

Evaluation of Antifungal Effects of Aqueous Extract of *Mentha Longifolia* Using 0.2% Chlorhexidine on Clinical Isolates of *Candida Albicans* from Oral Cavity of Patients with Leukemia

Matineh Taftian¹, Ensieh Lotfali^{2*}, Sareh Farhadi³, Maryam Jolehar³

1. Faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received: 2019/07/24

Accept:2019/10/6)

Abstract

Background: *Candida* species have recently been attracted by the emergence of resistant strains against antifungal agents. Antifungal agents are usually accompanied with side effects. Plant products have been used traditionally as alternative medicine to cure candidiasis. So, it seems vital to find new antimicrobial agents with fewer side effects. In the present survey, we aimed to evaluate the antifungal effects of aqueous extracts of *Mentha longifolia* against oral pathogenic candida species.

Methods: The current experimental study was conducted on *Candida albicans* (ATCC10261) and 10 *Candida albicans* isolated from leukemia (AML and ALL) patients with thrush. The antifungal activities and minimum inhibitory concentrations (MIC) of *Mentha longifolia* extracts were evaluated and then MIC results were compared with those of Chlorhexidine and nystatin.

Results: *Mentha longifolia* extracts showed antifungal properties. MIC results of the extracts were in the range of 31.25 to 125 µg/ml, while MIC of Chlorhexidine were in the range of 125 to 250 µg/ml. Also, no significant difference was observed between MIC of standard species and clinical isolates of *Candida albicans* ($P>0.05$). According to the results, aqueous extract of *Mentha longifolia* was more successful in the inhibition of growth of *Candida* isolates as compared to that of Chlorhexidine ($P<0.001$).

Conclusions: The inhibitory effects of *Mentha longifolia* extract have shown that it has the potentials to be considered as a promising candidate for the development of antifungal agent for the treatment of thrush.

Keywords: Minimum inhibitory concentration; *Mentha longifolia* extract; *Candida* species.

*Corresponding author: Ensieh Lotfali

Email: ensiehltofali@sbmu.ac.ir, ensiehltofali@yahoo.com

بررسی اثر ضد قارچی عصاره آبی گیاه پونه (*Mentha longifolia*) با کلرگزیدین ۰٫۲ درصد بر ایزوله‌های بالینی کاندیدای آلبیکنس جدا شده از حفره دهانی بیماران مبتلا به لوسمی

متینه تفتیان^۱، انسیه لطفعلی^{۲*}، ساره فرهادی^۳، مریم جوهر^۳

۱- دانشجوی رشته دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی
 ۲- گروه انگ لشناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
 ۳- گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۰۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۱۴

چکیده:

سابقه و هدف: به تازگی گونه‌های کاندیدا با ظهور سویه‌های مقاوم در برابر عوامل ضد قارچ مورد توجه قرار گرفته‌اند. داروهای ضد قارچ با عوارض جانبی همراه هستند. محصول‌های گیاهی به طور سنتی به عنوان داروی جایگزین برای درمان کاندیدیازیس استفاده شده است. بنابراین به نظر می‌رسد یافتن مواد ضد میکروبی جدید که عوارض جانبی کمتری دارند، حیاتی است. در این مطالعه، ما به بررسی آثار ضد قارچی عصاره‌های آبی گیاه پونه (*Mentha longifolia*) بر روی گونه‌های کاندیدای بیماری‌زای دهان پرداختیم.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی روی کاندیدا آلبیکنس (ATCC ۱۰۲۶۱) و ۱۰ گونه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از حفره دهانی بیماران لوسمی (*ALL*, *AML*) مبتلا به برفک انجام شد. فعالیت ضد قارچی و حداقل غلظت مهارکننده عصاره *Mentha longifolia* بررسی و سپس نتایج MIC با کلرگزیدین و نیستاتین مقایسه شد. نتایج با آزمون ANOVA بررسی شد.

نتایج: میزان MIC عصاره در محدوده ۳۱/۲۵ تا ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در حالی که MIC کلرگزیدین در محدوده ۱۲۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین اختلاف معناداری بین MIC گونه‌های استاندارد و ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس مشاهده نشد.

($P > ۰/۰۵$). براساس نتایج، عصاره آبی گیاه پونه در مهار رشد ایزوله‌های کاندیدا در مقایسه با کلرگزیدین ($P < ۰/۰۰۱$) موفق‌تر بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد اثر مهارتی عصاره گیاه پونه نشان داده است که این گیاه می‌تواند به صورت بالقوه به عنوان یک کاندید برای توسعه داروی ضد قارچی در درمان برفک در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: حداقل غلظت مهارتی رشد، عصاره پونه، گونه‌های کاندیدا

مقدمه:

(۵). عوامل زمینه‌ساز کاندیدیازیس دهانی شامل: تغییر فلور میکروبی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده، کورتیکو سترئوئیدها و سایر داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی، استفاده طولانی از دهان‌شویه‌ها، دنچرها (دندان مصنوعی) و دستگاه‌های ارتودنسی، مصرف سیگار، بهداشت ضعیف دهان و بارداری هستند (۶). اقدام مناسب برای درمان کاندیدیازیس، شناسایی عامل اتیولوژی، حذف عوامل مستعد کننده و استفاده از داروهای ضد قارچی در درمان است. با توجه به ظهور گونه‌های مقاوم قارچی به خصوص گونه‌های کاندیدا در عفونت‌های کاندیدیایی، ضرورت کشف داروهای جدید با عوارض جانبی کم‌تر احساس می‌شود. به دلیل تفاوت در نوع و درصد ترکیب‌های دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی در مخمرها،

کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین مخمر فلور طبیعی دهان است و در شرایط مناسب سبب ایجاد فرم‌های بالینی کاندیدیازیس دهانی مانند برفک می‌شود (۱). اگرچه جنس کاندیدا بخشی از میکرو فلور کامنسال دهان را تشکیل می‌دهند اما در صورت وجود عوامل مستعدکننده در میان میزبانان ناتوان و مبتلا به ضعف سیستم ایمنی می‌تواند عفونت‌های فرصت‌طلب ایجاد کند (۲، ۳). در سال‌های اخیر، موارد گزارش شده کاندیدیازیس دهانی افزایش یافته است، به طوری که گونه‌های کمتر بیماری‌زای کاندیدا هم از ایزوله‌های بالینی کاندیدیازیس دهانی جدا شده است (۴).

نویسنده مسئول: انسیه لطفعلی

پست الکترونیک: ensiehotfali@sbbmu.ac.ir ensiehotfali@yahoo.com

پوشانده و پس از گذشت چهار ساعت محتویات ظرف به کمک کاغذ صافی (کاغذ واتمن ۴۲) در محیط آزمایشگاه صاف شد. ظرف حاصل به مدت ۲۴ ساعت روی بن ماری قرار داده شد، پس از تخییر حلال، عصاره خشک حاصل شد که تا زمان مصرف در دمای یخچال نگهداری شد.

تهیه محیط کشت RPMI:

با توجه به دستورالعمل موجود در بروشور، محیط کشت RPMI (Invitrogen, ۱۶۴۰، GIBCO) تهیه شد. سپس محلول RPMI را فیلتر کرده که برای این منظور از پمپ خلا استفاده شد. RPMI فیلتر شده را داخل شیشه‌های مخصوص گذاشته و داخل یخچال نگهداری شد.

تهیه سوسپانسیون قارچی:

در این تحقیق گونه استاندارد کاندیدا آلیکنس ۱۰۲۶۱ (ATCC American Type Culture Collection) تهیه شد. ۱۰ ایزوله بالینی کاندیدا آلیکنس از دهان بیماران مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستی یا میلویدی (AML-ALL) یا برفک دهانی پیشرفته جدا شده بود. نمونه برداری به وسیله کشیدن سواب استریل در جهت‌های مختلف بر سطح مبتلا در حفره دهانی انجام شده بود و ایزوله‌ها در کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی موجود بود. ایزوله‌ها روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Germany Merck) کشت داده شد و در انکوباتور ۳۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. از کلنی مخمری کاندیدا که در مرحله لگاریتمی و فاز رشد بود، برداشت کرده و درون لوله آزمایش حاوی ۵ سی سی آب مقطر، ریخته شد و کاملاً حل شد. سپس با اسپکتروفوتومتر (Apel, Japan, ۳۰۳PD) با طول موج ۵۳۰ نانومتر، با بلانک آب مقطر و خوانش ترانس میتنس (T) نور عبوری اندازه‌گیری شد که نور عبوری ۷۵ تا ۷۷ درصد معادل $10^2 \times 5$ CFU/ml سلول قارچی است. طبق پروتکل CLSI، با آب مقطر استریل آنرا به میزان یک به ۱۰ رقیق کرده (۹ میلی‌لیتر آب مقطر + یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه)، سپس سوسپانسیون ثانویه و جدید را با افزودن RPMI به میزان یک به ۱۰۰ رقیق کرده (۹/۹ میلی‌لیتر RPMI به همراه ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون ثانویه). بعد از افزودن محیط RPMI و عصاره پونه به همراه سوسپانسیون قارچی، تعداد سلول‌های مخمری در هر چاهک برابر با $10^2 \times 2/5$ CFU/ml شد.

تهیه رقت‌های مختلف عصاره آبی گیاه پونه در میکروپلیت و تعیین MIC:

ابتدا در همه چاهک‌های میکروپلیت، محیط کشت RPMI به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد. سپس در ردیف A چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره (با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس با سمپلر پس از up & down کامل از چاهک اول که حاوی عصاره و محیط کشت بود، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شده و به چاهک دوم اضافه شد و دوباره پس از up & down کامل، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم اضافه شد. این کار را به همین ترتیب تا چاهک دهم تکرار شده و ۱۰۰ میکرولیتر آخر دور ریخته شد. این کار در ردیف دوم و سوم میکروپلیت نیز تکرار شد. چاهک شماره ۱۱ کنترل مثبت حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی و چاهک شماره ۱۲ کنترل منفی حاوی محیط کشت است. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به تمام چاهک‌ها تا چاهک شماره ۱۱ اضافه شد. در ردیف A و B و C عصاره آبی پونه، در ردیف E و F و D کلرگزیدین ۰/۲ درصد (Pishgaman chemistry, Iran) و در ردیف H و G داروی نیستاتین (Sigma-Aldrich, USA) به عنوان کنترل دارویی مورد آزمون قرار گرفتند. میکروپلیت را روی دستگاه shaker به مدت سه دقیقه قرار داده تا کاملاً هموزن شد. سپس به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور نگه داشته و پس از هر بازه زمانی MIC گزارش شد. این آزمایش‌ها را سه بار تکرار کرده و برای تایید نتایج MIC، از رقت بالاتر MIC، لام میکروسکوپی تهیه شد و در زیر میکروسکوپ رشد یا نبود رشد مخمرهای کاندیدا آلیکنس مشاهده شد. نتایج به دست آمده MIC با روش آماری ANOVA (آنالیز واریانس یک طرفه) و یافته‌های میانگین و انحراف از معیار با نرم‌افزار SPSS Ver: (۲۱/۰) تجزیه و تحلیل شد. میزان value P کمتر از ۰/۰۱ در این مطالعه از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

بیشتر ایزوله‌های بالینی کاندیدا با قارچ‌های رشته‌ای نسبت به عوامل ضدقارچی حساس تر هستند (۷). تعامل بین گونه کاندیدا و میزبان بسیار پیچیده است و به چندین فاکتور بستگی دارد. تغییر فنوتیپی از فرم کامنسال به فرم بیماری‌زا با تغییر محیطی داخل دهان و مجموعه‌ای از عوامل موضعی، سیستمیک و مرتبط به ابزار پزشکی مانند دندان مصنوعی مرتبط است. در محیط دهانی، هرگونه تغییر قابل توجهی می‌تواند بر رشد باکتری و قارچ تاثیر بگذارد و تعادل طبیعی میکروبی را مختل کند که ممکن است به عفونت فرصت‌طلبانه منجر شود (۸). التهاب در بافت مخاطی به دلیل عملکرد آنزیم‌های خارج سلولی مخمر کاندیدا است (۹). ظهور گونه‌های مقاوم کاندیدا به داروهای ضدقارچی و مسائل مرتبط به ایمنی نگه‌دارنده‌های شیمیایی و داروها، محققان را بر آن داشته است تا به مطالعه عوامل ضد میکروبی از منابع طبیعی بپردازند، با فرض اینکه گیاهان دارویی عوارض جانبی کمتری دارند. بیش از ۲۵ هزار گونه گیاهی وجود دارد که برای اهداف پزشکی در فرهنگ‌های مختلف استفاده می‌شود (۱۰، ۱۱). از جمله گیاهان دارویی استفاده شده در درمان ضدباکتریایی، گیاهان خانواده پونه است. *Mentha longifolia* با نام عمومی پونه، که یکی از گونه‌های مهم نعناست (۱۲). تحقیق‌ها نشان داده است بیشترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس پونه کوهی شامل پولگون (۳۱/۵۴ درصد)، سینتول (۱۵/۸۹ درصد) است که ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند. تا کنون خواص ضد آسم، ضد اسپاسم، ضد نفخ، منقبض‌کننده کیسه صفرا، آرام‌بخش، ملین و حشره‌کشی این گیاه به تایید رسیده است (۱۳). چندین دهان‌شویه شیمیایی در بازار موجود است؛ کلرگزیدین (CHX) دهان‌شویه بسیار موثر برای جلوگیری از تشکیل پلاک دندان و حذف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند استرپتوکوک موتانس و کاندیدا آلیکنس است (۱۴). این دهان‌شویه به صورت نمک گلوکونات در دسترس است و طبیعت کاتیونی آن اجازه می‌دهد که با گذشت زمان آزاد شده تا یک اثر باکتریواستاتیک مداوم ایجاد کند. در اغلب مطالعه‌ها در مورد دهان‌شویه، CHX به عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی اثربخشی سایر محصولات استفاده می‌شود (۱۵). روند اثر کلرگزیدین روی میکروارگانیسم‌ها شامل اتصال به میکروارگانیسم و افزایش نفوذپذیری غشای سلولی و نشت محتویات سیتوپلاسمی به خارج از سلول است. اثر دهان‌شویه کلرگزیدین به عنوان یک دهان‌شویه ضد قارچ برای درمان کاندیدایازیس در مطالعه‌های فراوانی بررسی شده است (۱۶). با این حال، کلرگزیدین عوارض جانبی متعددی دارد؛ مانند تغییر رنگ ناخوشایند، طعم ناخوشایند و ایجاد خشکی و سوزش در دهان که به نارضایتی بیمار منجر می‌شود. به نظر می‌رسد استفاده از ضدعفونی‌کننده‌های گیاهی ایمن‌تر از ترکیب‌های شیمیایی مانند کلرگزیدین است (۱۷، ۱۸).

با توجه به اینکه تاکنون مقایسه‌ای بین عصاره آبی گیاه پونه و کلرگزیدین ۰/۲ درصد بر میزان رشد کاندیدا آلیکنس انجام نشده است، بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی فعالیت تاثیر عصاره آبی گیاه پونه در برابر یک گونه استاندارد کاندیدا آلیکنس و ۱۰ ایزوله بالینی کاندیدا آلیکنس جدا شده از بیماران لوسمی مبتلا به برفک دهانی در محیط *in vitro* (به مدت هفت ماه از آبان ماه ۱۳۹۷ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۸ در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) طراحی شد تا در نهایت نتایج ضدقارچی با کلرگزیدین ۰/۲ درصد مقایسه شود.

مواد و روش‌ها:

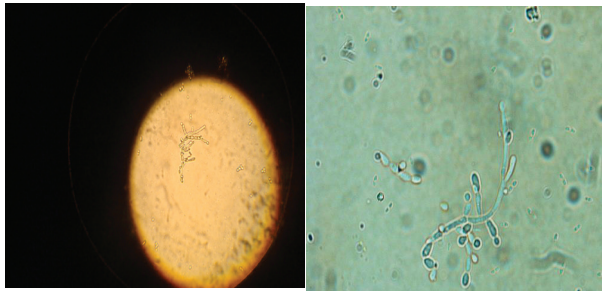
این مطالعه به روش تجربی (*in vitro*) انجام شد. متغیرهای تحقیق غلظت عصاره پونه و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) بودند. شرط ورود به مطالعه، وجود علائم بالینی برفک دهانی بوده است و بیمارانی که در حال استفاده از داروی ضدقارچی گیاهی بودند، از مطالعه خارج شدند. آزمایش‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره پونه بر اساس روش رقت‌سازی با سه تکرار در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (Roskilde, Denmark) انجام شد.

تهیه عصاره:

۱۲۲ گرم از پودر برگ گیاه پونه بعد از آسیاب شدن، به دو لیتر آب مقطر در حال جوش اضافه شد و سریع از روی حرارت برداشته شد. سپس در ظرف را با فویل

یافته‌ها:

نمونه سوآب دهانی از برفک حفره دهانی ۱۰ بیمار مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستی یا میلویدی (AML-ALL) تهیه شد. بیماران شامل پنج مرد و پنج زن با سن $13/5 \pm 45/1$ سال بودند. طول مدت بستری در بیمارستان به طور میانگین $9/17 \pm 36/9$ بوده است. ۵۰ درصد از ایزوله‌های کاندیدا آلبیکس از بیماران لوسمی میلویدی حاد (AML) و بقیه از بیماران لوسمی لنفوبلاستیکی حاد (ALL) جدا شده بود که همه بیماران در زمان نمونه‌گیری از داروهای سیپروفلوکسازین، آسیکلوویر، فلوکونازول و ایتراکونازول به عنوان پروفیلاکسی استفاده می‌کردند.

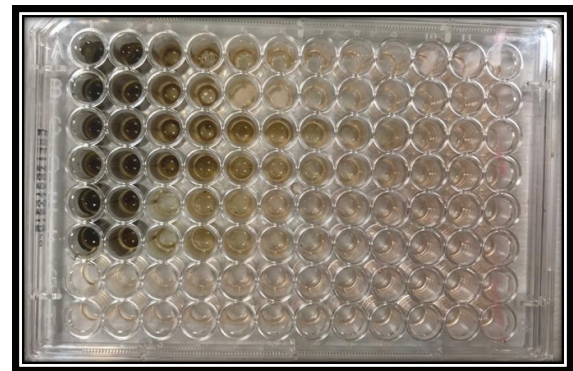


شکل ۲. گونه استاندارد کاندیدا آلبیکس با MIC (Minimum inhibitory concentration) $62/5$ میکروگرم بر میکرولیتر که در برابر عصاره پونه در رقت $31/25$ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولید جوانه کرده است و رشد کرده است. قابل ذکر است، تفاوت بین MIC گونه استاندارد کاندیدا آلبیکس (10261 ATCC) و MIC ایزوله‌های بالینی از لحاظ آماری معنادار نبود ($P > 0.05$). نتایج MIC در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت یکسان بود. از آنجا که پس از سه بار تکرار کردن آزمایش‌ها از مجاورت عصاره و کلر هگزیدین با گونه کاندیدا، نتایج MIC مشابهی حاصل شد نتایج به صورت یک عدد گزارش شد و آنالیز واریانس انجام شد.

بحث:

نتایج حاصل در این بررسی از تأثیر بهتر عصاره گیاه پونه در مقایسه با دهان‌شویه کلر هگزیدین روی تمامی گونه‌های کاندیدا آلبیکس حکایت داشت. علاوه بر عوامل ضدقارچی که برای پیشگیری و درمان برفک دهانی استفاده می‌شوند دهان‌شویه‌ها مانند کلر هگزیدین جایگاه ویژه‌ای دارند که به دلیل طیف اثر وسیع ضد میکروبی و از طرفی بقای مناسب و پایدار در دهان رایج‌تر است. اما عوارض جانبی مانند تولید رنگدانه و تشکیل جرم در قسمت بالای لثه سبب شده تا محققان به دنبال محلول‌هایی جایگزین باشند. در این راستا کاربرد ترکیب‌های گیاهی به عنوان دهان‌شویه در تولیدات و محصولات دارویی مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با توجه به اینکه اثر عصاره آبی گیاه پونه (*Mentha longifolia*) و مقایسه آن با کلر هگزیدین $0/2$ درصد و نیستاتین روی میزان رشد جنس کاندیدا تا به حال بررسی نشده است برنامه‌ریزی شد. تأثیر عصاره بر اساس نتایج MIC بر میزان رشد کاندیدا آلبیکس استاندارد و 10 ایزوله بالینی مقایسه شد. داده‌ها نشان داد که عصاره آبی پونه در مهار رشد ایزوله‌های کاندیدا آلبیکس موثر است. با توجه به نتایج تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین MIC گیاه پونه ($62/5 \pm 0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کلر هگزیدین $0/2$ درصد (125 ± 0 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و نیستاتین

رقت‌های تهیه شده از عصاره پونه معادل $500 - 250 - 125 - 62.5 - 31.25 - 15.62$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این آزمایش برای هر ماده سه بار تکرار شد. (شکل ۱)



شکل ۱. میکروپلیت حاوی عصاره پونه رقت‌سازی شده نتایج میزان حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) برای گونه استاندارد و ایزوله‌های بالینی در مقابل عصاره پونه، کلر هگزیدین $0/2$ درصد و نیستاتین با سه بار تکرار در جدول شماره یک ارائه شده است.

جدول ۱: نتایج MIC (Minimum inhibitory concentration) عصاره پونه با کلر هگزیدین و نیستاتین به روش میکروداپلوشن برات روی گونه استاندارد و ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکس برای تایید نتایج MIC، از رقت بعد از MIC های موثر، لام میکروسکوپی تهیه شد و در زیر میکروسکوپ رشد یا عدم رشد مخمرهای کاندیدا آلبیکس مشاهده شد. (شکل ۲)

شماره ایزوله‌ها	ATCC	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	P value
		عصاره پونه	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۳۱/۲۵	
MIC (میکروگرم بر میکرولیتر) کلر هگزیدین ۰,۲%	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	
نیستاتین (دامنه ۱-۲)	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	

گیاه گزارش شده است. MIC گزارش شده برابر با ۳۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی کاندیدا آلیکس بوده است. در این بررسی حلال الکلی بوده و گونه استاندارد کاندیدا ATCC ۱۴۰۵۳ بوده است (۲۴).

فروزان حیدری و همکاران (۲۰۱۵) خاصیت ضد باکتریایی (*Mentha longifolia*) علیه باکتری *Salmonella typhimurium* بررسی کردند. در این تحقیق با عصاره اتانولی گیاه پونه و روش رقت سازی، MIC گزارش شده علیه گونه سالمونلا پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۲۵).

در تحقیق حاضر، ایزوله‌های بالینی از بیمارانی که مبتلا به لوسمی میلویدی حاد و لنفوییدی حاد بودند، تهیه شد. استفاده از داروهای کورتیکوستروئید و سایر داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی در این دسته از بیماران شرایط را برای بیماری‌های فرصت‌طلب قارچی مانند کاندیدیازیس مهیا می‌کند. با توجه به نتایج این تحقیق و تاثیر مناسب عصاره پونه، جای امیدواری خواهد بود که بتوان از این عصاره در قالب دهان‌شویه برای درمان برفک دهانی همراه با داروهای ضدقارچی در این دسته از بیماران استفاده کرد. در تحقیق حاضر هیچ محدودیتی در انجام کار وجود نداشت. پیشنهاد می‌شود با توجه به موثر بودن عصاره پونه بر رشد کاندیدا آلیکس در مقایسه با کلرهگزیدین ۰/۲ درصد، در پژوهش‌های بعدی مواد موثره در گیاه پونه با روش HPLC ارزیابی شود تا بتواند از لحاظ کاربردی به عنوان دهان‌شویه مطرح شود.

نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد گیاه پونه دارای خاصیت ضد قارچی موثرتر از کلرهگزیدین ۰/۲ درصد است اما تاثیر کمتری در مقایسه با داروی نیستاتین دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتر در زمینه آثار سایر فرکشن‌ها و ترکیب‌های گیاه پونه با هر دو عصاره الکلی و آبی بر ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلیکس جدا شده از حفره دهانی انجام شود. با انجام تحقیق‌های جامع‌تر می‌توان به اهداف کاربردی این گونه تحقیق‌ها که تولید دهان‌شویه‌های گیاهی موثر و کارآمد با حداقل عوارض جانبی است، دست یافت.

قدردانی و تشکر:

از همکاری صمیمانه آقای دکتر سیدجواد سیدطیایی (استاد انگل‌شناسی پزشکی)، خانم مریم نوروزی (کارشناس آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)، مهندس محمدکمالی‌نژاد (پژوهشگر دانشکده داروسازی)، آقای دکتر خرازی (مشاور آماری دانشگاه دندانپزشکی دانشگاه تهران) سپاسگزاری می‌شود.

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی دکتری حرفه‌ای دندانپزشکی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد تهران، دانشجو متین تفتیان به شماره ثبت ۱۲۵۸، به راهنمایی خانم دکتر ساره فرهادی است.

(یک میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر گونه استاندارد کاندیدا آلیکس وجود دارد. نتایج MIC ایزوله‌های بالینی بیانگر افزایش تاثیر دو تا سه برابری عصاره پونه در مقایسه با دهان‌شویه کلرهگزیدین است. در مطالعه‌های گذشته آثار ضد قارچی گیاهان ارزیابی شده است و در این تحقیق برای نخستین بار فعالیت ضدقارچی عصاره آبی گیاه پونه با کلرهگزیدین ۰/۲ درصد و نیستاتین مقایسه شد.

حقیقتی و همکاران (۱۳۸۲) آثار ضد میکروبی عصاره‌های ۱۰ گونه گیاهی با دهان‌شویه کلرهگزیدین بر سه نوع میکروارگانیزم بیماری‌زای دهانی را بررسی کردند. در این تحقیق از عصاره گیاهان آویشن، میخک، اسطوخدوس، پوست انار، رزماریونوس، گلپ، گل انار، مازو، هلیله سیاه و بادرنجبویه استفاده کردند. گونه‌های میکروارگانیزم استفاده شده شامل اکتینوباسیلوس اکتینوماستوما، کاندیدا آلیکس و استریپتوکوک موتانس بود. نتیجه تحقیق موثر بودن عصاره گیاهی را نسبت به کلرهگزیدین نشان می‌دهد اما روش ارزیابی فعالیت ضدقارچی با روش چاهک‌گذاری و فقط یک غلظت از عصاره‌ها بوده است. روش عصاره‌گیری نیز با روش تحقیق حاضر متفاوت بوده است (۱۹).

زهر عطایی و همکاران (۱۳۸۶) آثار ضد قارچی و ضد باکتریایی دهان‌شویه‌های گیاهی پرسیکا، ماتریکا، ایرال و کس با کلرهگزیدین گلوکونات مقایسه کردند. سوش‌های بررسی شده در این تحقیق *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. sabrinus*, *A. viscosus*, *C. albicans* بودند. طبق نتایج، دهان‌شویه‌های گیاهی نسبت به کلرهگزیدین MIC کمتری داشتند. این به این معناست که دهان‌شویه گیاهی موثرتر عمل کرده است (۲۰).

مشابه نتایج تحقیق حاضر، Clement Jackson و همکاران (۲۰۰۹) خاصیت ضد میکروبی نیستاتین و گیاه *Euphorbia hirta* را بر کاندیدا آلیکس ارزیابی کردند که نیستاتین اثر ضدقارچی بهتری نسبت به گیاه مذکور نشان داد (۲۱).

Firas A Al-Bayati و همکاران (۲۰۰۹) ترکیب‌های ضد میکروبی عصاره الکلی (متانولی) برگ‌های گیاه پونه (*Mentha longifolia*) را در برابر هفت نوع میکروارگانیزم شناسایی کردند. فعالیت ضد قارچی این عصاره در مقابل کاندیدا آلیکس با MIC معادل ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. تفاوت در میزان MIC با تحقیق ما می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع عصاره (آبی یا الکلی) و همچنین استفاده از برگ گیاه است (۲۲).

مشابه تحقیق ما، Džamić AM و همکاران (۲۰۱۰) خاصیت ضد قارچی وضد اکسیدانی روغن ضروری گیاه پونه (*Mentha longifolia*) با روش رقت‌سازی در چاهک بررسی کردند. MIC گزارش شده در این تحقیق با نتیجه کار ما متفاوت است که می‌تواند به دلیل استفاده از روغن‌های ضروری و اسیدهای چرب موجود در گیاه به جای استفاده از خود گیاه پونه باشد (۲۳).

مهدی رضوی و همکاران (۲۰۱۲) برخی از فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه پونه (*Mentha Longifolia*) را بررسی کردند. هنگام این آزمایش خاصیت ضد قارچی

منابع:

- Ghasempour M, Sefidgar SAA, Eyzadian H, Gharakhani S. Prevalence of *Candida albicans* in dental plaque and caries lesion of early childhood caries (ECC) according to sampling site. *Caspian journal of internal medicine*. 2011;2(4):304.
- de Pinho Resende JC, Franco GR, Rosa CA, Hahn RC, Hamdan JS. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. *Revista iberoamericana de micología*. 2004;21(1):24-8.
- Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Point prevalence, microbi-

olgy and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Revista iberoamericana de micología*. 2005;22(2):83.

4. He X, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake L. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses*. 2006;49(2):80-4.

5. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS yeast research*. 2006;6(7):979-86.

6. Naeni A, Jalayer Naderi N, Shokri H, Davati A, Rabiei SM. Evaluation of the Antifungal Effects of Compound Mouthwash (*Cuminum cyminum*, *Melissa officinalis* and *Camellia sinensis*) on Standard Strain of *Candida albicans*. *Journal of Mashhad*

- Dental School. 2015;39(3):273-82.
7. ROUDBARI M, ROUDBAR MS, Hajimoradi M, TAGHI-ZADEH AM, GHASEMI SF, Vahidi M. Evaluation of antifungal activity of alcoholic extract and safranin of *Crocus sativum* on *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* growth in vitro. 2009.
 8. Harun WHAW, Razak FA. Antifungal susceptibility and growth inhibitory response of oral *Candida* species to *Brucea javanica* Linn. extract. BMC complementary and alternative medicine. 2013;13(1):342.
 9. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2002;49(1):7-10.
 10. Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. Archives of pharmacal research. 1998;21(3):348-52.
 11. Yu H, Oho T, Tagomori S, Morioka T. Anticariogenic effects of green tea. Fukuoka igaku zasshi= Hukuoka acta medica. 1992;83(4):174-80.
 12. Liu T, Chi Y. Experimental study on polyphenol anti-plaque effect in human. Zhonghua kou qiang yi xue za zhi= Zhonghua kou-qiang yixue zazhi= Chinese journal of stomatology. 2000;35(5):383-4.
 13. AKHBARI M, AGHAJANI Z, KARIMI E, MAZOOCHI A. Composition analysis of essential oil and biological activity of oily compounds of *Mentha longifolia*. 2016.
 14. Aghili H, Nadoushan AAJ, Herandi V. Antimicrobial effect of *Zataria multiflora* extract in comparison with chlorhexidine mouthwash on experimentally contaminated orthodontic elastomeric ligatures. Journal of dentistry (Tehran, Iran). 2015;12(1):1.
 15. Nguyen T, Tsang P, Shi W, Qi F. Dental caries and chemical warfare within the mouth. Journal of the California Dental Association. 2005;33(12):947-50.
 16. Pattison D, Silman A, Goodson N, Lunt M, Bunn D, Luben R, et al. Vitamin C and the risk of developing inflammatory polyarthritis: prospective nested case-control study. Annals of the rheumatic diseases. 2004;63(7):843-7.
 17. Amanlou M, Beitollahi JM, Abdollahzadeh S, Tohidast-Ekrad Z. Miconazole gel compared with *Zataria multiflora* Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2006;20(11):966-9.
 18. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: a randomized trial. Journal of Applied Oral Science. 2010;18(5):515-21.
 19. Haghghati F, Jafari S, BEYT EJ. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an in vitro study. 2003.
 20. Atai Z, Abdollahi H, Naderipour S, Mohammadi S. Comparison of antifungal and antibacterial effects of *Persica Matrica* and Iralwex with Chlorhexidine mouthwashes (An in vitro study). Journal of Dental School Shahid Beheshti University of Medical Sciences. 2007;25(1):58-65.
 21. Jackson C, Agboke A, Nwoke V. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. Journal of Medicinal Plants Research. 2009;3(9):666-9.
 22. Al-Bayati FA. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2009;8(1):20.
 23. Džamić AM, Soković MD, Ristić MS, Novaković M, Grujić-Jovanović S, Tešević V, et al. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. Botanica serbica. 2010;34(1):57-61.
 24. Razavi SM, Zarrini G, Molavi G. The evaluation of some biological activity of *Mentha longifolia* (L.) huds growing wild in Iran. Pharmacologia. 2012;3(10):535-8.
 25. Heydari F, Saeedi S, Hassanshahian M. Antibacterial activity of *Mentha longifolia* against *Salmonella typhimurium*. Advanced herbal medicine. 2015;1(3).