

Research Paper

Inhibitory Effect of *Nepeta Crispa* L. and *Nepeta Cataria* Extracts on *Candida Albicans* Growth: An In-vitro Study



*Mina Jazaeri¹, Shahrbanoo Radi², Bahman Rahimi³, Homayoon Kheyri⁴

1. Oral Medicine Department, Dental Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

2. Oral Medicine Specialist, Private Practice, Hamadan, Iran.

3. Dentist, Hamadan, Iran.

4. Avicenna Medicinal Plants Research Center, Hamadan, Iran.

Use your device to scan
and read the article online



Citation Jazaeri M, Radi SH, Rahimi B, Kheyri H. [Inhibitory Effect of *Nepeta Crispa* L. and *Nepeta Cataria* Extracts on *Candida Albicans* Growth: An In-vitro Study (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2022; 21(5):712-721. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.5.2822>



<https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.5.2822>



ABSTRACT

Background and Objectives Considering the existence of many medicinal plants in Iran and the high prevalence of oral candidiasis, the present study aims to evaluate the inhibitory effects of *Nepeta crispa* L. and *Nepeta cataria* extracts on *Candida albicans* growth.

Subjects and Methods After preparing the extracts of two plants, their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) for *C. albicans* were measured by broth microdilution method. The inhibitory effect of the extracts was evaluated by the disk diffusion method and measuring the diameter of inhibition zone. Data were analyzed in SPSS software, version 22. The significant level was set at 0.05.

Results The MIC of *N. crispa* L. and *N. cataria* extracts was 1.1 and 2.4 µg/mL, respectively. Their MLC was 4 and 6 µg/mL, respectively. The highest inhibition zone diameter was for nystatin (21.31 mm), while the lowest diameter was for *N. cataria* extract (11.60 mm). No significant difference was observed in the inhibition zone diameter between nystatin and *N. crispa* L. extract ($P>0.05$).

Conclusion The inhibitory effect of *N. crispa* L. extract on the *Candida albicans* growth is not significantly different from the effect of nystatin. Although *N. cataria* extract has inhibitory effect, its effect is significantly lower than the effect of nystatin.

Keywords Nystatin, Nepeta, *Candida albicans*, Oral candidiasis

Received: 16 Apr 2022

Accepted: 03 Jul 2022

Available Online: 22 Nov 2022

*Corresponding Author:

Mina Jazaeri, Assistant Professor.

Address: Oral Medicine Department, Dental Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Tel: +98 (913) 3176197

E-Mail: mina_jazayeri@yahoo.com

Extended Abstract

Introduction

Oral candidiasis is an opportunistic fungal infection in the oral mucosa. The most prevalent cause of this infection is *Candida albicans* [1]. Different topical and systemic medications such as polyenes, amphotericin B, and azoles are prescribed based on the severity of oral candidiasis [2]. *Nepeta cispa* L. is one of the native aromatic plants of Iran, which has significant antibacterial effects and high inhibition zone diameter shown in microbiological experiments [3]. *Nepeta cataria* is another aromatic plant belonging to the genus Nepeta of Lamiaceae family [4], which has antibacterial, antifungal and antiviral properties due to its pantolactone [5]. Considering the high prevalence of oral candidiasis, it is important to find efficient, safe, and cost-effective treatment options. Therefore, the current study aims to examine the inhibitory effects of the extracts of *N. cispa* L. and *N. cataria* plants on the growth of *C. albicans*.

Methods

N. cispa L. and *N. cataria* plants were collected from the medicinal plant garden of Agricultural Research Center in Hamedan, Iran. After removing thorns, the flowers and leaves of plants were dried under shade in the laboratory. The extracts prepared by the hydro-distillation method were placed in an autoclave for 15 minutes at 121°C for sterilization. The cultivated fungal chains were put in physiological serum to prepare a fungal suspension with a concentration of 0.5 McFarland. Plates containing 10 mL of Sabro dextrose agar culture medium were prepared. Then, using a sterile cotton swab impregnated with fungal suspension prepared from fresh *C. albicans* culture with a concentration of 0.5 McFarland, the surface of the plates

was uniformly inoculated. Blank disks were suspended in 10 mL of each plant extract at two minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC), and were placed on the plates. The same procedure was done for nystatin 100,000 IU as a positive growth control. A disk was placed on the plate after being suspended in 10 µL of the negative sterility control. After 48 hours of incubation at 37°C, the formation of a inhibition zone around the discs was investigated. The diameter of the inhibition zone was measured with a ruler in millimeters. Ten disks were used to evaluate the inhibition zone in the MIC and MLC of both plants, and their average was calculated. The collected data were analyzed in SPSS software, version 22 by one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test. The significance level was set at 0.05.

Results

Based on the findings of this study, the MIC for *N. cispa* L. and *N. cataria* extracts was 1.1 and 2.4 µg/mL, respectively. The MLC of the fungus was 4 µg/ml in the *N. cispa* L. extract and 6 µg/mL in the *N. cataria* extract. The inhibition zone diameter of disks impregnated with plant extracts at MIC and MLC and nystatin is shown in Table 1. The maximum inhibition zone diameter was related to the nystatin, and the lowest diameter was related to *N. cataria* extract. The results of one-way analysis of variance showed a statistically significant difference in the average inhibition zone diameter between nystatin and plant extracts ($P<0.001$). Pairwise comparison by Tukey's test showed that the inhibition zone around the disks impregnated with *N. cataria* plant extract was significantly lower than that around the disks impregnated with nystatin and *N. cispa* L. extract ($P<0.05$). However, there was no significant difference between inhibition zone around the disks impregnated with the MIC and MLC of *N. cispa* L. extract and nystatin ($P>0.05$).

Table 1. Minimum, maximum, Mean±SD of the inhibition zone diameter for *C. albicans* in disks impregnated with two plant extracts and nystatin (in mm)

Variables	Mean±SD	Minimum	Maximum
Nystatin	21.35±5.54	15	30.5
<i>N. cispa</i> L.	16.90±4.28	9	25
	18.10±2.42	12	21
<i>N. cataria</i>	11.60±2.54	8	16
	11.80±4.98	5	21

Conclusion

According to our findings, no statistically significant difference was observed between the inhibition zones in the disks impregnated with nystatin and *N. cиспа* L. extract at MIC and MLC, indicating their same effect compared to nystatin on *C. albicans* inhibition. The inhibition zone diameter caused by nystatin was significantly higher than that caused by MIC and MLC of *N. cataria* extract, indicating that the *N. cataria* plant is not effective as nystatin in inhibiting the growth of *C. albicans* and the increase in the concentration of its extract does not increase its effectiveness to a level same as that of nystatin. It can be concluded that the aqueous extract of *N. cиспа* L. plant has a significant inhibitory effect on the growth of *C. albicans* in the laboratory environment; its effect is not significantly different from the effect of nystatin. Although the aqueous extract of *N. cataria* plant relatively inhibits the growth of *C. albicans*, its effect is significantly lower than the effect of nystatin.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

In this study, all ethical principles were observed.

Funding

This article was extracted from the PhD thesis of Bahman Rahimi in Dentistry. The study was funded by [Hamadan University of Medical Sciences](#).

Authors contributions

Conceptualization: Mina Jazaeri, Shahrbanoo Radi; Methodology: Mina Jazaeri, Shahrbanoo Radi and Homayoon kheyri; Investigation: Bahman Rahimi; Writing—Original Draft, Writing – Review & Editing, Resources, Supervision: Mina Jazaeri.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Deputy for Research and Technology of [Hamadan University of Medical Sciences](#) for their financial support.

مقاله پژوهشی

اثر مهاری عصاره گیاه مفراح و نعناع گربه‌ای معطر بر روی رشد کاندیدا آلبیکانس: یک مطالعه آزمایشگاهی

*مینا جازایری^۱, شهربانو رعدی^۲, بهمن رحیمی^۳, همایون خیری^۴

۱. گروه بیماری‌های دهان و دندان، مرکز تحقیقات دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۲. متخصص بیماری‌های دهان و فک و صورت، همدان، ایران.

۳. دندانپزشک عمومی، همدان، ایران.

۴. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی بوعلی سینا، همدان، ایران.

Use your device to scan
and read the article online



Citation: Jazaeri M, Radi SH, Rahimi B, Kheyri H. [Inhibitory Effect of Nepeta Crispa L. and Nepeta Cataria Extracts on Candida Albicans Growth: An In-vitro Study (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2022; 21(5):712-721. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.5.2822>

doi: <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.5.2822>



چکیده

زمینه و هدف: با توجه به منابع غنی گیاهان دارویی در ایران و نیز شیوع بالای کاندیدیازیس دهانی، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر مهاری عصاره گیاه مفراح و نعناع گربه‌ای معطر بر روی رشد کاندیدا آلبیکانس انجام شد.

روش پژوهشی: بعد از تهیه عصاره گیاه مفراح و نعناع گربه‌ای، حدائق غلظت مهاری و کشنده‌گی عصاره‌ها برای کاندیدا بهروش براز میکرودیلوشن اندازه‌گیری شد. اثر عصاره این گیاهان در مهار رشد کاندیدا در محیط کشت بهروش دیسک دیفیوژن بررسی شد و هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. داده‌ها با نسخه ۲۲ نرمافزار SPSS در سطح معناداری <0.05 تحلیل شدند.

یافته‌ها حدائق غلظت مهاری برای مفراح و نعناع گربه‌ای به ترتیب $1/1$ و $2/4$ میکروگرم در میلی‌لیتر و حدائق غلظت کشنده‌گی قارچ براز مفراح 4 میکروگرم در میلی‌لیتر و برای نعناع گربه‌ای 6 میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر مربوط به نیستاتین ($21/31$) و کمترین ($11/60$) آن برای عصاره گیاه نعناع گربه‌ای بود. تفاوت آماری معناداری بین هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آغازته به نیستاتین و عصاره گیاه مفراح مشاهده نشد ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های مطالعه حاضر اثر مهاری عصاره گیاه مفراح بر رشد کاندیدا تفاوت آماری معناداری با عملکرد نیستاتین نداشت. عصاره آبی گیاه نعناع گربه‌ای معطر باعث مهار نسبی رشد کاندیدا می‌شود ولیکن این اثر بهصورت معناداری کمتر از نیستاتین است.

کلیدواژه‌ها: نیستاتین، پونه ساء، کاندیدا آلبیکانس، کاندیدیازیس دهانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱ فروردین ۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱ تیر ۱۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱ آذر ۰۱

* نویسنده مسئول:

مینا جازایری

نشانی: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، مرکز تحقیقات دانشکده دندانپزشکی، گروه بیماری‌های دهان و دندان.

تلفن: +۹۸ (۳۱۷) ۶۱۹۷

ایمیل: mina_jazayeri@yahoo.com

مقدمه

گیاه نعناع گربه‌ای معطر با نام علمی *Nepeta Volgaris* یا *Nepeta Cataria* نیز یکی دیگر از گیاهان آروماتیک متعلق به جنس پونه‌سا از خانواده نعناعیان است [۱۱]. این گیاه به دلیل داشتن پنتالاكتون دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و نیز ضدپیروزی است [۱۲].

امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی در درمان انواع بیماری‌ها و بالاخص عفونت‌ها با توجه به ابهاماتی در زمینه بی‌خطر بودن داروهای صنعتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تاریخچه قدیمی استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی کشور ما از یکسو و دسترسی به منابع غنی گیاهان دارویی از سوی دیگر باعث شده است انجام مطالعات در این زمینه گسترش بالایی داشته باشد. با توجه به شیوع بالای کاندیدیازیس دهانی، یافتن روش‌های درمانی مؤثر، بی‌خطر و کم‌هزینه ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی آزمایشگاهی اثر مهاری عصاره گیاه مفرح و نعناع گربه‌ای معطر^۱ بر رشد کاندیدا آلبیکانس انجام شد.

روش بررسی

در مطالعه، مصوب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی همدان [۱۳/۱۶/۱۰/۲۹]، به جهت بررسی اثر ضدقارچ کاندیدا آلبیکانس گیاه مفرح و نعناع گربه‌ای معطر حداقل غلظت مهارکنندگی و کشنندگی قارچ کاندیدا آلبیکانس برای هر ۲ گیاه محاسبه شد. سپس اثرات ضدقارچی آن‌ها در ۲ غلظت به دست آمده با داروی نیستاتین مقایسه شد.

تهیه گیاه و عصاره گیاهی

گیاهان مفرح و نعناع گربه‌ای از محل باغ گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی همدان جمع آوری شد. بعد از جدا کردن خار، سر شاخه‌های جمع آوری شده شامل گل و برگ‌ها، برای مدتی در محیط سایه درون آزمایشگاه خشک شدند.

تهیه عصاره گیاهی با استفاده از دستگاه کلونجر (ایران، تهران، امیل پیرکس) و به روش تقطیر با بخار آب (هیدرودیستیلاسیون) انجام شد. به این منظور بعد از آسیاب کردن گیاهان خشک شده، ۱۰۰ گرم از پودر به دست آمده درون دستگاه کلونجر ریخته شد و ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطراً به آن اضافه شد و فرایند تقطیر به مدت ۲ ساعت انجام شد. بعد از آبزدایی محلول توسط سدیم سولفات فاقد آب، عصاره به دست آمده در ویال‌های سیل شده جمع آوری شد و تا زمان استفاده در مکان تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. عصاره‌ها قبل از استفاده جهت استریلیزاسیون برای ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در اتوکلاو (ایران، اصفهان، فرازمه) قرار داده شدند.

4. *Nepeta Volguris*

کاندیدیازیس دهانی عفونت فرست طلب قارچی مخاط حفره دهان است که تظاهرات کلینیکی مختلفی از جمله کاندیدیازیس غشای کاذب، کاندیدیازیس اریتماتوز، انگولار کیلیتیس و گلوسیت لوزی شکل میانی زبان دارد [۱]. کاندیدا، شایع‌ترین مخمر حفره دهان است که در بدن میزان انسانی سالم معمولاً بدون ایجاد بیماری در سطح مخاط حفره دهان، دستگاه گوارش، دستگاه ادراری و واژن کلونیزه می‌شود [۲، ۳]. از آنجایی که باقیمانده‌های مواد غذایی در دهان و نیز سلول‌های اپیتلیالی متفلس شده، منبع تغذیه مناسبی برای قارچ‌ها محسوب می‌شوند، حفره دهان محل مناسبی برای رشد و تکثیر کاندیدا است [۴]. بروز تغییرات موضعی، بیماری‌های سیستمیک، تجویز گسترده آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف و داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی منجر به ایجاد عفونت‌های کاندیدایی حفره دهان می‌شود [۵، ۶]. از بین انواع مختلف کاندیدا، کاندیدا آلبیکانس به سبب داشتن فاکتورهای پاتوژنیتی بالاتر نسبت به سایر انواع گونه‌های کاندیدا، شایع‌ترین عامل عفونت‌های فرست طلب قارچی حفره دهان است [۲].

بسته به شدت کاندیدیازیس دهانی داروهای موضعی و سیستمیک مختلفی مانند پلی‌ان‌های، آمفوتریپسین B و آزول‌ها تجویز می‌شوند، هرچند که عدم تأثیر انتخابی، تداخل دارویی، طعم نامناسب و استفاده مکرر باعث بروز ناکارآمدی‌هایی در درمان با این داروها شده است [۱]. به عنوان مثال آمفوتریپسین B به خاطر اثر غیرانتخابی بر چربی غشای سلول‌ها علی‌رغم اثربخشی بالا سمتیت قابل توجهی ایجاد می‌کند. ژل خوراکی مایکونازول باعث افزایش اثر ضدانعقادی وارفارین می‌شود. طعم تلخ داروی نیستاتین و نیاز به استفاده مکرر آن طی روز باعث کاهش همکاری بیماران در تکمیل دوره درمان می‌شود. به علاوه افزودن شیرین‌کننده‌ها برای غلبه بر این مشکل منجر به بروز پوسیدگی‌های دندانی می‌شود که خود یکی دیگر از مشکلات این دارو است [۸، ۷].

گیاهان آروماتیک جنس پونه سا^۲، متعلق به خانواده نعناعیان^۳ هستند. مفرح^۴ از گیاهان بومی ایران است که در دامنه‌های کوه الوند در استان همدان می‌روید. افراد محلی از این گیاه جهت آرام‌بخشی، تقویت معده، درمان نفخ رفع اختلالات تنفسی و گوارشی و همچنین ضدعفونی کردن زخم‌ها استفاده می‌کنند [۹]. مقایسه اثر مفرح با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان داده است که این گیاه اثر ضدباکتریایی قوی دارد و در مطالعات میکروب‌شناسی هاله عدم رشد بالای نشان می‌دهد [۱۰].

1. *Nepeta*
2. *Lamiaceae*
3. *Nepeta Cispa*

تهیه سوسپانسیون قارچی

آزمایش دیسک گذاری

دیسک گذاری به منظور اندازه گیری هاله عدم رشد استفاده شد. پلیت های حاوی ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت سابرو دکستروز آگار تهیه شد. سپس با استفاده از سوپا پنبه ای استریل آغشته به سوسپانسیون قارچی تهیه شده از کشت تازه کاندیدا آلبیکانس با غلظت معادل نیم مکفارلنند، سطح پلیت ها به طور یکنواخت تلقیح شد. دیسک های بلانک در ۱۰ میکرولیتر از عصاره هر گیاه و در ۲ غلظت، حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشنندگی، تعلیق شدند و روی پلیت ها قرار داده شدند. همین کار برای قطره نیستاتین ۱۰۰۰۰ واحد به عنوان کنترل مثبت هم انجام شد. یک دیسک در ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق کننده جهت کنترل منفی تعلیق شد و بر روی پلیت قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تشکیل هاله عدم رشد در پیرامون دیسک ها مورد بررسی قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد با خط کش برحسب میلی متر اندازه گیری شد. هاله عدم رشد حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشنندگی هر ۲ گیاه به وسیله ۱۰ دیسک بررسی و میانگین آنها محاسبه شد.

تحلیل آماری

داده ها توسط نسخه ۲۲ نرم افزار آماری SPSS جمع آوری و توسط آزمون های تحلیل واریانس یک سویه^۷ و تست تکمیلی توکی در سطح معناداری ۰/۰۵ آر زایی شد.

یافته ها

براساس داده های این مطالعه، حداقل غلظت مهاری برای گیاه مفراح و گیاه نعناع گربه ای معطر به ترتیب ۱/۱ و ۲/۴ میکرو گرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت کشنندگی قارچ برای گیاه مفراح ۴ میکرو گرم بر میلی لیتر و برای گیاه نعناع گربه ای ۶ میکرو گرم بر میلی لیتر بود.

جدول شماره ۱ قطر هاله عدم رشد دیسک های آغشته به عصاره های گیاهی با حداقل غلظت مهاری و نیز حداقل غلظت کشنندگی و داروی نیستاتین را نشان می دهد. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به داروی نیستاتین و کمترین آن مربوط به حداقل غلظت مهاری گیاه نعناع گربه ای بوده است.

نتایج آزمون آماری کولموگروف اسمیرنوف^۸ نشان داد توزیع آماری داده ها در هر ۴ گروه نرمال بود ($P < 0.05$). بنابراین جهت مقایسه هاله عدم رشد عصاره های گیاهی در حداقل غلظت مهاری نیز حداقل غلظت کشنندگی و داروی نیستاتین از تحلیل آماری واریانس یک سویه استفاده شد.

7. One-way ANOVA
8. Kolmogorov-Smirnov

در این مطالعه از سویه استاندارد کاندیدا آلبیکانس (ATCC5982) استفاده و کشت قارچ ها در محیط سابرو دکستروز آگار (آلمان، دارمشتات، مرک) انجام شد. به منظور تهیه سوسپانسیون قارچی با غلظت ۰/۵ مک فارلنند که غلظتی استاندارد جهت بررسی آثار ضد قارچی است و حاوی $10^{1-1.5}$ سلول در میلی لیتر قارچ است، زنجیره های قارچی کشت شده درون سرم فیزیولوژی قرار گرفتند. برای دستیابی به این غلظت، کدورت سوسپانسیون قارچی به نحوی تعیین شد که میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر دستگاه اسپکترو فوتومتر (Staffordshire UK، JENWAY) معادل ۰/۰۸ تا ۰/۱ باشد.

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی

حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره های گیاهی به روش براحت میکرو دیلوشن به کار برد شد. برای رقیق سازی عصاره ها محلول رقیق کننده Roswell Park Memorial Institute medium با فر 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (Sigma, St.louis, USA) که بر قارچ موردمطالعه هیچ اثری ندارد، استفاده شد و عصاره ها با صورت سریالی از غلظت ۱۶ میکرولیتر بر میلی لیتر ۰/۰۶ میکرولیتر بر میلی لیتر رقیق شدند. رقت های سریالی، در میکرو پلیت های ۹۶ خانه ای طوری قرار گرفتند که بیشترین غلظت ۱۶ میکرولیتر بر میلی لیتر در چاهک اول و کمترین غلظت ۰/۰۶ میکرولیتر بر میلی لیتر در چاهک آخر باشد. به هر چاهک اضافه ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچی شد. به عنوان کنترل مثبت ۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون قارچی درون محلول رقیق کننده بدون اضافه کردن عصاره و به عنوان کنترل منفی ۰/۰۲ میکرولیتر محلول فاقد درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

جهت خواندن نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی از روش چشمی استفاده شد. در این روش پایین ترین غلظت عصاره گیاهی که هیچ رشد قابل مشاهده ای در آن دیده نشد و کدورت آن از لحاظ چشمی مشابه حفره کنترل منفی بود، به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشنندگی

از محتویات چاهک های مختلف که حاوی عصاره گیاهی با غلظت های کمتر از حداقل غلظت مهار کنندگی بودند و رشد کاندیدا در آن مشاهده نشده بود، ۱۰ میکرولیتر به محیط سابرو دکستروز آگار برد شد و کمترین غلظتی از عصاره که رشد کمتر از ۴ کلونی (نشانگر کشتن ۹۹ درصد قارچ های اولیه) را نشان داد به عنوان حداقل غلظت کشنندگی در نظر گرفته شد.

5. Growth Control
6. Sterility Control

جندی شاپور

مجله علمی پژوهشی

جدول ۱. کمینه، بیشینه، میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد قارچ کاندیدا آلبیکانس در اطراف دیسک‌های آغشته به عصاره‌های گیاهی و نیستاتین بر حسب میلی‌متر

بیشینه	کمینه	میانگین \pm انحراف معیار	متغیر
۳۰/۵	۱۵	۲۱/۳۵ \pm ۵/۵۴	نیستاتین
۲۵	۹	۱۶/۹۰ \pm ۴/۲۸	حداقل غلظت مهاری مفراح
۲۱	۱۲	۱۷/۱۰ \pm ۲/۴۲	حداقل غلظت مهاری مفراح
۱۶	۸	۱۱/۶۰ \pm ۲/۵۴	حداقل غلظت مهاری نعناع گربه‌ای
۲۱	۵	۱۱/۸۰ \pm ۴/۹۸	حداقل غلظت کشنده‌گی نعناع گربه‌ای

مجله علمی پژوهشی
جندی شاپور

جدول ۲. نتایج آزمون توکی و مقایسه میانگین هاله عدم رشد قارچ کاندیدا آلبیکانس در اطراف دیسک‌های آغشته به عصاره‌های گیاهی و نیستاتین بر حسب میلی‌متر

P*	میانگین \pm انحراف معیار	متغیر
۰/۰۰۰۱	۹/۷۵ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت مهاری نعناع گربه‌ای
۰/۱۳۵	۴/۴۵ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت مهاری مفراح
۰/۰۰۰۱	۹/۵۵ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت کشنده‌گی نعناع گربه‌ای
۰/۴۱۵	۳/۲۵ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت مهاری مفراح
۰/۰۰۰۱	۱/۸۵ \pm ۹/۷۵	نیستاتین
۰/۰۴۹	۱/۸۵ \pm ۵/۳۰	حداقل غلظت مهاری مفراح
۱	۱/۸۵ \pm ۰/۲۰	حداقل غلظت کشنده‌گی نعناع گربه‌ای
۰/۰۰۹	۱/۸۵ \pm ۶/۵۰	حداقل غلظت مهاری مفراح
۰/۱۳۵	۱/۸۵ \pm ۴/۴۵	نیستاتین
۰/۰۴۹	۵/۳۰ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت مهاری نعناع گربه‌ای
۰/۰۶۳	۵/۱۰ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت کشنده‌گی نعناع گربه‌ای
۰/۹۶۷	۱/۸۵ \pm ۱/۲۰	حداقل غلظت مهاری مفراح
۰/۰۰۰۱	۱/۸۵ \pm ۹/۵۵	نیستاتین
۱	۱/۸۵ \pm ۰/۲۰	حداقل غلظت مهاری نعناع گربه‌ای
۰/۰۶۳	۱/۸۵ \pm ۵/۱۰	حداقل غلظت مهاری مفراح
۰/۰۱۲	۱/۸۵ \pm ۶/۳۰	حداقل غلظت مهاری مفراح
۰/۴۱۵	۱/۸۵ \pm ۳/۲۵	نیستاتین
۰/۰۰۹	۶/۵۰ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت مهاری نعناع گربه‌ای
۰/۹۶۷	۱/۸۵ \pm ۱/۲۰	حداقل غلظت مهاری مفراح
۰/۰۱۲	۶/۳۰ \pm ۱/۸۵	حداقل غلظت کشنده‌گی نعناع گربه‌ای

* مقدادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنادار است.

مجله علمی پژوهشی
جندی شاپور

براساس جستجوهای نگارندهان، اثر ضدقارچی گونه‌های گیاهی مورببررسی بر رشد کاندیدا آلبیکانس انجام نشده بود و مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات ممکن نبود. هرچند مطالعات مشابهی بر روی سایر جنس‌های پونه خانواده نعناعیان انجام شده است. بوزاویک همکاران در مطالعه‌ای اثر ضدقارچی گیاه زبانه نعناع دارویی^۹ نشان دادند این گیاه دارای اثرات ضدقارچ کاندیدا آلبیکانس است و اثرات آن بسته به مرحله رشدی گیاه متفاوت است. بهنحوی که در مرحله میوه‌دهی این اثر به حداقل می‌رسد^[۱۴]. موقری پور و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که اثر ضدقارچی عصاره آبی و الکی گیاه پونه کوهی^{۱۰} از تیره نعناعیان بر روی رشد کاندیدا آلبیکانس بهصورت معناداری کمتر از داروی نیستاتین است^[۱۵]. مطالعه گلستان ساز و همکاران نشان داد حداقل غلظت مهاری ضدقارچ کاندیدا آلبیکانس گیاه پونه سایی کرک ستاره‌ای^{۱۱} بین ۰/۵ تا ۲ میلی گرم در دسی لیتر است. ایشان با بررسی هاله عدم رشد کاندیدا آلبیکانس بهروش دیسک دیفیوژن در مقایسه با نیستاتین نشان دادند اثر ضدکاندیدایی این گیاه قابل قبول است^[۱۶]. از دلایل بروز اختلافات در نتایج می‌توان به غلظت متفاوت ترکیبات آنتی فانگال مؤثر، سویه قارچی مورببررسی، نحوه عصاره گیری و فصل تهیه گیاه جهت عصاره گیری اشاره کرد.

کارپینسکی در مطالعه موروی خود^[۱۷] به بررسی اثر ضدقارچی ۷۲ گیاه از خانواده نعناعیان پرداخت و نشان داد مواد مؤثر اصلی عصاره این گیاهان شامل بتاکاربوفیلن، لینالول، تیمول، گاما ترپین، لیمونن، آلفا و بتا پینن، سینئول، کارواکرول و پی سایمن هستند که از این میان بتا کاربوفیلن نقش اصلی را ایفا می‌کند. براساس این مطالعه بیش از نیمی از گیاهان مورببررسی دارای اثر ضدقارچی قابل قبول با حداقل غلظت مهاری کمتر از ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بوده‌اند. هرچند نتایج متفاوتی نیز دیده شده است. طبق بررسی‌های بونا و همکاران^[۱۸]، گیاهانی که دارای درصد بالاتری از ترکیبات فنولیک مانند تیمول، کارواکرول و پی سایمن هستند، اثر ضدقارچی بالاتری دارند که گیاهان تیره پونه و آویشن از این دسته هستند.

مکانسیم اثر عصاره‌های گیاهی بر سلول‌های کاندیدا مختلف است که می‌توان به تخریب غشای سلول، تغییر نفوذپذیری سلول، آسیب ساختارهای پلی ساکاریدی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدهای غشایی قارچ کاندیدا توسط اجزای لیپوفیلیک عصاره گیاهی و تغییر نفوذپذیری سلول نسبت به یون هیدروژن و پتاسیم که باعث تغییر pH سلولی و تخریب ساختارهای داخل سلولی می‌شود، اشاره کرد. به علاوه عصاره‌های گیاهی می‌توانند باعث مهار ساخت RNA و DNA^{۱۲} پروتئین و پلی ساکارید شوند و با تخریب غشای میتوکندری، رشد قارچ را متوقف کنند^[۱۷].

9. *Calamintha Nepeta*

10. *Origanum vulgare*

11. *Nepeta asterotricha* Rech. F

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه، تفاوت آماری معناداری در میانگین شاخص هاله عدم رشد بین نیستاتین و عصاره‌های گیاهی مورببررسی را نشان داد ($P=0/00$). مقایسه دوبعدی متغیرهای مورببررسی توسط آزمون تکمیلی توکی نشان داد هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آغشته به عصاره گیاه نعناع گربه‌ای معطر به صورت معناداری کمتر از دیسک‌های آغشته به عصاره گیاه نعناع نیستاتین و عصاره گیاهی مفرح بود ($P<0/05$) ولیکن تفاوت معناداری بین هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آغشته به حداقل غلظت مهاری و کشندگی گیاه مفرح و نیستاتین وجود نداشت ($P>0/05$). **جدول شماره ۲** نتایج آزمون توکی را نشان می‌دهد.

بحث

در این مطالعه آزمایشگاهی اثر حداقل غلظت مهاری و کشندگی عصاره گیاهان مفرح و نعناع گربه‌ای بر روی کاندیدا آلبیکانس بهروش براث میکرودیلوشن بررسی شد. قبل از معروفی این روش، روش غالب براث ماکرودیلوشن بوده است. این ۲ روش در جنبه‌های مختلفی از جمله محیط آزمایشی و زمان مورد نیاز متفاوت هستند. مطالعات مختلف برتری و دقت بیشتر روش براث میکرودیلوشن را اثبات کرده‌اند که به همین دلیل در این مطالعه از این روش استفاده شد^[۱۳]. در مطالعه حاضر بهدلیل احتمال وجود سایر گونه‌های کاندیدا و نیز گونه‌های مقاوم به درمان در نمونه‌های قارچی تهیه شده از بیماران، از سویه کاندیدا آلبیکانس استاندارد استفاده شد. براساس داده‌های این مطالعه، حداقل غلظت مهاری برای گیاه مفرح و گیاه نعناع گربه‌ای معطر به ترتیب $1/1$ و $2/4$ میکرو گرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی قارچ نیز برای گیاه مفرح 4 میکرو گرم بر میلی لیتر و برای گیاه نعناع گربه‌ای 6 میکرو گرم بر میلی لیتر بود.

بعد از به دست آوردن حداقل غلظت‌های مهاری و کشندگی این گیاهان از روش دیسک دیفیوژن برای مقایسه اثر آن‌ها با نیستاتین استفاده شد. بیشترین هاله عدم رشد به ترتیب در اطراف دیسک‌های آغشته به نیستاتین و عصاره گیاه مفرح با حداقل غلظت کشندگی مشاهده شد. هیچ تفاوت آماری معناداری بین هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آغشته به نیستاتین و عصاره گیاه مفرح در حداقل غلظت‌های مهاری کشندگی مشاهده نشد که نشان‌دهنده اثر مشابه با نیستاتین بر روی رشد کاندیدا آلبیکانس است. هاله عدم رشد نیستاتین به صورت معناداری از هاله عدم رشد حداقل غلظت مهاری و کشندگی گیاه نعناع گربه‌ای بیشتر است که می‌توان نتیجه گرفت گیاه کارابی نیستاتین در مهار رشد کاندیدا آلبیکانس را ندارد. عدم وجود تفاوت معنادار در هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آغشته حداقل غلظت مهاری و کشندگی گیاه نعناع گربه‌ای معطر نشان می‌دهد افزایش غلظت عصاره این گیاهان اثربخشی آن را تا حد نیستاتین افزایش نمی‌دهد.

یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر بررسی آزمایشگاهی عصاره گیاهان مفرح و نعناع گربه‌ای معطر بر روی سویه استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکانس بود. انجام مطالعات آتی جهت بررسی اثر این گیاهان روی سویه‌های مختلف به دست آمده از بیماران و انواع مقاوم به درمان کاندیدا آلبیکانس پیشنهاد می‌شود. به علاوه اثر عصاره‌های گیاهی الكلی هم باقیتی ارزیابی شود. ارزیابی اثر سینرژیسم گیاهان نیز می‌تواند در مطالعات آتی مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های مطالعه حاضر، عصاره آبی گیاه مفرح اثر مهاری قبل‌توجهی بر رشد سویه استاندارد کاندیدا آلبیکانس در محیط آزمایشگاه دارد. بهنحوی که تأثیر آن با عملکرد داروی استاندارد نیستانین تقاضوت معناداری ندارد. عصاره آبی گیاه نعناع گربه‌ای معطر باعث مهار نسبی رشد کاندیدا آلبیکانس می‌شود، ولیکن این اثر به صورت معناداری کمتر از اثر مهاری داروی نیستانین است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پژوهش حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی بوده و تمامی اصول اخلاق در پژوهش و انتشار مقالات در آن رعایت شده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجو بهمن رحیمی به شماره ۹۳۰۱۲۶۲۴۹ جهت دریافت دکتری عمومی دندانپزشکی مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد. حامی مالی این مقاله معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان است.

مشارکت نویسندهان

مفهوم‌سازی: مینا جزایری و شهربانو رعدی؛ روش‌شناسی: مینا جزایری، شهربانو رعدی و همایون خیری؛ تحقیق و بررسی: بهمن رحیمی؛ منابع، نگارش پیش‌نویس، ویراستاری و نهایی‌سازی نوشتۀ: مینا جزایری.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندهان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندهان از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- [1] Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi (Basel)*. 2020; 6(1):15. [DOI:10.3390/jof6010015] [PMID] [PMCID]
- [2] Sachivkina N, Podoprigora I, Bokov D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Vet World*. 2021; 14(6):1608-14. [DOI:10.14202/vetworld.2021.1608-1614] [PMID] [PMCID]
- [3] Rodriguez DL, Quail MM, Hernday AD, Nobile CJ. Transcriptional circuits regulating developmental processes in *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10:605711. [DOI:10.3389/fcimb.2020.605711] [PMID] [PMCID]
- [4] Diaz PI, Dongari-Bagtzoglou A. Critically appraising the significance of the oral mycobiome. *J Dent Res*. 2021; 100(2):133-40. [DOI:10.1177/0022034520956975] [PMID] [PMCID]
- [5] Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustjanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*-The virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi (Basel)*. 2021; 7(2):79. [DOI:10.3390/jof7020079] [PMID] [PMCID]
- [6] Contaldo M, Romano A, Mascitti M, Fiori F, Della Vella F, Serpico R, et al. Association between denture stomatitis, candida species and diabetic status. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2019; 33(3 Suppl. 1):35-41. [PMID]
- [7] Fang J, Huang B, Ding Z. Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis. *J Prosthet Dent*. 2021; 125(2):257-65. [DOI:10.1016/j.jprostdent.2019.12.025] [PMID]
- [8] Iversen DB, Hellfritsch M, Stage TB, Aabenhus RM, Lind BS, Pottegård A. Antimycotic treatment of oral candidiasis in warfarin users. *Am J Med*. 2021; 134(5):e308-12. [DOI:10.1016/j.amjmed.2020.10.018] [PMID]
- [9] Najafzadeh R, Ghasemzadeh S, Mirfakhraie S. Effect of essential oils from *nepeta crispa*, *anethum graveolens* and *satureja hortensis* against the stored-product Insect "Ephestia kuhniella (Zeller)". *J Med plants By-Prod*. 2019; 8(2):163-9. [Link]
- [10] Momtaz HE, Moradkhan S, Alikhani MY, Esnaashari F, Afkhami M. Study of antimicrobial effect of some plants of Lamiaceae family on *Escherichia coli* species isolated from children with urinary tract infection. *J Renal Inj Prev*. 2019; 8(1):38-43. [DOI:10.15171/jrip.2019.08]
- [11] The Plant List. A working list of all plant species [Internet]. 2022[Updated 2022 March 1]. Available from: [Link]
- [12] Baghizadeh A, Mashayekhi Z, Ebrahimi MA. [Investigation of genetic and phytochemical diversity of some catnip (*Nepeta cataria* L.) populations by RAPD molecular marker and GC/MS method (Persian)]. *Iran J Med Aromat Plants Res*. 2018; 34(5):836-48. [Link]
- [13] Kumar D, Bhattacharyya S, Gupta P, Banerjee G, Singh M. Comparative analysis of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution for susceptibility testing of clinical candida isolates against amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(11):DC01-4. [PMID] [PMCID]
- [14] Božović M, Garzoli S, Sabatino M, Pepi F, Baldisserotto A, Andreotti E, et al. Essential oil extraction, chemical analysis and anti-candida activity of *calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Ball-new approaches. *Molecules*. 2017; 22(2):203. [DOI:10.3390/molecules22020203] [PMID] [PMCID]
- [15] Movaghari Pour A, Sheikh Fathollahi M, Poor Zamani M, Abedini S, Jamali Z. [Comparison of anti-fungal effect of *origanum vulgare* extract versus nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study (Persian)]. *J Mashhad Dent School*. 2018; 42(3):277-1. [Link]
- [16] Goldansaz SM, Jafarian Jeloudar Z, Safaeian R, Sonboli A. Comparison of the chemical constitutions, antibacterial, anti-*Candida*, and antioxidant activity of *Nepeta asterotricha* Rech. f. essential oil. *America J Essen Oils Nat Prod*. 2019; 7(2):15-22. [Link]
- [17] Karpiński TM. Essential oils of Lamiaceae family plants as antifungals. *Biomolecules*. 2020; 10(1):103. [DOI:10.3390/biom10010103] [PMID] [PMCID]
- [18] Bona E, Cantamessa S, Pavan M, Novello G, Massa N, Rocchetti A, et al. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: Are they an alternative to antifungal agents? *J Appl Microbiol*. 2016; 121(6):1530-45. [DOI:10.1111/jam.13282] [PMID]