

مقایسه اثر عصاره آویشن و مورت با نیستاتین بر مهار رشد کاندیدا آلیکنس

دکتر محمدعلی ضیاء*^۱، دکتر منصور بیات^۲، حسین خلخالی^۳، سمیرا صفاری^۴

۱- استادیار قارچ شناسی، گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، اصفهان. ۲- دانشیار قارچ شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران. ۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، اصفهان. ۴- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه فلاورجان، اصفهان.

چکیده

زمینه و هدف: کاندیدا آلیکنس فراوان‌ترین عامل کاندیدیازیس دهانی است. این مطالعه به منظور مقایسه اثر عصاره آویشن و مورت با نیستاتین بر مهار رشد کاندیدا آلیکنس در محیط آزمایشگاه انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه آزمایشگاهی روی ۳۲ سویه کاندیدا آلیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهانی انجام گردید. از روش *Agar microdilution* برای بررسی اثر عصاره‌ها و نیستاتین استفاده شد. ابتدا سوسپانسیونی از سلول‌های مخمری کاندیدا آلیکنس و نیز یک رقت سریال از عصاره‌ها و نیستاتین در محیط سابورودکستروز آگار تهیه و یک لوپ از سوسپانسیون کاندیدا روی محیط کشت جامد، کشت و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. نتایج حاصل از رشد قارچ در طی ۷ روز ثبت شد.

یافته‌ها: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد عصاره آویشن، مورت، مخلوط دو عصاره و سوسپانسیون نیستاتین به ترتیب برابر با $0.390 \mu\text{l/ml}$ ، $1.2/5 \mu\text{l/ml}$ ، $0.780 \mu\text{l/ml}$ و 160 IU/ml بود.

نتیجه‌گیری: عصاره آویشن در مقایسه با نیستاتین به عنوان یک داروی ضدقارچی در درمان کاندیدیازیس می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد؛ اما عصاره مورت نمی‌تواند رشد کاندیدا آلیکنس را مهار نماید.

کلید واژه‌ها: کاندیدا آلیکنس، نیستاتین، آویشن، مورت

* نویسنده مسؤول: دکتر محمد علی ضیاء، پست الکترونیکی zia.mohammadali@gmail.com

نشانی: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، دفتر ارتباط با صنعت و جامعه، تلفن ۰۳۵۴۰۰۱-۰۳۱۱، شماره ۰۳۵۴۰۳۳
وصول مقاله: ۹۱/۴/۱۸، اصلاح نهایی: ۹۱/۸/۲۰، پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۱۶

مقدمه

تغییر شکل فنوتیپی، تداخل با سیستم میزبان، سینرژیسم با باکتری‌ها و تولید هیدرولازها یا سایر متابولیت‌ها به عنوان عوامل ویروالانس کاندیدا آلیکنس پیشنهاد شده‌اند (۵).

عفونت‌های کاندیدا باید درمان شوند؛ زیرا ممکن است در بیماران نوتروپنیک و دچار نقص ایمنی، انتشار یابند (۱و۶). روش درمانی چنین عفونت‌هایی یک چالش بزرگ است؛ زیرا مقاومت پاتوژن‌ها نسبت به تعدادی از داروهایی که مورد استفاده وسیع هستند؛ افزایش یافته است (۷).

نیستاتین یک تتران ماکرولید تولید شده به وسیله استرپتومایسس نورسئنی است. این دارو به صورت پودر زرد رنگی است که آمفوتریک بده و به مقدار کم (4mg/ml) محلول در آب است. نیستاتین دارای خاصیت مهار رشد قارچ بوده و در غلظت بالا و pH اسیدی فعالیت قارچ کشی قوی نشان می‌دهد. این دارو فعالیت بسیار عالی علیه مخمرهای جنس کاندیدا به خصوص کاندیدا آلیکنس

کاندیدیازیس از جمله شایع‌ترین و گسترده‌ترین بیماری‌های قارچی انسان است که در سال‌های اخیر به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است (۳-۱). کاندیدیازیس به عنوان شایع‌ترین عفونت قارچی مهاجم در بیماران غیرنوتروپنیک بحرانی شناخته شده است (۴). اکثر عفونت‌ها به وسیله کاندیدا آلیکنس که منشأ داخلی دارد؛ ایجاد می‌شود و تقریباً در ۶۰ تا ۹۰ درصد عفونت‌های مربوطه جدا شده است (۲و۴). اغلب افراد این قارچ را در زمان تولد در طی عبور از کانال زایمان کسب می‌کنند. کاندیدا آلیکنس در بدن در تعادل با سایر میکروارگانیسم‌ها زندگی می‌کند و به‌صورت ساپروفیت شایع روی سطوح مخاطی به‌ویژه دهان، دستگاه گوارشی و واژن است؛ اما عوامل مختلف می‌تواند این تعادل را بهم زده و منجر به بروز بیماری علامت‌دار پیشرونده فعال گردد (۴-۲). عوامل متعددی نظیر چسبندگی، مداومت تماس، تشکیل جرم تیوب، حساسیت تماسی،

دارد (۸).

داروهای قارچی افزایش داده است (۱۷). هدف از انجام مطالعه حاضر تعیین اثر ضدقارچی عصاره گیاهان آویشن و مورت به تنهایی و مخلوطی از این دو عصاره بر رشد کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدایزیس دهانی و مقایسه اثر آنها با نیستاتین به عنوان یک مرجع ضدقارچی در محیط آزمایشگاه بود.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی ۳۲ سویه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدایزیس دهانی مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان در سال ۱۳۸۹ انجام شد.

نمونه‌ها توسط آزمایش میکروسکوپی و کشت، تعیین هویت شدند. ابتدا نمونه‌ها توسط پتاس ۱۰ درصد یا رنگ آمیزی با بلودومیتین و با گیمسا در زیر میکروسکوپ بررسی شدند و نمونه‌های حاوی سلول‌های منفرد کوچک، بیضی شکل با جداره نازک، جوانه‌دار یا بدون جوانه همراه با رشته‌های میسلالی و سلول‌های دارای لوله زایا و میسلیم کاذب برای انجام مرحله کشت به کار گرفته شدند. کلنی‌های حاصل در محیط SCC (سابورو دکستروز آگار + کلرامفنیکل + سیکلوهگزامید) سفید تا کرم رنگ، صاف و براق بودند و سپس از آزمایش تولید لوله زایا در سرم و تولید کلامیدوسپور توسط کاندیدا آلبیکنس در محیط کورن میل آگار + توئین ۸۰ و در نهایت برای تشخیص قطعی و تمایز سریع کاندیدا آلبیکنس، تروپیکالین، کروزه‌ای و دوبلینینسیس از محیط کروم آگار کاندیدا منجر به تشکیل کلنی‌های رنگی متفاوت؛ استفاده شد.

از روش Agar microdilution برای بررسی اثر عصاره‌ها و نیستاتین استفاده شد. پس از تشخیص قطعی کاندیدا آلبیکنس سوسپانسیونی از کلنی کاندیدا آلبیکنس در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. سپس غلظت کاندیدا موجود در مخلوط با استفاده از محلول‌های استاندارد مک فارلند و اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۴۰ nm استاندارد گردید. به طوری که در هر میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حدود $1/5 \times 10^8$ cfu/ml سلول مخمری وجود داشت که غلظتی استاندارد برای بررسی آثار ضد قارچی است؛ اما از آنجا که همین غلظت نیز برای انجام شمارش کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط جامد خیلی زیاد است؛ لذا از همین غلظت سریال رقت تهیه و رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} تهیه گردید.

برای تهیه عصاره، ابتدا مواد گیاهی با آب شستشو و به مدت ۳۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضد عفونی شدند. سپس برای حذف هیپوکلریت باقیمانده، با آب مقطر استریل شستشو و در سایه خشک شدند. مواد گیاهی خشک شده پودر شد. مقدار ۵۰ گرم

درمان کاندیدایزیس به واسطه ظهور سویه‌های کاندیدایی که به عوامل ضدقارچی رایج مورد استفاده مقاومند؛ مسأله‌ای پیچیده است. عوامل ضدقارچی رایج مورد استفاده نه تنها تعداد محدودی دارند؛ بلکه خیلی از آنها سمی و بسیار گران قیمت هستند. عود عفونت‌های کاندیدایی خیلی شایع است و این مسأله بار درمانی این عفونت فرصت طلب و در نتیجه نیاز به توسعه عوامل ضدقارچی جدید به منظور گسترش طیف فعالیت‌ها علیه کاندیدا و مبارزه با سویه‌های مقاوم به ضدقارچ‌های در دسترس را افزایش داده است (۹). مشکلات همراه با درمان و مدیریت عفونت‌های کاندیدا، کشف عوامل ضدقارچی جدید به منظور گسترده‌تر کردن طیف فعالیت علیه کاندیدا را ضروری می‌سازد. فرآورده‌های طبیعی مشتق شده از گیاهان ممکن است به صورت بالقوه منجر به ترکیبات جدید شوند که می‌تواند سبب مهار رشد این قارچ‌ها شود (۱۰). فرآورده‌های طبیعی فعال علیه گونه‌های کاندیدا سالیان اخیر افزایش یافته است که تقریباً نزدیک به ۲۵۸ گونه گیاهی از ۹۴ تیره مورد بررسی را شامل شده است (۱۱).

آویشن (نام علمی: تیموس) یک گیاه آروماتیک پزشکی متعلق به خانواده Lamiaceae یا Labiatae است و این گیاه به عنوان یک گیاه ضد عفونی کننده شناخته شده است (۱۲). فعالیت‌های ضدقارچی، آفت کشی و ضدباکتریال روغن ضروری تیموس به اثبات رسیده است (۱۲). گونه‌های این جنس به واسطه دارا بودن منبع عالی و غنی از روغن ضروری شاخص هستند. ترکیبات اصلی روغن ضروری تیموس و لگاریس به ترتیب 1,8-cineole و سپس terpenyl camphor تعیین کمیت شده است (۱۳).

اسامی مترادف گیاه مورت myrtus mucronata pers و myrtus italic mill است. در فارسی آن را مورت، مورت، آس و عمار می‌نامند. بخش دارویی این گیاه را برگ‌ها تشکیل می‌دهند. برگ‌های این گیاه دارای ۲-۱۵ درصد حجمی عصاره است که قسمت عمده آن را ترپینولن، سینئول، لینالول، ترپینول (Teripneol) و لینالیل استات تشکیل می‌دهد. همچنین در برگ گیاه علاوه بر عصاره، تاتن، فلاونوئید، ویتامین C (به میزان ۸۲ میلی‌گرم درصد گرم برگ خشک) وجود داشته و فاقد آلکالوئید و گلیکوزیدهای قلبی است (۱۴ و ۱۵). مورت به صورت موضعی در درمان تبخال تپ ۲۱، به عنوان آنتی‌سپتیک و در درمان التهاب مخاط بینی استفاده می‌گردد (۱۶).

اطلاعات مربوط به حساسیت ضدقارچی کاندیدا در پیش‌بینی کارایی احتمالی درمان بعدی، بسیار مهم است و استفاده فزاینده از درمان ضدقارچی پتانسیل مقاومت نوپدید کاندیدا را در برابر

C₂ غلظت نیستاتین در محیط کشت و V₂ حجم محیط کشت است. بر این اساس با اضافه نمودن مقادیر ۰،۰۰۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، به ترتیب شش رقت از سوسپانسیون نیستاتین با مقادیر ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ واحد بین‌المللی از نیستاتین در هر میلی‌لیتر از محیط کشت به دست آمد.

سوسپانسیون‌های کاندیدا آلیکنس با پنج رقت ۱۰^{-۱}، ۱۰^{-۲}، ۱۰^{-۳} و ۱۰^{-۴} در محیط‌های کشت محتوی رقت‌های مختلف عصاره‌ها و سوسپانسیون نیستاتین به صورت گسترش در سطح کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور به مدت یک هفته انکوبه گردید. سپس همه پتری‌دیش‌های تلقیح شده به صورت روزانه و به مدت یک هفته مورد بازدید قرار گرفتند و تعداد کلنی‌های قارچی به‌طور جداگانه شمارش و یادداشت گردید. آزمایشات به صورت سه بار تکرار انجام شد.

یافته‌ها

حداقل غلظت مهارکننده عصاره آویشن به میزان ۰/۳۹۰ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر از محیط کشت تعیین گردید. در این غلظت عصاره آویشن توانست از رشد کاندیدا آلیکنس موجود در رقت‌های مختلف سوسپانسیونی ۱۰^{-۱}، ۱۰^{-۲}، ۱۰^{-۳} و ۱۰^{-۴} ممانعت به عمل آورد (جدول یک).

با کاهش غلظت آویشن در محیط کشت میزان مشاهده کلنی‌های حاصل از گسترش رقت‌های مختلف سوسپانسیونی کاندیدا آلیکنس افزایش یافت. به‌طوری‌که با کاهش تعداد سلول‌های مخمیری در سوسپانسیون یا به عبارتی افزایش رقت سوسپانسیون مخمیری تعداد کلنی‌های رشد یافته در محیط‌های کشت

از پودر خشک شده در ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول خیسانده شد و ۴۸ ساعت توسط شیکر تکان داده شد. سپس توسط پارچه کتانی دو لایه استریل فیلتر و در دور ۹۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و توسط کاغذ واتمن شماره ۴۱ فیلتر شد و در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و خشک شد. از عصاره آویشن، مورت و مخلوط دو عصاره به نسبت مساوی سریال رقت تهیه گردید. ابتدا در ۱۰ ارلن جداگانه، در هر کدام مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت SCC تهیه و در مرحله بعدی از عصاره‌های فوق به ارلن‌های اول تا نهم هر گروه به ترتیب با مقادیر ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹، ۰/۰۱۹۵ و ۰/۰۰۹۷۵ میلی‌لیتر اضافه گردید. لذا رقت‌های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸۰، ۰/۳۹۰ و ۰/۱۹۵ و ۰/۰۹۷۵ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر از محیط کشت به دست آمد. به ارلن دهم از هر گروه هیچ ماده‌ای اضافه نشد و از آن به عنوان کنترل استفاده گردید. تمام ارلن‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۵ پوند و به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. سپس محتویات هر ارلن در ۱۰ پتری دیش به‌طور مساوی تقسیم شد. به این ترتیب در هر بار تعداد ۱۰۰ پتری دیش حاوی محیط کشت SCC همراه با رقت‌های مختلف از مواد فوق‌الذکر به دست آمد. در مورد تهیه غلظت‌های مختلف از سوسپانسیون نیستاتین در محیط‌های کشت به ترتیب زیر عمل شد.

ابتدا با توجه به دستورالعمل مربوطه (بروشور دارو) سوسپانسیون اولیه نیستاتین با غلظت ۱۰۰۰۰۰ IU/ml تهیه گردید و سپس برای محاسبه حجم سوسپانسیون اولیه مورد نیاز برای تهیه رقت‌های نیستاتین در محیط کشت‌ها، از فرمول C₁V₁=C₂V₂ استفاده شد. C₁ غلظت نیستاتین در سوسپانسیون اولیه، V₁ حجم سوسپانسیون اولیه،

جدول ۱: میزان رشد رقت‌های مختلف سوسپانسیون کاندیدا آلیکنس در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف از اسانس آویشن، مورت و مخلوط دو عصاره در روز هفتم

رقت سوسپانسیون	نوع عصاره	غلظت عصاره در محیط کشت (μl/ml)							
		۰/۰۰۰	۰/۰۹۷۵	۰/۱۹۵	۰/۳۹۰	۰/۷۸۰	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵
۱۰ ^۰	آویشن	*	*	*	*	*	*	*	*
	مورت	*	*	*	*	*	*	*	*
	آویشن و مورت	*	*	*	۲۰۰	*	*	*	*
۱۰ ^{-۱}	آویشن	*	۱۴۳	*	*	*	*	*	*
	مورت	*	*	*	*	*	*	۷۷	*
	آویشن و مورت	*	۶۰	*	۲۴	*	*	*	*
۱۰ ^{-۲}	آویشن	*	۹۶	۳	*	*	*	*	*
	مورت	*	*	*	*	*	۲۰۱	۸	*
	آویشن و مورت	*	۸۰	۶	۳	*	*	*	*
۱۰ ^{-۳}	آویشن	۱۰۱	۳	*	*	*	*	*	*
	مورت	۱۰۱	۹۸	۹۵	۹۵	۹۵	۲۹	۲	*
	آویشن و مورت	۱۰۱	۸	*	*	*	*	*	*
۱۰ ^{-۴}	آویشن	۹	*	*	*	*	*	*	*
	مورت	۹	۱۰	۹	۱۱	۸	۶	۳	*
	آویشن و مورت	۹	*	*	*	*	*	*	*

* غیر قابل شمارش

ضدقارچی آویشن به وسیله محققین متعدد به اثبات رسیده است (۱۳).

در مطالعه اکبری فعالیت ضدقارچی آویشن علیه ایزوله‌های کاندیدا آلیکنس حساس و مقاوم به فلوکونازول بررسی و نتایج نشان داد که آویشن می‌تواند از رشد کاندیدا آلیکنس در شرایط آزمایشگاهی ممانعت کند (۱۸).

در مطالعه انجام شده Pinto و همکاران روی فعالیت ضدقارچی روغن‌های ضروری *Saliva officialis* علیه کاندیدا آلیکنس، اثر این گیاه بر روی تنها چهار ایزوله کاندیدا آلیکنس و چهار سویه ATCC بررسی شده است (۱۹). در مطالعه ما اثر عصاره آویشن و مورت بر روی ۳۲ ایزوله و یک سویه استاندارد کاندیدا آلیکنس بررسی شد که نتایج مشابهی را در بر داشت.

Dinsdale و *Martin* دو مورد کاندیدایزیس منجر به شکست درمان را گزارش نمودند. ایزوله‌های جدا شده از این بیماران در شرایط آزمایشگاهی نیز به نیستاتین مقاوم بودند (۲۰).

در مطالعه حاضر در محیط‌های کشت حاوی ۱۶۰ IU/ml نیستاتین در هیچیک از رقت‌های سوسپانسیونی حاوی مخمر، رشد کلنی مشاهده نگردید؛ ولی در غلظت ۸۰ IU/ml نیستاتین در محیط کشت در رقت سوسپانسیونی مخمری برابر با ۱۰^{-۱}، در روز ششم یک کلنی و در سایر رقت‌ها، کلنی مخمری رشد نکرد و با کم شدن میزان غلظت نیستاتین در محیط کشت و همراه با افزایش میزان مخمر در سوسپانسیون، تعداد کلنی‌های مشاهده شده افزایش یافت که نشانگر اهمیت غلظت دارو در محیط کشت و نیز تعداد مخمرهای موجود در سوسپانسیون است.

در مطالعه شهیدی در کرمان، فعالیت آنتی‌کاندیدای عصاره متانولی ۴۲ گونه گیاهی از ۲۹ خانواده مورد استفاده در پزشکی سنتی ایران بر روی کاندیدا آلیکنس مقاوم به کلوتریمازول بررسی شد. ۱۹ گونه گیاهی از ۱۶ خانواده فعالیت ضد کاندیدا داشتند و کمترین میزان غلظت ممانعت کننده رشد ۰/۶۲ mg/ml و متعلق به *Terminalia chenbula* و *Thymus vulgaris* بود (۲۱).

در مطالعه ما محیط‌های کشت حاوی ۰/۳۹۰ μl/ml عصاره آویشن از رشد کاندیدا آلیکنس (در تمام رقت‌های سوسپانسیونی) جلوگیری نمود. این مقدار برای عصاره مورت برابر ۱۲/۵ μl/ml، مخلوط دو عصاره آویشن و مورت برابر ۰/۷۸۰ μl/ml و برای نیستاتین ۱۶۰ IU/ml بود. حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره آویشن برای کاندیدا آلیکنس در حضور عصاره مورت کاهش نیافته و لذا نمی‌توان در باره اثر سینرژسم یا آنتاگونیسم عصاره مورت بر اثر ضدقارچی عصاره آویشن اظهار نظر نمود؛ اما با توجه به نتایج حاصل از مخلوط این دو عصاره در غلظت ۰/۳۹۰ μl/ml (یعنی از هر کدام ۰/۱۹۵ μl/ml) و مقایسه آن با نتایج حاصل از اثر

کاهش نشان داد. در محیط‌های کشت فاقد عصاره آویشن تعداد کلنی‌های مشاهده شده در رقت‌های ۱۰^{-۱}، ۱۰^{-۲} و ۱۰^{-۳} در ۲۴ ساعت اول پس از انکوباسیون غیرقابل شمارش بود.

حداقل غلظت مهار کننده عصاره مورت ۱۲/۵ میکرولیتر بر هر میلی‌لیتر از محیط کشت تعیین شد. با کاهش غلظت عصاره اثر ضدقارچی کمتر شد. به طوری که از غلظت ۰/۷۸ میکرولیتر بر هر میلی‌لیتر از محیط کشت تا پایین تر عملاً تغییری در اثر ضدقارچی عصاره مشاهده نگردید و نتایج تقریباً در مورد رقت‌های مختلف یکسان بود.

اثر عصاره مورت در ممانعت از رشد کاندیدا آلیکنس در محیط‌های کشت بسیار کمتر از اثر عصاره آویشن بود (جدول یک). لذا در مرحله بعد اثر غلظت‌های مختلف از مخلوط این دو عصاره بر ممانعت از رشد کاندیدا آلیکنس بررسی شد. بر اساس جدول حداقل غلظت ممانعت کننده مخلوط در عصاره برابر ۰/۷۸ میکرولیتر بر هر میلی‌لیتر از محیط کشت به دست آمد که با نتیجه حاصل از حداقل غلظت ممانعت کننده عصاره آویشن همخوانی داشت. زیرا برای عصاره آویشن حداقل غلظت مهار کننده ۰/۳۹۰ μl/ml تعیین گردید که همین غلظت از عصاره آویشن در غلظت ۰/۷۸۰ μl/ml از مخلوط دو عصاره موجود است.

در محیط‌های کشت حاوی ۱۶۰ IU/ml نیستاتین در هیچیک از رقت‌های سوسپانسیونی حاوی مخمر، رشد کلنی مشاهده نگردید؛ ولی در غلظت ۸۰ IU/ml در رقت سوسپانسیونی مخمری برابر با ۱۰^{-۱} یک کلنی در روز ششم و در سایر رقت‌ها کلنی مخمری مشاهده نشد؛ اما با کم شدن میزان غلظت نیستاتین در محیط کشت و همراه با افزایش میزان مخمر در سوسپانسیون، تعداد کلنی‌های مشاهده شده افزایش یافت. به طوری که در رقت ۱۰^{-۱} از سوسپانسیون مخمری، تعداد کلنی‌های مشاهده شده در محیط کشت حاوی غلظت ۱۰ IU/ml نیستاتین برابر با ۲۵۹۲ کلنی بود (جدول ۲).

جدول ۲: تعداد کلنی‌های رشد یافته از رقت‌های مختلف سوسپانسیون کاندیدا آلیکنس در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف نیستاتین در روز هفتم

رقت سوسپانسیون	۰/۰۰	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰	۱۶۰
۱۰ ^{-۱}	*	۲۵۹۲	۱	۴۹	۱	-
۱۰ ^{-۲}	*	۷۷۶	-	۱۰	-	-
۱۰ ^{-۳}	۷۸۰	۸۰	-	۲	-	-
۱۰ ^{-۴}	۱۶۳	۶	-	-	-	-
	۱۸	۱	-	-	-	-

* غیر قابل شمارش

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه عصاره آویشن دارای اثر بسیار مطلوبی در جلوگیری از رشد کاندیدا آلیکنس بود. فعالیت‌های

کننده آویشن $0/016 \mu\text{l/ml}$ اعلام شد (۲۴). در مطالعه ما نیز اثر آویشن بر ممانعت از رشد کاندیدا آلیکس بسیار خوب بود؛ ولی MIC آن نسبت به MIC حاصله در مطالعه Giordani و همکاران (۲۴) بالاتر بود که می‌توان دلیل آن را به تفاوت تیپ آویشن مورد استفاده و یا روش کار نسبت داد. در مرحله بعد Giordani و همکاران (۲۴) استفاده توأم از روغن ضروری تیموس ولگاریس و آمفوتریسین B در درمان بیماری‌های قارچی را بررسی نمودند. در موارد کاندیدیازیس دهانی نیز می‌توان با بررسی کامل نسبت به ترکیب درمانی آویشن و نیستاتین و یا سایر داروهای ضدقارچی مطالعه نمود که در مطالعات بعدی محقق مورد توجه قرار خواهد گرفت.

در مطالعه یحیی‌زاده و همکاران روغن‌های تیموس ولگاریس که بالاترین فعالیت ممانعت را داشتند؛ توسط روش GC-MS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میزان فعالیت به ترتیب فنل‌ها (بیشترین فعالیت)، الکل‌ها، الدنیدها، کتون‌ها، اترها و هیدروکربن‌ها اعلام شد (۲۵).

در مطالعه Salguero و همکاران فعالیت ضدقارچی روغن ضروری *Origanum virens* علیه کاندیدا آلیکس بررسی و دامنه حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد $0/16-0/32 \mu\text{l/ml}$ ذکر گردید (۲۶) که تقریباً با نتایج حاصل از مطالعه ما همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از آویشن به عنوان یک داروی ضدقارچی در درمان کاندیدیازیس استفاده نمود؛ اما مورت نمی‌تواند رشد کاندیدا آلیکس را مهار نماید. همچنین اثر سینرژستیک عصاره مورت بر فعالیت ضدقارچی عصاره آویشن، در غلظت‌های بالاتر به دلیل قوی‌تر بودن اثر عصاره آویشن به تنهایی مشهود نبود؛ ولی در غلظت‌های پایین‌تر ($0/195$ ، $0/390$ و $0/975$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره مورت اثر سینرژستی خود را به صورت افزایش زمان مورد نیاز برای رشد کلنی‌های مخمری (از روز پنجم به روز هفتم) و نیز کاهش تعداد کلنی‌های رشد یافته (کاهش تعداد کلنی‌ها از غیرقابل شمارش و 143 کلنی به ترتیب به تعداد 200 و 24 برای رقت‌های 10^1 و 10^{-1}) نشان داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی (شماره 5175187120501) مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان) بود و بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی آن دانشگاه به خاطر حمایت مالی از طرح، سپاسگزاری می‌گردد.

غلظت $0/195 \mu\text{l/ml}$ عصاره آویشن، مشخص می‌گردد که تعداد کلنی‌های مشاهده شده بسیار کمتر شده است. به طوری که در بررسی اثر عصاره آویشن با غلظت $0/195 \mu\text{l/ml}$ پس از روز چهارم در رقت 10^1 از سوسپانسیون مخمری تعداد کلنی‌ها غیرقابل شمارش بود. در حالی که در غلظت $0/390 \mu\text{l/ml}$ از مخلوط دو عصاره، تعداد کلنی‌های مشاهده شده 200 عدد در روز هفتم بود. این روند کاهش مشاهده تعداد کلنی در سایر رقت‌ها ادامه داشته و در رقت 10^{-1} برابر 24 و در رقت 10^{-2} برابر 3 کلنی در روز هفتم بوده است. در حالی که در رقت 10^{-3} و 10^{-4} هیچ کلنی مخمری رشد نمود که می‌تواند نشانگر اثر سینرژستی نسبی عصاره مورت بر عصاره آویشن باشد. همچنین در این مطالعه اثر ضد قارچی عصاره آویشن علیه کاندیدا آلیکس در غلظت $0/195 \mu\text{l/ml}$ تعداد کلنی‌های رشد یافته از رقت 10^{-1} و 10^{-2} سوسپانسیون مخمری در روز پنجم به ترتیب حدود 143 و 3 کلنی بود.

در مطالعه‌ای اثر مورت بر قارچ آسپرژیلوس بررسی و اثر ضدقارچی آن گزارش گردید (۱۶)؛ اما در مطالعه ما اثری بر مهار رشد کاندیدا نداشت که با نتایج حاصل از مطالعه نجیب‌زاده و همکاران (۱۵) که اثر مورت بر کاندیدیازیس دهانی را بررسی نمودند؛ همخوانی دارد. به طوری که در آن بررسی نیز غلظت‌های دو برابر MIC مورت نیز برای ریشه‌کنی کاندیدیازیس کافی نبود (۱۵). همچنین اربابی و همکاران اثر ضدقارچی آویشن بر کاندیدا آلیکس را در مقایسه با نیستاتین گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۲).

در مطالعه انجام شده در دانشگاه علوم پزشکی کرمان، اثر گیاه مورت بر قارچ‌های میکروسپوروم جیستوم، میکروسپوروم کانیس و تریکوفیتون متاگروفایتیس بررسی و اثرات ضدقارچی آن تایید و با اثرات گریزنوفولین مقایسه گردید (۲۳). به نظر می‌رسد اثر گیاه مورت بر درماتوفیت‌ها بسیار بهتر از کاندیدا آلیکس است. زیرا در مطالعه ما عصاره مورت دارای اثر بسیار کمی بر ممانعت از رشد کاندیدا آلیکس بود و فقط در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های بالا از عصاره مورت و رقت‌های پایین سوسپانسیون مخمری توانست از رشد مخمر جلوگیری نماید. لذا نمی‌توان آن را یک ماده موثر برای جلوگیری از رشد کاندیدا آلیکس معرفی نمود. براساس نتایج اثر سینرژستی مورت با آویشن در مقایسه با غلظت‌های مشابه از عصاره آویشن، بسیار کمتر بود.

در مطالعه Giordani و همکاران اثر ضدقارچی روغن‌های ضروری مختلف علیه کاندیدا آلیکس بررسی و بهترین اثر در تیموس ولگاریس مشاهده شد. به طوری که حداقل میزان ممانعت

References

- Hoepelman IM, Dupont B. Oral candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. *Int J Antimicrob Agents*. 1996 Feb;6(3):155-9.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Lea and Febiger. London: Philadelphia. 1992; pp: 280-5.
- Hay RJ. The management of superficial candidiasis. *J Am Acad Dermatol*. 1999; 40(6): S35-S42.
- Naeini A, Khosarvi AR, Chitsaz M, Shokri H, Kamnejad M. Anti-Candida albicans activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *Journal of Medical Mycology*. 2009; 19(3): 168-72.
- Johann S, Silva DL, Martins CVB, Zani CL, Pizzolatti MG, Resende MA. Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *World J of Microbiol Biotechnol*. 2008; 24(11): 2459-64.
- Reddy BMV, Angers P, Gosselin A, Arul J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*. 1998; 47(8): 1515-20.
- Begnami AF, Duarte MCT, Furletti V, Rehder VL. Antimicrobial Potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food Chemistry*. 2010; 118(1): 74-77.
- Zarei Mahmoudabadi A. [Antifungal Drugs]. 1st. Ahvaz: Ahvaz University of Medical Sciences. 2003; pp: 90-95. [Persian]
- Runyoro DK, Ngassapa OD, Matee MI, Joseph CC, Moshi MJ. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of *Candida* infections. *J Ethnopharmacol*. 2006 Jun; 106(2):158-65.
- Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Jan;29(1):81-8.
- Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2005 Feb;97(2):305-11.
- Al-Ramamneh EM. Plant growth strategies of *Thymus vulgaris* L. In response to population density. *Industrial Crops and Products*. 2009; 30(3): 389-94.
- Jordan M, Martinez R, Goodner K, Baldwin E, Sotomayor J. Seasonal variation of *thymus hymalis* Lange and Spanish *thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial crops and products*. 2006 Nov;24(3): 253-63.
- Sumbul S, Ahmed MA, Asif M, Akhtar M. *Myrtus communis* Linn. A review. *IJNPR*. 2011; 2(4): 395-402.
- Najib- Zadeh T, Yadegari MH, Naghdi Badi HA, Salehnia AN. [Antifungal efficacy of *Myrtus communis* essential oils on oral candidiasis in immunosuppressed rats]. *J Med Plants*. 2011; 2(38): 102-16. [Article in Persian]
- Mohammadi R, Mirhendi SH, Shadzi SH, Moattar F. [Antifungal activity of *Myrtus communis* L. essential oil against clinical isolates of *Aspergillus*]. *J Isfahan Med Sch*. 2008; 26(89): 105-11. [Article in Persian]
- Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Dec;20(6): 349-53.
- Akbari S. [Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. Against fluconazol-resistant and susceptible *Candida albicans* isolates]. *J Med Plants*. 2007; 6(1): 53-62. [Article in Persian]
- Pinto E, Salgueiro LR, Cavaleiro C, Palmeira A, Goncalves MJ. In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Ind Crop Prod*. 2007; 26(2): 135-41.
- Martin MV, Dinsdale RC. Nystatin-resistance of *Candida albicans* isolates from two cases of oral candidiasis. *Br J Oral Surg*. 1982 Dec;20(4):294-8.
- Shahidi Bonjar GH. Inhibition of Clotrimazol-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia*. 2003;75(1):74-6.
- Arbabi Klati F, Sherzaee M, Poorzaman M, Dabiri S. [Inhibitory effects of plant extracts containing thyme, clove and cinnamon compared to Nystatin on *Candida albicans*. (In vitro)]. *J Res Dent Sci*. 2012; 8 (4) :175-9. [Article in Persian]
- Ayatollahi Mousavi SA, Abdollahi H, Kazempour N. [Investigation of antifungal activity of 10 Methanol extracts of medicinal Herbs]. *J Kerman Univ Med Sci*. 1996; 3(3):122-15. [Article in Persian]
- Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res*. 2004 Dec; 18(12):990-5.
- Yahyazadeh M, Omidbaigi R, Zare R, Taheri H. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24(8):1445-50.
- Salgueiro LR, Cavaleiro C, Pinto E, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Palmeira A, et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. *Planta Med*. 2003 Sep;69(9):871-4.

Original Paper

Effect of *Thymus vulgaris*, *Myrtus communis* and nystatin on *Candida albicans*

Zia MA (PhD)*¹, Bayat M (PhD)², Khalkhali H (BSc)³, Saffari S (MSc)⁴

¹Assistant Professor, Department of Basic Science, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. ²Assistant Professor, Department of Veterinary, Tehran Science and Research, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ³BSc of Laboratory Science, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. ⁴MSc of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Candida albicans* is the most frequent etiological agent of oral candidiasis. This study was done to compare the anticandidal effect of *Thymus vulgaris* and *Myrtus communis* to nystatin on *Candida albicans*.

Materials and Methods: In this laboratory study thirty-two strains of *Candida albicans* isolated from patients with oral candidiasis. Yeast suspension of *Candida* yeast cells was provided, subsequently a serial dilution from *Thymus vulgaris* and *Myrtus communis* and Nystatin in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) medium were prepared. Then a loop of *Candida* suspension was cultured on all of the solid media and was incubated at 25°C. The findings of fungus growing were recorded during 7 days.

Results: MIC of *Thymus vulgaris*, *Myrtus communis* L, mix of these essences and Nystatin was 0.390 µl/ml, 12.5 µl/ml, 0.78 µl/ml and 160 IU/ml, respectively.

Conclusion: *Thymus vulgaris* contained antifungal activity against *Candida albicans*, but *Myrtus communis* demonstrated a very low activity against *Candida albicans*.

Keywords: *Candida albicans*, Nystatin, *Thymus vulgaris*, *Myrtus communis* L

* Corresponding Author: Zia MA (PhD), E-mail: zia.mohammadali@gmail.com

Received 8 July 2012

Revised 10 November 2012

Accepted 6 December 2012