط کشت دکستروز براث آگار می باشد انتقال داده و این کار تا آخرین لوله انجام می گیرد. از لوله آخر یک میلی لیتر برداشته و بیرون ریخته شد. با این کار رقت هر لوله نصف رقت لوله قبلی شد. سپس از همه لوله ها به جز لوله حاوی کنترل مثبت به میزان ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی انتقال داده شد. رقت سازی عصاره ها برای هر سه قارچ مورد مطالعه ما به صورت کاملا مجزا انجام شد. سری لوله های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد قارچ بررسی گردیدند. از لوله هایی که در آنها عدم رشد قارچ مشاهده شده بود نمونه برداری و به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره ها به روش سطحی کشت داده شد. بدین منظور ۱۵۰ میکرولیتر از لوله هایی که عدم رشد قارچ را نشان می دادند بر روی محیط کشت دکستروز براث آگار ریخته و پخش شد.

تمامی پلیت های حاوی محیط کشت در داخل انکوباتور قرار گرفتند و پس از مدت زمان ۲۴ ساعت از نظر وجود رشد میکروبی مورد بررسی و کنترل قرار گرفتند. لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوطه عدم رشد قارچ مشاهده گردید به عنوان MFC آن عصاره در نظر گرفته شد.

مجاور ساختن سوسپانسیون های قارچی تهیه شده با رقت های مختلف عصاره

سوسپانسیون قارچی تهیه شده طبق روش استاندارد میکرودیلوشن مندرج در CLSI با نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر رقیق شد و سپس از آن ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به چاهک ها اضافه شد و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در نهایت از سوسپانسیون قارچی به میزان ۱۰^{۴} ×5 cfu/ml در هر چاهک قرار داشت.

بدلیل رنگی بودن عصاره ,کدورت با چشم قابل دیدن نبود، در نتیجه کدورت یا باید با خواندن OD (Optical Density) در دستگاه ELISA Reader قرائت می گردید و یا از هر یک از چاهک ها به کمک آنس استریل در محیط کشت مولر هینتون

اگار کشت داده شده و مجددا محیط ها را در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نموده و پس از ۲۴ ساعت تشکیل یا عدم تشکیل کلونی با دید مستقیم بررسی شد و با پلیت های کنترل مثبت و منفی مقایسه شد. در این مطالعه از روش دوم استفاده شد.

برای کنترل آزمون، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی در نظر گرفته شد، بدین صورت که برای کنترل مثبت از محیط کشت مولرهینتون و کاندیداو برای کنترل منفی از محیط کشت و عصاره استفاده کردیم.

چاهکی که دارای حداقل غلظتی از عصاره است که رشد قارچ را مهار کرده و لذا تعداد کمی کلونی در آن رشد کرده است را به عنوان حداقل غلظت مهاری یا MIC تعریف کردیم و معمولاً در رقت بعدی رشد کامل دیده شد. زمان موثر برای تاثیر حداقل غلظت عصاره بر رشد ۲۴ ساعت است و به همین دلیل زمان ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار (SPSS Inc., Chicago, IL, version 20) استفاده گردید، داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار یا درصد ذکر گردیدند. آزمون های آماری $\chi 2$ و ANOVA از / بر روی داده ها انجام شد و $P < 0.05$ لحاظ آماری اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه اثرات ضدقارچی عصاره های آبی و الکلی بادرنجبویه بر روی رشد سه گونه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا کروزوئی* و *کاندیدا گلابراتا* با روش میکرودایلوشن برای تعیین MIC با ۳ بار تکرار بررسی شد.

نتایج MIC و MFC برای هر یک از عصاره های آبی و الکلی به ترتیب در جدول-۱ و جدول-۲ آمده است. جدول-۱ و جدول-۲ بیانگر حداقل غلظت ضد قارچی و حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره های آبی و الکلی عصاره بادرنجبویه بر روی سه گونه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزوئی* است که نشان می دهد *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا کروزوئی* به ترتیب نسبت به عصاره آبی و الکلی مقاومت نشان داده است.

قطر هاله عدم رشد قارچی درمورد گونه *کاندیدا آلبیکنس* با تاثیر عصاره آبی بادرنجبویه با سه مرتبه تکرار به ترتیب ۴/۵، ۶ و ۶/۷۵ میلی متر و با تاثیر عصاره الکلی بادرنجبویه با سه بار بررسی به ترتیب ۱۶/۵، ۱۸ و ۱۹ میلی متر محاسبه شد (جدول-۳) (نمودار-۱).

همان طور که در جدول - ۳ اشاره شده است، قطر هاله عدم رشد قارچی درمورد گونه *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از عصاره الکلی بادرنجبویه به طور معناداری بیشتر از قطر هاله عدم رشد در استفاده از عصاره آبی بادرنجبویه است ($P<0.001$).

قطر هاله عدم رشد قارچی درمورد گونه *کاندیدا گلابراتا* با تاثیر عصاره آبی بادرنجبویه با ۳ بار بررسی به ترتیب ۱۴، ۱۵/۵ و ۱۷ میلی متر و با تاثیر عصاره الکلی بادرنجبویه با ۳ بار بررسی به ترتیب ۱۲/۵، ۱۳/۵ و ۱۵ میلی متر محاسبه شد (جدول-۴) (نمودار-۱).

همان طور که در جدول - ۴ اشاره شده است، قطر هاله عدم رشد قارچی درمورد گونه *کاندیدا گلابراتا* در استفاده از عصاره الکلی و آبی بادرنجبویه تفاوت معناداری وجود ندارد ($P>0.05$).

قطر هاله عدم رشد قارچی درمورد گونه *کاندیدا کروزوئی* با تاثیر عصاره آبی بادرنجبویه با ۳ بار بررسی به ترتیب ۹/۵، ۱۰ و ۱۰/۵ میلی متر و با تاثیر عصاره الکلی بادرنجبویه با ۳ بار بررسی به ترتیب ۶، ۷ و ۸ میلی متر محاسبه شد (جدول -۵) (نمودار-۱).

جدول-۱. نتایج MICوMIC مربوط به عصاره آبی بر ۳گونه *کاندیدا*

	حداقل غلظت ضد قارچی (میلی گرم در میلی لیتر)	حداقل غلظت مهار کنندگی (میلی گرم در میلی لیتر)
کاندیدا آلبیکانس	مقاوم	مقاوم
کاندیدا گلابراتا	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱
کاندیدا کروزویی	۰/۰۱	۰/۰۱

جدول-۲. نتایج MICوMFC مربوط به عصاره الکلی بر ۳ گونه *کاندیدا*

	حداقل غلظت ضد قارچی (میلی گرم در میلی لیتر)	حداقل غلظت مهار کنندگی (میلی گرم در میلی لیتر)
کاندیدا آلبیکانس	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
کاندیدا گلابراتا	۰/۰۰۱	۰/۰۱
کاندیدا کروزویی	مقاوم	مقاوم

جدول-۳. نتایج اثر عصاره های آبی و الکلی بادرنجبویه بر گونه *کاندیدا آلبیکنس*

	عصاره آبی بادرنجبویه	عصاره الکلی بادرنجبویه	مقدار P
قطر هاله عدم رشد (بررسی اول)	۴/۵ میلی متر	۱۶/۵ میلی متر	-
قطر هاله عدم رشد (بررسی دوم)	۶ میلی متر	۱۸میلی متر	-
قطر هاله عدم رشد (بررسی سوم)	۶/۷۵ میلی متر	۱۹ میلی متر	-
میانگین قطر هاله عدم رشد در ۳بار بررسی ± انحراف معیار	۵/۷۵ ± ۱/۱۴میلی متر	۱۷/۸۳ ± ۱/۲۵میلی متر	P<0.001

همان طور که در جدول – ۵ اشاره شده است، قطر هاله عدم رشد قارچی درمورد گونه *کاندیدا کروزوئی* با استفاده از عصاره آبی بادرنجبویه به طور معناداری بیشتر از قطر هاله عدم رشد در استفاده از عصاره الکلی بادرنجبویه است (P<0.05).

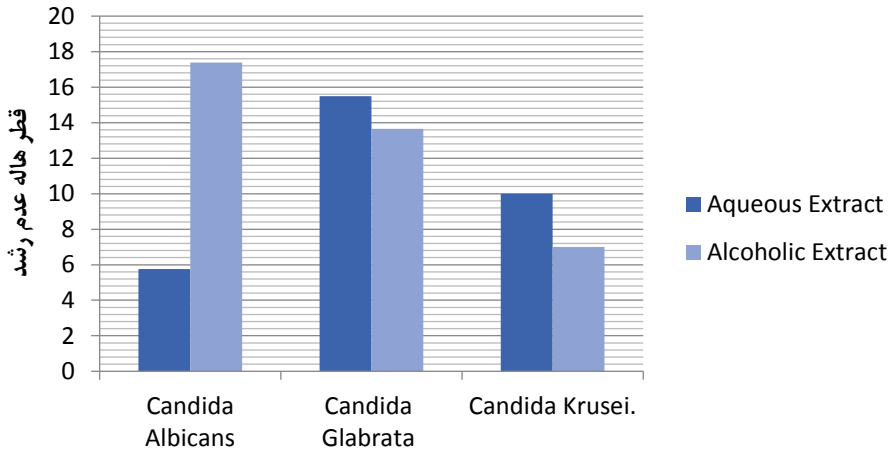
در مجموع نتایج بدست آمده بیانگر این مطلب است که اثر عصاره الکلی بادرنجبویه بر روی قطر هاله عدم رشد گونه *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به نوع آبی آن به طور معناداری بیشتر است (P<0.001)، درصورتی که درمورد *کاندیدا کروزوئی*، عصاره آبی نسبت به عصاره الکلی در افزایش قطر هاله عدم رشد موثرتر بود (P=0.01).

جدول–٤. نتایج اثر عصاره های آبی و الکلی بادرنجبویه بر گونه *کاندیدا گلابراتا*

	عصاره آبی بادرنجبویه	عصاره الکلی بادرنجبویه	مقدار P
قطر هاله عدم رشد (بررسی اول)	۱۴ میلی متر	۱۲/۵ میلی متر	–
قطر هاله عدم رشد (بررسی دوم)	۱۵/۵ میلی متر	۱۳/۵ میلی متر	–
قطر هاله عدم رشد (بررسی سوم)	۱۷ میلی متر	۱۵ میلی متر	–
میانگین قطر هاله عدم رشد در ۳بار بررسی ± انحراف معیار	۱۵/۵ ± ۱/۵میلی متر	۱۳/۶۶ ± ۱/۲۵میلی متر	P>0.05

جدول–۵. نتایج اثر عصاره های آبی و الکلی بادرنجبویه بر گونه *کاندیدا کروزوئی*

	عصاره آبی بادرنجبویه	عصاره الکلی بادرنجبویه	مقدار P
قطر هاله عدم رشد (بررسی اول)	۹/۵ میلی متر	۶ میلی متر	–
قطر هاله عدم رشد (بررسی دوم)	۱۰ میلی متر	۷ میلی متر	–
قطر هاله عدم رشد (بررسی سوم)	۱۰/۵ میلی متر	۸ میلی متر	–
میانگین قطر هاله عدم رشد در ۳بار بررسی ± انحراف معیار	۱۰ ± ۰/۵ میلی متر	۷ ± ۱میلی متر	P=0.01



نمودار–۱. تاثیر عصاره های آب و الکلی بادرنجبویه بر قطر هاله عدم رشد قارچی در سه گونه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزوئی*

بحث

نیروهای نظامی به علت اسکان در آسایشگاه های عمومی و عدم وجود امکانات کافی بهداشتی در معرض خطر ابتلا به عفونت های فرصت طلب، خصوصاً عفونت های قارچی هستند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ بر روی سربازان آمریکایی جنگ افغانستان و عراق صورت پذیرفت، نشان داده شد گروهی که در معرض عفونت های کاندیدایی قرار گرفته بودند با خطر مرگ بالاتری مواجه بودند (۱،۲). با توجه به این مطالب لزوم مطالعه بیشتر بر روی درمان های ضد قارچی ضروری به نظر می رسد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی بادرنجبویه نسبت به نوع آبی آن اثر بیشتری بر روی قطر هاله عدم رشد گونه *کاندیدا آلبیکنس* دارد (P<0.001)، در مورد *کاندیدا گلابراتا* اثرات عصاره آبی و الکلی تقریبا مشابه بودند و تفاوت معنی دار مشاهده نشد (P=0.18). درمورد *کاندیدا کروزوئی*، عصاره آبی نسبت به عصاره الکلی در افزایش قطر هاله عدم رشد موثرتر بود (P=0.01).

در مطالعه نائینی و همکارانش برخلاف نتایج مطالعه حاضر، مشخص گردید که هیچ گونه مهار رشدی توسط عصاره‌ی آبی بادرنجبویه بعد از ۴۸ ساعت بر روی *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد نشده است (۱۸). همچنین در مطالعه ارژنگ و همکارانش نیز نتایج حاکی از آن بود که با روش‌های دیسک دیفیوژن و رقت‌سازی در محیط کشت مایع، اسانس اندام هوایی گیاه با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانایی ایجاد هاله عدم رشد گونه قارچی *کاندیدا آلبیکنس* را ندارد (۱۱). ممکن است این تفاوت به سبب نحوه عصاره گیری یا روش سنجش اثر ضدکاندیدا آلبیکنسی باشد. در مطالعه نائینی روش عصاره گیری تقطیر با آب و جوشیدن و در مطالعه ما روش

عصاره گیری خیساندن بود. همچنین در این مطالعه از روش میکرودایلیشن و در مطالعه نائینی از روش چاهک گذاری برای سنجش اثر ضد کاندیدایی استفاده گردید (۱۸).

نتایج مطالعه عبدالهی با هدف مقایسه تاثیرات عصاره آبی و اتانولی بذر گیاه بادرنجبویه بر مهار رشد سوش استاندارد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد که عصاره آبی اثر مهاری نداشته در حالی که عصاره اتانولی به طور کامل قارچ *کاندیدا آلبیکنس* را مهار کرد و قطر هاله عدم رشد بین ۱۴ تا ۱۸ میلی متر بود که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. در مطالعه عبدالهی همانند مطالعه ما از روش خیساندن برای عصاره گیری استفاده شده است (۱۹).

همچنین نتایج مطالعه ما تاحدودی با مطالعه Abdellatif و همکارانش در در الجزایر هم راستا است که نشان داد، روغن برگ گیاه بادرنجبویه اثر آنتی میکروبیال بر روی میکروارگانیسم های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سالمونلا انتریکا* و قارچ های *کاندیدا آلبیکانس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* دارد. البته در مطالعه مذکور از روغن برگ گیاه بادرنجبویه استفاده شده است (۱۲).

به طور کلی مطالعات اندکی در مورد تاثیر ضد قارچی گیاه بادرنجبویه وجود دارد و برخی از این مطالعات محدود نیز حاکی از اثرات ضدقارچی گیاه می باشد. ساعتچی و همکارانش تاثیر ضد قارچی و آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی بادرنجبویه را ارزیابی نمودند. به طورکلی عصاره مورد آزمایش فعالیت ضد قارچی بالایی را نشان داد و نتایج به دست آمده در مطالعه ساعتچی نشان داد که در مورد گونه های قارچی تریکوتسیوم و ژئوتریکوم بادرنجبویه اثر ضدقارچی قابل قبولی دارد. در مورد گونه آسپرژیلوس بادرنجبویه دارای بالاترین فعالیت ضد قارچی بود. در مورد گونه بایسوکلامیس و الترناریا بادرنجبویه فعا لیت ضد قارچی خوبی رانشان داد و مشخص شد که خصوصیت ضد قارچی ناشی از غلظت بالای کاریوفیلن و کاریوفیلن اکسید است. که به مقدار فراوان در عصاره گیاهی مورد آزمایش وجود دارد. ترکیبات شیمیایی عصاره از قبیل هیدروکربن های منوترپن اثر حفاظتی قابل مشاهده دارد (۲۰). در سالهای اخیر محققان مونو و سسکوئس ترپنوئید را به عنوان ترکیبات اصلی عصاره بیان کرده اند که در طبیعت به صورت ترکیبات فنولیک هستند. به نظر میرسد فرض کردن اینکه ترکیبات فنولیک دارای فعالیت ضد میکروبی باشند طبیعی باشد (۲۱).

بیشتر مطالعات روی اثر ترکیبات فنولیک روی غشا تمرکز کرده اند. در واقع فنولیک ها نه تنها می توانند به دیواره سلول و غشا سلول حمله کنند و روی نفوذ پذیری و آزاد سازی اجزای داخلی سلول اثر بگذارند بلکه در عملکرد غشا نیز تاثیر می گذارند و به این ترتیب سبب ممانعت از رشد قارچ می گردند (۲۲).

در مطالعه حاضر اگرچه تفاوت معناداری میان عصاره آبی و عصاره الکلی در تاثیر بر قطر هاله عدم رشد گونه *کاندیدا گلابراتا* مشاهده نشد اما قطر هاله عدم رشد تحت تاثیر این دو عصاره (قطر هاله عدم رشد تحت تاثیر عصاره الکلی: ۱۳/۶۶ و تحت تاثیر عصاره آبی: ۱۵/۵ میلی متر) قابل توجه بود.

کاندیدا گلابراتا سال های زیادی یک ساپروفیت نسبتاً غیرپاتوژن فلور طبیعی افراد سالم و مطمئناً غیر مرتبط با عفونت جدی در انسان در نظر گرفته شد. به هر صورت به دنبال مصرف زیاد و گسترده داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی به همراه درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف شمار عفونت های سیستمیک و مخاطی ایجاد شده توسط *کاندیدا گلابراتا* به طور بارزی افزایش یافته است (۲۳). تحقیقات متعددی مقاومت ضد قارچی *کاندیدا گلابراتا* را شایع دانسته و رابطه بین درمان ضد قارچی مناسب زود هنگام (مشاوره با متخصص عفونی) و میزان مرگ و میر در گروه بیماران کانسری دچار فونژیمی *کاندیدا گلابراتا* را بررسی کردند و نتیجه گیری کردند که در بیماران سرطانی با فونژیمی *کاندیدا گلابراتا* ی دارای مقاومت ضد قارچی بالا، شروع زود هنگام درمان مناسب (مشاوره با متخصص عفونی) با افزایش طول عمر بیماران همراه بوده است (۲۴). Pfaller و همکاران حساسیت *کاندیدا گلابراتا* ی نواحی مختلف جهان را نسبت به ضد قارچ ها متفاوت یافتند (۲۵)

از محدویت های مطالعه حاضر می توان به این نکته اشاره کرد که عصاره های تهیه شده تنها براساس نتایج غلظت بدست آمده از GC بر اساس یکی از ترکیبات که بالاترین غلظت را دارد یکسان سازی می گردد که دارای بیشترین اثر درمانی است، غلظت سایر مواد با اثرات کمتر در نظر گرفته نمی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد عصاره های آبی و الکلی بادرنجبویه بر تمامی گونه های بررسی شده در این مطالعه یعنی *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا کروزوئی* و *کاندیدا گلابراتا* اثر ضدقارچی دارد. عصاره الکلی بادرنجبویه نسبت به نوع آبی آن اثر بیشتری بر روی قطر هاله عدم رشد گونه *کاندیدا آلبیکنس* دارد، در مورد *کاندیدا گلابراتا* اثرات عصاره آبی و الکلی تفاوت معنی داری نداشت. درمورد *کاندیدا کروزوئی*، عصاره آبی نسبت به عصاره الکلی در افزایش قطر هاله عدم رشد موثرتر بود.

تشکر و قدردانی: این مقاله برگرفته از طرح تصویب شده در دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. بدین وسیله تشکر و قدردانی از مرکز تحقیقات دندانپزشکی پیشگیری، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی عمل می آید.

تضاد منافع: بدینوسیله نویسندگان تصریح می نمایند که هیچ گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Blyth DM, Mende K, Weintrob AC, Beckius ML, Zera WC, Bradley W, et al. Resistance patterns and clinical significance of Candida colonization and infection in combat-related injured patients from Iraq and Afghanistan. In Open forum infectious diseases 2014; 1 (3). Oxford University Press.
2. Afshari M, Riyaizipoor M. Frequency of superficial fungal infections in the military forces of the Taybad area. Journal of Military Medicine, 2006; (3) 8:211-217.
3. Sanei AS, Salari MH, Sayrafi MMT. The occurrence of Actinobacillus, Actinomycetem Comitans, Porphyromonas Gingivalis and Prevotella Intermedius in mild to moderate adult periodontitis patients. Journal of Islamic Dental Association of Iran. 1999; 32(11): 65-75.
4. Xiaojing LI, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic disease caused by oral infection. J Clinical Microbiology Reviews. 2000; 13(4): 547-58.
5. Mizugai H, Isogai E, Hirose K, Chiba I. Effect of denture wearing on occurrence of candida Species in the Oral Cavity. J Appl Res. 2007; 7(3): 250-4.
6. Khosravi AR, Shokri H, Ziglari T. Fungal Infections in Immunocompromised Patients. 1st ed. Tehran: Jahad-e Daneshgahi Publisher, Vahed-e Tehran; 2008. P. 179.
7. Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus. Dental management of medically compromised patient. 6th ed. St Louis: Mosby. 2002, 152.
8. Ruddock PS, Liao M, Foster BC, Lawson L, Arnason JT, Dillon JA. Garlic Natural Health Products Exhibit Variable Constituent Levels and Antimicrobial Activity against Neisseria Gonorrhoeae, Staphylococcus Aureus and Enterococcus Faecalis. Phytother Res. 2005;19(4): 327-34.
9. Singh HB, Srivastava M, Singh AB, Srivastava AK. Cinnamon Bark Oil. A Potent Fungitoxicant Agent Fungi Causing Respiratory Tract Mycoses. Allergy. 1995; 50(12):995-9.
10. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and Phytochemical Studies on 45 Indian Medicinal Plants Against Multi, Drug Resistant Human Pathogens. J Ethnopharmaco.2001; 74(2):113-23.
11. Arzhang M, Dakhili M, Farahani F. Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential oil of Melissa officinalis L. Qom Univ Med Sci J. 2015;9(1-2):7-13.
12. Abdellatif F, Boudjella H, Zitouni A, Hassani A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian Melissa officinalis L. EXCLI J. 2014 ;13:772-81.
13. Hăncianu M, Aprotosoaie AC, Gille E, Poiată A, Tuchiluș C, Spac A, et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of essential oil of Melissa officinalis L. from Romania. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2008;112(3):843-7.
14. Aničić NV, Dimitrijević S, Ristić MS, Petrović SS, Petrović SD. Amtimicrobial activity of essential oil of Melissa officinalis L, Lamiaceae. Hemijska industrija. 2005;59(9-10):243-7.
15. Rostami H, Kazemi M, Shafiei S. Antibacterial activity of lavandula officinalis and Melissa officinalis againts some human pathogenic bacteria. Asian J Biochem. 2012;7(3):133-42
16. Diba K, Mousavi B, Mahmoudi M, Hashemi J. In-vitro anti-fungal activity of Propolis alcoholic extract on Candida spp. and Aspergillus spp. Tehran University Medical Journal. 2010;68(2):80-5.
17. Haghighati F, Jafari S, Beytollahi J. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an in vitro study. Hakim Research Journal. 2003; 6(3): 71-76.
18. Naeeni A, Jalayer Naderi N, Shokri H, Davati A, Rabiee M. Evaluation of the Antifungal Effects of Compound Mouthwash (Cuminum cyminum, Melissa officinalis and Camellia sinensis) on Standard Strain of Candida albicans. J Mash Dent Sch. 2015; 39(3): 273-82 .
19. Abdollahi M, Yahyaabadi S, Madani M. Anti-fungal effects of alcoholic and aqueous extract of Melissa officinalis on Candida albicans. The 1st National Conference on Stable Agriculture and Natural Resources; Tehran, Iran. 2013.
20. Saatchi A, Kadivar M, Soleimanianzad S. Antioxidant and Antifungal effects of ethanol extracts of Melissa officinalis and Valeriana officinalis. The 18th National Congress of Food Sciences & Industries; Mashhad, Iran. 2008.
21. Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against Aspergillus flavus in liquid medium and tomato paste. Food Control. 2007; 18(12): 1518-1523.
22. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Sokmen A, Pollisiou M, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. Food Chem. 2007;103(4): 1449–1456.
23. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS microbiology reviews. 2012;36 (2): 288-305.
24. Girmenia C, Pizzarelli G, Cristini F, Barchiesi F, Spreghini E, Scalise G, et al. Candida guilliermondii fungemia in patients with hematologic malignancies. Journal of clinical microbiology. 2006;44(7):2458-64.
25. Pfaller M, Messer S, Boyken L, Tendolkar S, Hollis R, Diekema D. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of Candida glabrata to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. Journal of clinical microbiology. 2004;42 (7):3142-6.