اثر ضدقارچی اسانس مورت بر کاندیدیازیس دهانی در رت‌های ایمنوساپرس

تیمور نجیب‌زاده[۱]، محمدحسین یادگاری[۲]*، حسنعلی نقدی‌بادی[۳]، علی‌نظر صالح‌نیا[٤]

۱- دانش‌آموخته مقطع کارشناسی‌ارشد، رشته قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- عضو هیات علمی، گروه پژوهشی کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
٤- دکتری داروسازی، شرکت داروسازی خرمان، لرستان
*آدرس مکاتبه: تهران، تقاطع جلال آل احمد – چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، تلفن: ۸۲۸۸۳۵۸۵ (۰۲۱)، نمابر: ۸۲۸۸٤٥٥٥ (۰۲۱)
پست الکترونیک: yadegarm@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۹ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۳/۱۷

چکیده

مقدمه: شناسایی و کاربرد اسانس‌های گیاهان دارویی می‌تواند در مقابله با مقاومت دارویی به عفونت‌ها مفید باشد.

هدف: ارزیابی اثر ضدقارچی اسانس مورت (***Myrtus communis* L.**) بر کاندیدیازیس دهانی در رت‌های ایمونوساپرس.

مواد و روش‌ها: اسانس مورت سبز به روش تقطیر با آب استخراج شد و نوع و میزان ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس نیز توسط دستگاه **GC/MS** و **GC** مشخص گردید. **MIC** اسانس مورت و نیستاتین با استفاده از روش ماکرودایلوشن (رقت لوله‌ای) تعیین شد. ۳۵ سر رت با وزن ۲۰±۲۰۰ گرم در ۵ گروه درمانی۷ تایی شامل (۱) گرو دارونما، (۲) گروه درمان شده با اسانس مورت سبز (۲ برابر **MIC**)، (۳) گروه درمان شده با نیستاتین، (٤) گروه غیر ایمنوساپرس ولی آلوده، و (۵) گروه ایمنوساپرس اما غیرآلوده، به طور تصادفی قرار گرفتند. عامل بیماری از یک ایزوله کاندیدا آلبیکنس با خصوصیات بیماری‌زایی قوی از یک بیمار مبتلا به واژینیت حاد تهیه شده بود. سطح عفونت و تعیین اثرات درمانی توسط روش‌های میکروبیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی و معاینات بالینی ارزیابی شد.

نتایج: آلفا پینن، لیمونن، ۱و۸ سینئول، لینالول، آلفا ترپینول و لینالئول استات از ترکیبات عمده اسانس مورت سبز بودند. **MIC** اسانس مورت سبز برابر $۲ \frac{mg}{ml}$ و **MIC** نیستاتین برابر $٤ \frac{\mu gr}{ml}$ تعیین شد. ارزیابی‌های میکروبیولوژیک و هیستوپاتولوژیک نشان داد که اسانس مورت دارای به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) تاثیر بازدارنده بر ***Candida albicans*** داشته است. البته کانون‌های محدودی از عفونت در برخی از نقاط مخاط پشت زبان وجود داشته که ممکن است به صورت نهفته باقی مانده و باعث عود بیماری شوند.

نتیجه‌گیری: درمان توسط اسانس مورت سبز با غلظت دارویی معادل ۲ برابر **MIC** برای ریشه کنی کاندیدیازیس دهانی در رت‌های ایمنوساپرس کافی نبوده است. بنابراین، بایستی دوزهای بیشتر از ۲ برابر **MIC** از اسانس برای کنترل مناسب کاندیدیازیس مورد ارزیابی قرار گیرد.

گل‌واژگان: کاندیدیازیس دهانی، کاندیدا آلبیکنس، مورت، اسانس، ارزیابی‌های میکروبیولوژیک و هیستوپاتوبیولوژیک

www.SID.ir

مقدمه

کاندیدیازیس[1] طیفی از بیماری‌های قارچی فرصت‌طلب است که در افراد مستعد به شکل عفونت‌های سطحی ساده تا عفونت‌های سیستمیک ایجاد می‌شود [۱]. این عفونت به صورت حاد، تحت حاد و مزمن در پوست، ناخن، مخاط دهان و واژن، برنش، ریه و دستگاه گوارش ظاهر می‌گردد و در حالت سیستمیک، سایر اعضای بدن از قبیل کلیه، کبد، قلب و سایر قسمت‌های دیگر بدن را آلوده می‌نماید [۲].

امروزه کاندیدیازیس از بیماری‌های مهم عفونی مطرح در جهان است و در حدود ۲۵ تا۵۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه و ۸ تا ۱۵ درصد کل عفونت‌های بیمارستانی را کاندیدیازیس تشکیل می‌دهد [۳]. عفونت‌های کاندیدایی مخاطی همگام با شیوع بیماری نقص سیستم ایمنی بدن انسان (HIV) به طور چشمگیری افزایش یافته است و بیش از ۹۰ درصد اشخاص آلوده به HIV از کاندیدیازیس دهانی- حلقی رنج می‌برند [٤]. همچنین این عفونت‌ها در افرادی که واجد فاکتورهای زمینه‌ای از قبیل سرطان لوسمی، دیابت ملیتوس، درمان‌های طولانی مدت با آنتی‌بیوتیک‌ها و کورتیکواستروئیدها، ایدز، بارداری، سوختگی و دریافت پیوند هستند، شایع‌تر است. طیف این عفونت‌ها از کلونیزاسیون مخاطی تا عفونت‌های مهاجم و کشنده متغیر است. از میان اشکال بالینی مختلف عفونت‌های کاندیدایی، کاندیدیازیس جلدی و مخاطی از شیوع بالاتری برخوردار است. کاندیدیازیس واژینال و برفک دهان در بین اشکال مخاطی و در فرم جلدی، عفونت ناخن (اونیکومایکوزیس) شایع‌تر هستند [۵]. کاندیدا آلبیکنس[2] مهم‌ترین گونه‌ای است که از ضایعات دهانی جدا شده است و شایع‌ترین عامل عفونت مخاط دهان می‌باشد [٦،۷].

امروزه داروهایی که در طب جدید برای درمان بیماری کاندیدیازیس به کار می‌روند متعلق به دوگروه پلی‌ان‌ها و آزول‌ها می‌باشند [۸،۹]. گروه پلی‌ان‌ها از قبیل آمفوتریسین B و نیستاتین دارای عوارض سمیت کلیوی و کبدی می‌باشند. گروه آزول‌ها از قبیل ایتراکونازول وفلوکونازول با وجودی که سمیت کمتری دارند اما به سبب مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا (به ویژه گلابراتا، تروپیکالیس، کروزه‌ای و آلبیکنس) نسبت به آزول‌ها، میزان موفقیت در درمان با این گروه از عوامل ضدقارچی کاهش یافته است [۱۰،۱۱]. به این دلایل، متخصصین به دنبال دستیابی به داروهای موثر و فاقد عوارض جانبی برای درمان این بیماری می‌باشند که در این راستا توجه ویژه‌ای به گیاهان دارویی و داروهای حاصل از آنها می‌باشد.

از زمان‌های قدیم، گیاهان دارویی به واسطه داشتن ترکیبات موثره متفاوت در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از ترکیبات موثره اصلی این گیاهان، اسانس یا روغن فرار است که دارای اثرهای بیولوژیکی فراوانی می‌باشند. خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی اسانس‌ها به طور فراوان گزارش شده‌است که به ترکیب‌هایی موجود دراسانس نظیر سینئول، کامفور، لینالول، آلفاپینن، بتاپینن، برنئول، کارون، لیمونن، کارواکرول، تیمول، سیمن، کامفن، آلفاترپینئول و غیره نسبت داده می‌شود [۱۲].

گیاه دارویی مورت سبز[1] از جمله گیاهان دارویی و معطر است که برگ‌های آن دارای ۱/۵ تا ۲ درصد اسانس می‌باشد و بهترین زمان جمع‌آوری برگ‌های آن از اواسط بهار تا اواسط تابستان است [۱۳]. در مطالعات برون تنی[2] متعددی اثر ضدمیکروبی و ضدقارچی اسانس این گیاه مورد بررسی قرار گرفته‌است [۱۹-۱٤]. خواص درمانی متعددی از مورت از جمله درمان تبخال (ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲) گزارش شده است [۲۰]. در مطالعات مختلف اثرات آنتی‌اکسیدانی [۲۱]، ضدالتهابی [۲۲]، درمان اسهال [۲۳] مورت گزارش شده است. مورت دارای اثر ضدانگلی بر روی تریکوموناس واژینالیس [۲٤] و ژیاردیا بوده و در درمان زخم‌های آفت دهانی [۱۷] بسیار مفید است. همچنین از گیاه مورت در درمان عفونت‌های حاد و مزمن دستگاه تنفسی استفاده می‌شود [۲۵].

[1] Candiddiasis
[2] *Candida albicans*
[1] *Myrtus communis* L.
[2] *In vitro*

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به اثرات درمانی متعدد مورت که در بالا اشاره شد در این تحقیق، اثرات ضدکاندیدایی اسانس مورت سبز بر مهار رشد کاندیدا در شرایط برون تنی (محیط‌های کشت آزمایشگاهی) و در شرایط درون تنی (در رت‌های ایمنوساپرس مبتلا به کاندیدیازیس دهانی) مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه اسانس مورت و شناسایی ترکیبات شیمیایی آن

برگ گیاه مورت سبز از منطقه لرستان (خرم‌آباد و اطراف پلدختر) جمع‌آوری و در سایه و درجه حرارت آزمایشگاه خشک شدند. سپس این برگ‌ها آسیاب و پودر شدند. برای اسانس‌گیری، ۱۰۰ گرم پودر برگ مورت را به طور دقیق توزین کرده و به روش تقطیر با آب، اسانس آن با استفاده از کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج شد [۲۶]. اسانس توسط سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد. لازم به ذکر است که نمونه‌های هرباریومی[1] این گونه گیاهی با شماره ACECR48 در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی[2] نگهداری می‌شوند.

اسانس موردنظر پس از آماده‌سازی به دستگاه گاز کروماتوگرافی[3] تزریق شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها و به دست آوردن شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص بازداری گزارش شده در کتاب Adams و مقایسه طیف جرمی هریک از اجزای اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه Willy نرم‌افزار GC/MS انجام پذیرفت. همچنین با استفاده از دستگاه GC، درصد ترکیبات اسانس تعیین شد [۲۷].

مشخصات دستگاه GC/MS: دستگاه GC از مدل Agilent 6890 و دستگاه MS از مدل Agilent 5973 با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی آون بدین‌نحو تنظیم شد که دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، دمای انتهایی ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و سه دقیقه توقف در این دما بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد.

طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود.

مشخصات دستگاه GC: دستگاه GC از مدل Younglin Acm6000 مجهز به دتکتور FID و ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی آون بدین‌نحو تنظیم شد که دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، دمای انتهایی ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و سه دقیقه توقف در این دما بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد.

۲- تهیه محیط کشت

برای ساخت محیط کشت سابرودکستروزبرات[1] مورد استفاده در تعیین حداقل غلظت مهاری یا MIC[2] اسانس مورت سبز و نیستاتین، ۳۰ گرم از پودر تجارتی محیط کشت سابرودکستروز برات در یک لیتر آب مقطر حل شد. سپس این مخلوط تحت شرایط دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع اتوکلاو شد.

[1] Voucher specimens
[2] ACECR
[3] GC/MS

[1] SDB
[2] MIC یا حداقل غلظت مهاری عبارتست از حداقل غلظتی از داروی مورد نظر که لازم است تا تحت شرایط استاندارد رشد میکروارگانیسم مشخص را مهار کند.

Archive of SID
www.SID.ir

۳- تعیین MIC و MFC اسانس مورت

برای تعیین حداقل غلظت مهاری از روش ماکرو دایلوشن یا رقت لوله‌ای[1] استفاده شد. برای حل شدن بهتر اسانس مورت در آب از حلال دی‌متیل‌سولفاکسید[2] استفاده شد. البته برای عدم تأثیر ضدقارچی DMSO از غلظت ٦ درصد آن استفاده شد.

مراحل تعیین MIC اسانس‌های مورت به شرح ذیل بود:

– تهیه میکروارگانیسم‌های فعال و جوان از کلنی تک کاندیدا آلبیکنس.

– تهیه سوسپانسیون استاندارد میکروبی جهت تلقیح در لوله با ۲ میلی‌لیتر محیط کشت و cfu/ml ۲۰۰۰ سلول‌های کاندیدا آلبیکنس [۲۸].

– رقت‌سازی و تلقیح میکروارگانیسم‌ها شامل اضافه نمودن حلال DMSO و اسانس به محیط کشت SDB که حاوی مقدار ٤٠ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی استاندارد و فعال می‌باشد. پس از این مرحله، تمام لوله‌ها توسط دستگاه Vortex یکنواخت شد و به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کمترین غلظتی از ماده مورد آزمایش که از آن غلظت به بالا رشد کاندیدا دیده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد [۲۸].

پس از تعیین MIC به منظور تأیید آن و تعیین حداقل غلظت کشندگی کاندیدایی[3] این اسانس‌ها، از محتوی لوله‌های آزمایش تعیین MIC و لوله‌های با غلظت بالاتر از آن، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت SDA پخش شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت قرار داده شدند. کمترین غلظتی که در آن رشد کلنی دیده نشد به عنوان MFC کاندیدا آلبیکنس در نظر گرفته شد [۲۸].

٤- تعیین MIC و MFC نیستاتین به عنوان عامل کنترل مثبت

رقت‌های دارویی مورد استفاده برای تعیین نیستاتین بین ٦٤ – ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. برای تعیین MIC نیستاتین، مقدار یک میلی‌لیتر محیط سابرودکستروزبرات به ۱۱ عدد لوله آزمایش استریل اضافه شد و سپس رقت‌های مورد نظر نیستاتین به لوله‌ها اضافه گردید. البته لوله شماره ۱۰ کنترل مثبت (فاقد دارو) و لوله شماره ۱۱ کنترل منفی (تنها حاوی محیط کشت) بود. سپس به لوله‌های شماره یک تا ۱۰ مقدار ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون کاندیدایی اضافه شد و این لوله‌ها را تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام این مدت، MIC تعیین شد. به عبارت دیگر، کمترین غلظتی از ماده دارویی نیستاتین که از آن غلظت به بالا، کدورت دیده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

برای تأیید نتایج MIC، حداقل غلظت کشندگی کاندیدایی نیستاتین نیز تعیین شد. برای انجام این آزمایش، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از لوله‌های حاوی غلظت MIC و بالاتر از آن به روی پلیت‌های استریل حاوی محیط کشت SDA اضافه و پخش شد. سپس آنها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شدند. کمترین غلظتی که در آن رشد کلنی کاندیدا مشاهده نشد به عنوان MFC در نظر گرفته شد.

لازم به ذکر است که تمام آزمایشات مربوط به تعیین MIC و MFC مورت سبز و همچنین نیستاتین سه بار تکرار شده است.

۵- فرمولاسیون دارویی

برای تهیه فرمولاسیون دارویی اسانس مورت سبز از غلظت نهایی MIC × ۲ و برای تهیه فرمولاسیون نیستاتین از غلظت نهایی MIC × ۱۰ استفاده شد. ماده پایه این فرمولاسیون دارویی آگار ۰/۸ درصد بود. از این فرمولاسیون‌های دارویی برای درمان کاندیدیازیس دهانی به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر و دوبار در روز و به مدت یک هفته استفاده شد. همچنین جهت نتایج درمانی بهتر، روزانه به تهیه دارو اقدام می‌شد و برای درمان از این داروی تازه استفاده شد [۲۹].

برای فرمولاسیون دارونما (پلاسبو) از مخلوط سرم فیزیولوژی استریل و آگار ذوب شده به نسبت ۱ به ۹ استفاده شد.

[1] Macrodilation Broth
[2] DMSO
[3] MFC

Archive of SID
www.SID.ir

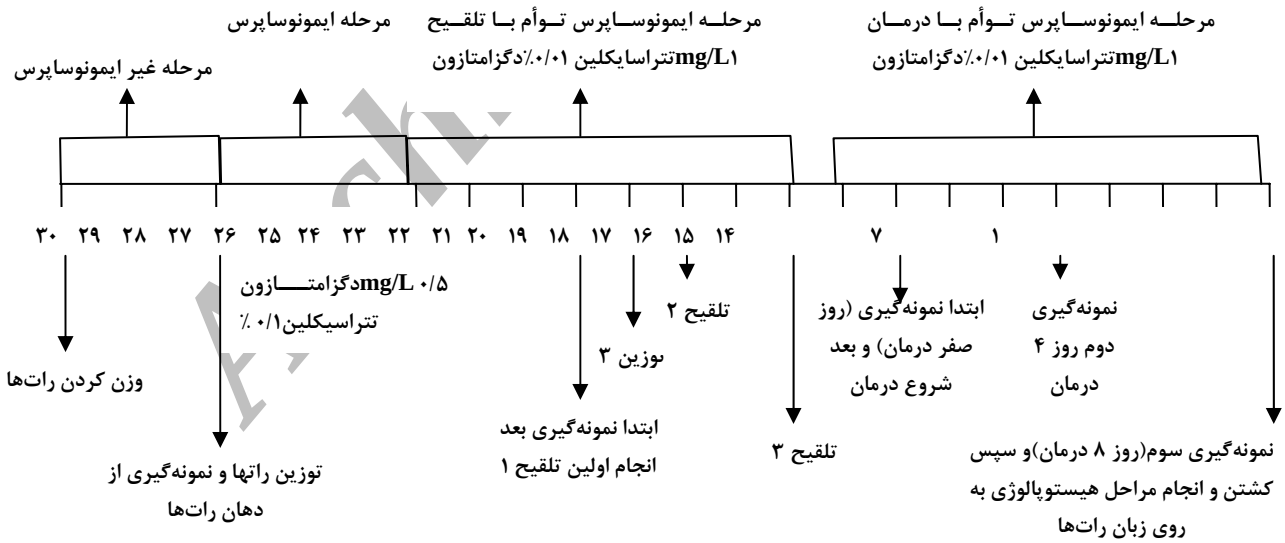
٦- ایجاد کاندیدیازیس دهانی در رت‌ها

از آنجایی که کاندیدا آلبیکنس یک ارگانیسم (قارچ) فرصت‌طلب می‌باشد و در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی باعث بیماری می‌شود برای ایجاد کاندیدیازیس دهانی در رت‌ها، سیستم ایمنی آنها سرکوب شد. برای ایمونوساپرس کردن رت‌ها از دگزامتازون (یک نوع کورتیکواستروئید) استفاده شد. البته ایجاد کاندیدیازیس دارای یک زمان‌بندی مشخصی بود (شکل شماره ۱) که به شرح ذیل می‌باشد [۳۰،۳۱،۳۲].

الف) هفته اول: در این هفته برای اینکه حیوانات با شرایط محیط جدید عادت کرده و استرس ناشی از جابجایی نیز کاهش یابد، از ایمونوساپرس نمودن حیوانات اجتناب شد و آب (آب جوشیده و خنک) و غذای کافی (پلت شده و عاری از عوامل ضدقارچی) و شرایط کاملاً مناسب برای آنها فراهم شد. وزن حیوانات به طور متوسط حدود (۲۰ ± ۲۰۰) گرم بود. در روز هفتم از دهان حیوانات توسط سوآپ استریل نمونه‌گیری به عمل آمد و حداقل مقدار کاندیدای قابل اغماض در فضای دهانی آنها مشخص شد (به منظور تعیین کمیت CFU [۱] در محوطه دهانی آنها قبل از ایمونوساپرس شدن).

ب) هفته دوم: در این هفته، سیستم ایمنی رت‌ها ایمونوساپرس یا سرکوب گردید. برای این عمل، مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پودر دگزامتازون همراه با مقدار ۰/۱ درصد پودر تتراسیکلین (جهت پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی) به آب آشامیدنی آنها اضافه شد.

ج) هفته سوم: در طی این هفته، دوز دگزامتازون به یک میلی‌گرم در لیتر افزایش و دوز مصرفی تتراسیکلین به مقدار ۰/۰۱ درصد کاهش یافت و این مقادیر تا آخر آزمایش ثابت ماند. در روزهای سوم، پنجم و هفتم این هفته، تلقیح سوسپانسیون کاندیدایی در گروه‌های مورد نظر شروع شد.



شکل شماره ۱- دیاگرام مراحل مختلف اجرای آزمایش بر روی رت‌های مورد آزمایش

۱- CFU: تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در یک میلی لیتر یا یک گرم ماده موردنظر

Archive of SID
www.SID.ir

برای اطمینان از دقت در انجام کار در پایان هفته سوم، رت‌ها مجدداً توزین شدند. وزن آن دسته از رت‌ها که ایمونوساپرس شده بودند به طور متوسط ٦٥ گرم کم شده بود ولی وزن رت‌های غیر ایمونوساپرس به طور متوسط به ۲۸۰ گرم رسیده بود که این تفاوت وزنی، یکی از علایم ساپرس شدن سیستم ایمنی می‌باشد. البته ریزش شدید مو، بزرگ شدن بیضه، اسهال و کاهش شدید تحرک و گوشه‌گیری از علایم دیگری بود که در رت‌ها مشاهده شد و نشانه‌های سرکوب سیستم ایمنی می‌باشد. همچنین در این مرحله قسمت‌های مختلف دهان و زبان رت‌ها مورد معاینه قرار گرفت و علایم ایجاد کاندیدیازیس در آنها مشخص شد [۳۲].

۷- روش انجام آزمایش کاندیدیازیس دهانی در رت‌ها

در این تحقیق از ٤٣ سر رت نژاد ویستار استفاده شد [۲۹] که به شرح ذیل بود:

- گروه اول شامل ۷ سر رت ایمونوساپرس شده مبتلا به کاندیدیازیس دهانی که با استفاده از فرمولاسیون دارویی حاوی اسانس مورت دوبار در روز و به مدت یک هفته درمان شدند.

- گروه دوم شامل ۷ سر رت ایمونوساپرس شدهٔ مبتلا به کاندیدیازیس دهانی که توسط فرمولاسیون دارویی حاوی نیستاتین (به عنوان کنترل مثبت) دو بار در روز و به مدت یک هفته درمان شدند.

- گروه سوم شامل ۷ سر رت ایمونوساپرس شده مبتلا به کاندیدیازیس دهانی که توسط فرمولاسیون دارویی حاوی دارونما دو بار در روز و به مدت یک هفته درمان شدند.

- گروه چهارم شامل ۷ سر رت آلوده شده اما غیر ایمونوساپرس برای مطالعه تأثیر عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی بر گسترش عفونت در نظر گرفته شد.

- گروه پنجم شامل ۷ سر رت ایمونوساپرس شده، اما غیرآلوده که به عنوان کنترل برای نشان دادن نقش تلقیح در نظر گرفته شد.

همچنین تعداد ۸ سر رت نیز به عنوان ذخیره و جایگزین در نظر گرفته شد که در صورت تلفات در ۵ گروه اصلی جایگزین آنها شوند.

- ارزیابی سطح عفونت و تعیین اثرات درمانی اسانس‌های مورت سبز

ارزیابی سطح عفونت و تعین اثرات درمانی به وسیله روش‌های میکروبیولوژی و هیستو پاتولوژی بررسی شد.

الف- ارزیابی میکروبیولوژی

در طی پنج نوبت شامل قبل از ایمونوساپرس، بعد از ایمونوساپرس و قبل از تلقیح، در روزهای صفر (بعد از تلقیح و قبل از درمان)، ٤ و ۸ درمان از دهان حیوانات مورد مطالعه نمونه‌گیری به عمل آمد و کمیت CFU نمونه‌ها تعیین شد. سپس CFU در گروه‌های درمان شده با عوامل ضدقارچی با گروه کنترل مقایسه شد. نمونه‌گیری و تعیین کمیت CFU مطابق روش چامی[1] (۲۰۰٤) بود [۲۹].

ب- ارزیابی هیستوپاتولوژی

در روز هشتم درمان (٢٤ ساعت پس از آخرین دوز درمانی) رت‌ها توسط دوز بالای اتر کشته شدند. سپس با پنبه الکلی اطراف دهان و صورت آنها ضدعفونی شد و توسط تیغ پیستوری یک شکاف از گوشه‌های دهان تا انتهای فک آنها ایجاد شد. به کمک قیچی و پنس استریل زبان آنها بیرون آورده شد. مقطع بافتی از سطح پشتی زبان حیوانات در گروه‌های مختلف تهیه و با روش‌های هماتوکسیلین - ائوزین و نیز پریودیک اسید شیف رنگ‌آمیزی شدند [۳۳]. مراحل تهیه مقاطع بافتی شامل دو مرحله ذیل بود:

الف- مرحله ثبوت و فیکس نمودن بافت‌ها

ب- مرحله پاساژ بافتی[2] [٣٤] شامل آب‌گیری[3]، شفاف‌سازی[4]، آغشتگی با پارافین[5][۳۳]، قالب‌گیری[6] [۳۵]، اصلاح قالب‌ها[7] [۳٦]، برش‌گیری و تهیه مقطع[8] [۳۷]، چسباندن برش‌ها بر روی لام یا مونته کردن برش‌ها[9] [۳۸]، آمادگی مقاطع و برش‌ها برای رنگ‌آمیزی

[1] Chami
[2] Tisu processing
[3] Dehydration
[4] Clearing
[5] Impregnation with paraffin
[6] Blooking
[7] Trimming
[8] Cutting section
[9] Mounting

Archive of SID
www.SID.ir

۹- آزمون آماری

برای مقایسه آماری گروه دارونما با سایر گروه‌ها از آزمون Independent sample T-Test و برای بررسی سطح معنی‌داری تفاوت‌های گروه‌ها در طی روند درمان با دارو از تجزیه واریانس یک طرفه استفاده شد.

برای تعیین درصد کاهش CFU هر گروه نسبت به گروه دارونما، ابتدا درصد کاهش هر کدام از گروه‌ها نسبت به روز صفر سنجیده شد و سپس درصد کاهش گروه دارونما در هرکدام از روزهای چهارم و هشتم از درصد کاهش سایر گروه‌ها در همان روز کسر شد.

نتایج

ترکیبات شیمیایی اسانس

با آنالیز اسانس مورت در مجموع بیش از ۹۷ درصد از ترکیبات اسانس (۳۵ نوع ترکیب) شناسایی گردید و آلفاپینن، لیمونن، ۱، ۸ - سینئول، لینالول، آلفاترپنیئول، لینالئول استات، گرانیل استات و کاریوفیلن از ترکیبات اصلی آن بودند (جدول شماره ۱).

تعیین کمیت حداقل غلظت مهاری

برای بررسی خواص ضدکاندیدیازیس اسانس مورت سبز، ابتدا MIC و MFC اسانس و نیستاتین (به عنوان عامل کنترل مثبت) در محیط برون‌تنی تعیین شد و در ساخت فرمولاسیون دارویی آنها استفاده شد (جدول شماره ۲). نتایج نشان داد خاصیت ضدکاندیدایی نیستاتین ۵۰۰ برابر قوی‌تر از اسانس مورت سبز است. اگرچه MIC و MFC اسانس مورت سبز با هم برابر می‌باشد ولی MFC نیستاتین دو برابر MIC آن است.

جدول شماره ۱ - نوع و میزان ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس مورت سبز

نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
Propyl butyrate	۹۱٤	۳/۳۲
Alpha pinene	۹۳٤	۱٦/٦٤۱
Camphene	۹٥٤	۰/٥۰۳
Bete pinene	۹۷۹	۱/٦۰٥
Beta myrcene	۹۹۱	۱/٥۰۰
Alpha Phellandrene	۱۰۰۷	۰/۷٦۸
Delta 3-carene	۱۰۱۲	۲/٥۲٤
Limonene	۱۰۳۳	۱۷/۷۷۱
1.8-cineole	۱۰٤۷	۲/۱٤٤
Ocimene(beta)	۱۰٥۱	۱/٤٤۱
Gamma,-terpinene	۱۰٦۳	۱/٤۱٥
Linalool Oxide	۱۰۷٥	۰/۳۸٤
Terpinolene	۱۰۹۱	۱/۷۳۷
Linalool	۱۱۰۲	۱۰/٦٥۸
Terpin-1-o1	۱۱۲٥	۰/۱٤٦
Neo-allo-ocimene	۱۱۳۰	۰/۱٤٥
Terpineole (cis-bete)	۱۱٤٦	۰/٤٦۸
Karahanaenone	۱۱٥۲	۰/۲۸۲
Terpinen-4-o1	۱۱۸۳	۱/۲۰۸
Alpha terpineol	۱۱۹۸	۸/۷۹۲
Verbenone	۱۲۱٦	۰/۱٦۱

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول شماره ۱ - نوع و میزان ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس مورت سبز

نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
Carveol	۱۲۲۶	۰/۳۴۲
Nerol	۱۲۳٤	۰/٦۹٤
Carvone	۱۲٤۸	۰/۱٤۹
Linaleol acetate	۱۲٥٦	۷/۷٤۳
Geranial	۱۲۷۱	۰/۱٥۳
Lavandulyl acetate	۱۳۰۰	۰/۲۱۳
Carvacrol	۱۳۰٥	۰/۳۳۰
Methyl gerente	۱۳۲۳	۱/۰۷٦
Pipeitol acetate (cis)	۱۳٥٤	٤/٤٤۰
Neryl acetate	۱۳٦۲	۰/۸۳٤
Geranyl acetate	۱۳۸۳	۲/۹٤۳
Caryophyllene (E)	۱٤۳۱	۲/٤۰۷
Alpha humulene	۱٤٦٥	۱/۷۱٦
Caryophyllene oxide	۱٥٦٤	۰/۹۲۲

جدول شماره ۲- میزان MIC و MFC مورت سبز و نیستاتین

ماده	MIC	MFC
نیستاتین	$4\ \mu gr/mL$	$8\ \mu gr/mL$
اسانس مورت سبز	$2\ mg/mL$	$2\ mg/mL$

معاینات بالینی

دهان رت‌های گروه‌های درمانی چهار گانه (n=۲۸) در روز صفر معاینات لازم به عمل آمد و مشخص شد که حیوانات به شدت به کاندیدیازیس دهانی مبتلا هستند. در اکثر رت‌ها، ضایعاتی به شکل پلاک‌های کوچک و برجسته، پنیری شکل و به رنگ شیری تا زرد رنگ در سرتاسر سطح مخاط پشتی زبان مشاهده شد. تظاهر بالینی کاندیدیازیس به فرم برفک دیده می‌شد. همچنین بین ضایعات برفکی در برخی از رت‌ها، به صورت محدود ضایعات قرمز رنگ دیده شد که در این نواحی، مخاط فاقد پرز و ملتهب بود و به فرم کاندیدیازیس آتروفیک (ارتیماتوس) به نظر می‌رسید. البته فراوانی این فرم در مقایسه با برفک به مراتب کمتر و شکل غالب همان برفک بود. این ضایعات در دو گروه درمانی (نیستاتین و اسانس مورت) پس از هشت روز درمان کاملاً ناپدید شد. این ضایعات در حیوانات گروه دارونما در سرتاسر آزمایش در روی زبان باقی ماند. همچنین در گروه ٤ (غیرایموندساپرس و آلوده) و گروه ٥ (ایمونوساپرس اما غیرآلوده) هیچ‌گونه علایم بالینی مشاهده نشد.

ارزیابی سطح عفونت

ارزیابی سطح عفونت و اثرات درمانی اسانس و نیستاتین به روش‌های میکروبیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی به شرح ذیل بررسی شد:

- ارزیابی میکروبیولوژی

قبل از شروع آزمایش‌ها از حفره دهانی همه رت‌های مورد آزمایش نمونه‌برداری به عمل آمد و هیچ نشانه‌ای مبنی بر عفونی بودن رت‌ها مشاهده نشد. نتیجه کشت نمونه‌های گرفته شده از دهان تمام رت‌ها در مراحل شروع آزمایش و ایمونوساپرس و قبل از تلقیح منفی بود.

نتایج کشت نمونه‌های دهانی رت‌های موجود در گروه ٥ (گروه ایمونوساپرس غیرآلوده / بدون انجام تلقیح) در همه

Archive of SID
www.SID.ir

مراحل مختلف آزمایش منفی بود. بنابراین برای ایجاد کاندیدیازیس در مدل‌های تجربی، تلقیح کاندیدا یک ضرورت مسلم می‌باشد و ایمونوساپرس به تنهایی کافی نیست.

در روز صفر یعنی درست قبل از شروع درمان با دارو، از دهان همه رت‌ها نمونه‌گیری به عمل آمد، کشت‌های دهانی آنها (به جز گروه غیر ایمونوساپرس) شدیداً مثبت بود. کمیت لگاریتم میانگین CFU به ازای هر سواپ گرفته شده برای سه گروه (گروه‌های درمان شده با اسانس مورت سبز، نیستاتین و گروه دارونما) برابر ۰/۰۶ ± ٤/۷۳ بود و همه رت‌های این سه گروه شدیداً عفونی بودند. آزمون تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد که هیچ‌کدام از این چهار گروه در روز صفر از لحاظ میزان عفونت تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما در گروه غیرایمونوساپرس و آلوده فقط ٤ سر از رت‌ها به صورت جزئی عفونی شده بودند و میزان عفونت در این گروه نسبت به گروه دارونما به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کمتر بود (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۲).

در روز چهارم درمان، مجدداً از حفره دهانی همه رت‌ها نمونه‌گیری و کشت به عمل آمد و کمیت لگاریتم میانگین CFU حفره دهانی همه رت‌ها به صورت کمی تعیین شد. اگرچه همه رت‌ها درمان شده با اسانس مورت، آلوده بودند اما کمیت لگاریتم میانگین CFU آنها به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کاهش یافته بود. همچنین در گروه درمان با نیستاتین تنها ۵/۷ رت‌ها عفونی و نتیجه کشت آنها مثبت بود ولی کمیت لگاریتم میانگین CFU آنها به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافته بود. میزان کاهش کمیت لگاریتم میانگین CFU گروه‌های درمان شده با اسانس مورت سبز و نیستاتین در مقایسه با گروه کنترل منفی دارونما به ترتیب ۸۲/۲ و ۹۰/٦۲ درصد بود. در مورد رت‌های گروه غیر ایمونوساپرس تنها ۲/۷ رت‌ها هنوز به صورت جزئی عفونی بودند و کمیت لگاریتم میانگین CFU آنها به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کاهش یافته بود. به هر حال مقایسه دو گروه درمان شده با اسانس مورت و نیستاتین در روز چهارم درمان نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های درمانی مورت و نیستاتین وجود داشته است و کمیت لگاریتم میانگین CFU در تیمار درمان با نیستاتین در مقایسه با گروه درمانی اسانس مورت به طور معنی‌داری کمتر ($p<۰/۰۵$) می‌باشد (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۲).

در روز هشتم درمان، کشت دهانی همه افراد گروه درمانی اسانس مورت مثبت بود ولی ۱/۷ رت‌ها گروه درمانی نیستاتین و ۱/۷ رت‌ها گروه غیر ایمونوساپرس به صورت خیلی جزئی کشت مثبت نشان دادند. البته در مقایسه با گروه دارونما، تغیر معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) در درصد کاهش CFU در گروه درمانی اسانس مورت (۸۸/۳٤ درصد) مشاهده شد. درمان با نیستاتین نیز به طور معنی‌داری در از بین بردن ارگانیسم‌های کاندیدا مؤثر بود. به طوری که در روز هشتم، فقط ۱/۷ کشت‌ها به صورت خیلی جزئی و با یک کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$)، کمیت لگاریتم میانگین CFU مثبت بود (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۲).

جدول شماره ۳- مطالعه‌ی میکروبیولوژی گروه‌های مختلف درمانی بر علیه کاندیدیازیس دهانی

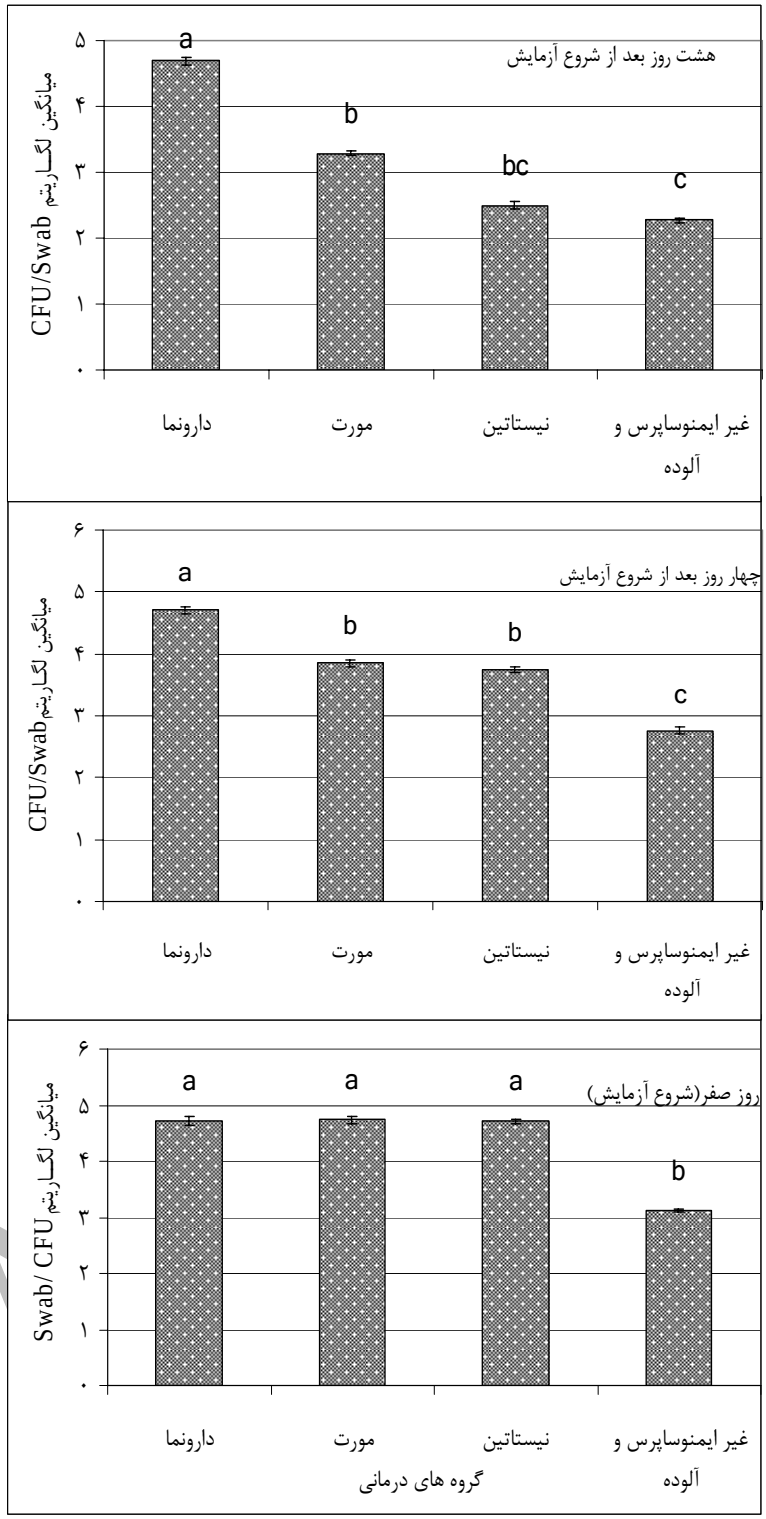
گروه	روز صفر			روز چهار			روز هشت		
	رت‌ها آلوده (درصد)	لگاریتم CFU ±SD	رت‌ها آلوده (درصد)	درصد کاهش CFU	لگاریتم CFU ±SD	رت‌ها آلوده (درصد)	درصد کاهش CFU	لگاریتم CFU ±SD	رت‌ها آلوده (درصد)
کنترل منفی (دارونما)	۷/۷ (۱۰۰)	٤/۷۳ ± ۰/۰۸	۷/۷ (۱۰۰)		٤/۷۱ ± ۰/۰٦	۷/۷ (۱۰۰)		٤/٦۹ ± ۰/۰٦	۷/۷ (۱۰۰)
مورت	۷/۷ (۱۰۰)	٤/۷٤ ± ۰/۰۷	۷/۷ (۱۰۰)	۸۲/۲	۳/۸۵±۰/۰۵ **	۷/۷ (۱۰۰)	۸۸/۳٤	۳/۲۹ ±۰/۱٤ **	۷/۷ (۱۰۰)
نیستاتین	۷/۷ (۱۰۰)	٤/۷۱ ± ۰/۰٤	۵/۷(۷۱/٤۳)	۹۰/٦۵	۳/۷٤ ± ۰/۰٤ *	۱/۷ (۱٤/۲۸)	۹۱/۵۱	۲/۵ **	۱/۷ (۱٤/۲۸)
غیرایمنوساپرس و آلوده	٤/۷ (۵۷/۱)	۳/۱۲ ± ۰/۳ *	۲/۷ (۲۸/۵۷)	٦۸/۷۱	۲/۷٦ ± ۰/۱٦ **	۱/۷ (۱٤/۲۸)	۸٤/۰۹	۲/۲۷ **	۱/۷ (۱٤/۲۸)

* تفاوت با گروه دارونما با سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$

** تفاوت با گروه دارونما با سطح معنی‌داری $p<۰/۰۰۱$

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۲- مقایسه گروه‌های درمانی مختلف از شروع تا روز هشتم درمان

www.SID.ir

- ارزیابی هیستو پاتولوژیکی

بررسی لام‌های هیستوپاتولوژی تهیه شده از سطح پشتی زبان گروه‌های سه‌گانه درمانی نشان داد که در رت‌های گروه دارونما، یک کلونیزاسیون وسیع از سلول‌های مخمری فراوان و هایف‌ها و پسودوهایف‌های متعدد در سطح لایه‌های شاخی و اپی‌تلیوم مخاط پشتی زبان مشاهده شد. هایف‌ها به داخل اپی‌تلیوم و حتی لایه‌های عمیق تر نفوذ نموده و ضخامت در این نواحی نامنظم بود و خصوصیات هیستوپاتولوژیکی وجود عفونت در این گروه را تأیید نمود.

در گروه رت‌های درمان شده با نیستاتین، هیچگونه عناصر قارچی اعم از سلول‌های مخمری و پسودوهایف در سطح اپی‌تلیوم مخاط پشتی زبان دیده نشد و بررسی هیستوپاتولوژیکی وجود عفونت در این گروه‌ها را تأیید نکرد و در سطح اپی‌تلیوم مخاط پشتی زبان، عناصر قارچی مشاهده نشد و نرمال بود.

در گروه رت‌های درمان شده با اسانس مورت سبز، در نقاط محدودی از سطح اپی‌تلیوم مخاط پشتی زبان، تعداد کمی از سلول‌های مخمری و هایف کاندیدا آلبیکنس وجود داشت و بافت زبان به طور کامل پاکسازی نشده بود و کانون‌های محدودی از عفونت وجود داشت.

بحث

بررسی نوع و درصد ترکیبات اسانس مورت سبز مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از دستگاه‌های GC– MS و GC نشان داد که ترکیبات اصلی آن آلفاپینن، لیمونن، ۱، ۸ – سینئول، لینالول، آلفاترپنیئول، لینالئول استات، گرانیل استات و کاریوفیلن می‌باشد. این نتایج با مطالعات انجام شده توسط سایر محققین مطابق بود [۳۳،۳۹]. خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی اسانس مورت و نیز ترکیبات سازنده آن از قبیل آلفاپینن، لینالول، لیمونن، ۱، ۸ – سینئول، آلفاترپنیئول در مستندات علمی مختلف گزارش شده است [۳۳]. بدیهی است که اثرات ضدمیکروبی و ضدقارچی اسانس مورت را به اجزای تشکیل دهنده آن یا به اثر سینرژیستی مجموعه یا بخشی از اجزای آن می‌توان نسبت داد.

نتایج نشان داد MIC اسانس مورت سبز برابر $۲ \ mg/ml$ و MIC نیستاتین جهت مهار رشد این ایزوله بالینی برابر $٤ \ \mu gr/ml$ بود. به عبارت دیگر قدرت مهار کاندیدای مورد مطالعه توسط نیستاتین حدود ۵۰۰ برابر قوی‌تر از اسانس مورت می‌باشد. این نتایج تقریباً با نتایج دیگر محققین تطابق داشته است با این تفاوت که در این تحقیق از یک ایزوله پاتوژن بالینی استفاده شد که ممکن است مقاوم‌تر باشد، در حالی که در سایر مطالعات از ایزوله‌های استاندارد استفاده شده بود [۳۹].

در این تحقیق مطابق مدل مارتینز برای مطالعه اثر ضدکاندیدایی اسانس مورت سبز و نیستاتین (کنترل مثبت) از یک مدل تجربی استاندارد شده کاندیدیازیس دهانی در رت‌های ایمونوساپرس که بسیار ساده و به راحتی قابل تولید است استفاده شد [۲۹،۳۰،۳۱]. تجویز سیستمیک کورتیکو استروئید (دگزامتازون) در آب آشامیدنی دو هفته قبل از درمان باعث کاهش شدید گلبول‌های سفید خون و ایجاد حالت نوتروپنیک در رت‌ها شد. این دارو همچنین با جلوگیری از تجمع سلول‌های التهابی در ناحیه التهاب، مهار فاگوستیوز و آزاد شدن واسطه‌های شیمیایی التهاب، اثرات خود را اعمال می‌نماید و باعث سرکوب شدید سیستم ایمنی رت‌های مورد مطالعه می‌شود. علاوه‌بر این تجویز آنتی‌بیوتیک‌های سیستمیک به ویژه تتراسیکلین، توسعه کاندیدیازیس دهانی را در رت‌ها تسهیل و همچنین از عفونت‌های باکتریایی جلوگیری نمود [۴۰،۴۱]. نشانه‌های سرکوب سیستم ایمنی در رت‌ها از قبیل کاهش شدید وزن، ریزش شدید موها، بزرگ شدن بیضه‌ها، اسهال، کاهش شدید تحرک و گوشه‌گیری مشاهده شد [۳۲].

در این تحقیق، حفره دهانی برای ارزیابی‌های میکربیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی مورد توجه قرار گرفت زیرا گونه‌های کاندیدا تمایل خاصی برای محل‌های آناتومیکی ویژه در حفره دهانی دارند و عموماً روی مخاط دهانی کراتینه شده یا غیر کراتینه انسان به ویژه پشت زبان و سطوح گونه‌ای ساکن هستند. نقشه مقاطع طولی و نیم‌رخ کلونیزاسیون دهانی کاندیدا توسط فیسکر[1] و همکاران به دنبال تلقیح

[1] Fisker

Archive of SID

www.SID.ir

دهانی کوتاه مدت کاندیدا آلبیکنس در رت‌های ویستار در یک رژیم وابسته به تتراسیکلین مشخص شد [٤١]. این آزمایش به طور برجسته فرآیند کلونیزاسیون کاندیدا آلبیکنس در چهار قسمت عمده دهان را آشکار ساخت.

بعضی از محققین اعتقاد دارند که اتصال و چسبندگی سلولی کم و فضاهای داخل سلولی فراوان و یک اپی تلیوم غیرمنظم و نامساوی و همراه با یک لایه شاخی شل، نفوذ و کلونیزاسیون هایف‌ها در سطح غشای زبان رت‌ها را تسهیل می‌کند [٤٢]. بعد از تلقیح کاندیدا آلبیکنس در دهان رت‌ها، مخمرها و پسودوهایف‌ها و هایف‌ها فقط در لایه کراتینه زبان دیده می‌شوند. یک ایراد که در مدل رت وجود دارد این است که حیوان ممکن است کاندیدا آلبیکسن را در یک سطح خیلی پایین به عنوان یک کومنسال گذرا پناه دهد ولی این موضوع همیشه عمومیت ندارد بنابراین محققینی که برای مطالعه این مدل را به کار می‌برند می‌بایست نقش مهم کلونیزاسیون دهانی غیرطبیعی کاندیدا را قبل از تلقیح مصنوعی در این حیوان در نظر بگیرند که در این مطالعه نیز مدنظر قرار گرفت [٤٣].

در این مطالعه برای ایجاد کاندیدیازیس دهانی از یک ایزله کاندیدا آلبیکنس با قدرت بیماری‌زایی بالا استفاده شد که از یک بیمار مبتلا به واژنیت حاد کاندیدایی به دست آمده بود. نتایج تعیین کمیت CFU و معاینات بالینی در روز صفر درمان و همچنین عفونت زیاد در حیوانات درمان نشده (گروه دارونما) در سرتاسر آزمایش، مؤید قدرت بیماریزایی بالای آن بود. این ایزوله دارای قدرت تشکیل جرم تیوپ و هایف فراوان بوده که نتایج هیستوپاتولوژی این موضوع را تأیید نموده‌است. تشکیل جرم تیوپ که زودتر از رشد هایفی در کاندیدا اتفاق می‌افتد، عموماً در ارتباط با افزایش قدرت اتصال به سلول‌های اپی تلیال [٤٤] و مقاومت در برابر فاگوستیوزیس به علت ابعاد فیزیکی بزرگتر آنها می‌باشد [٤٥]. این نظریات غالباً منجر به این اعتقاد شده که تشکیل لوله زایا و هایف در کاندیدا آلبیکنس موجب نفوذ بیشتر در لایه شاخی اپی تلیال شده و در ایجاد بیماری اهمیت دارند [٤٦]. این مدل همچنین در مطالعات مربوط به ارزیابی اثرات عوامل ضدقارچی در درمان کاندیدیازیس واژینال کاربرد دارد و با اندکی تغییر در مطالعات درمانی کاندیدیازیس سیستمیک نیز قابل استفاده می‌باشد [٢٩،٣٠،٣١،٣٢].

از نتایج به دست آمده در ارزیابی‌های میکروبیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی در طی هشت روز درمان می‌توان نتیجه گرفت که علی‌رغم اینکه گزارش‌هایی [٣٧،٣٨] نشان می‌دهد که رت‌ها ممکن است کاندیدا آلبیکنس را در یک سطح خیلی پایین به عنوان کومنسال گذرا پناه دهد و محققینی که برای مطالعه از این مدل حیوانی استفاده می‌کنند می‌بایست کلونیزاسیون دهانی غیرطبیعی کاندیدا را قبل از تلقیح مصنوعی در نظر بگیرند، در این تحقیق نتیجه کشت دهانی تمام رت‌های مورد آزمایش چه در مرحله شروع آزمایش و چه در مرحله ایمونوساپرس و قبل از تلقیح منفی بود و این نتیجه با نتایج محققین مختلفی که از مدل حیوانی رت برای مطالعه کاندیدیازیس دهانی استفاده نموده بودند تطابق داشت [٢٩،٣٠،٣١].

از آنجایی که در حیوانات گروه چهار (غیرایمونوساپرس اما عفونی و تلقیح شده) پس از ٨ روز فقط ١/٧ حیوانات به صورت جزئی کشت مثبت نشان دادند و نیز با توجه به منفی بودن کشت دهانی تمام حیوانات گروه ٥ (رت‌های ایمونوساپرس اما غیر عفونی و بدون تلقیح) و همچنین عدم وجود علایم بالینی کاندیدیازیس دهانی در معاینات حیوانات این دو گروه، می‌توان نتیجه گرفت که لازمه ایجاد یک مدل کاندیدیازیس دهانی موفق در رت، انجام مراحل ایمونوساپرس و تلقیح با هم می‌باشد و این دو مرحله لازم و ملزوم یکدیگر بوده و انجام هر یک به تنهایی کافی نمی‌باشد. در گروه‌های درمانی چهار گانه (گروه‌های ١، ٢، ٣ و ٤) در روز صفر درمان، لگاریتم میانگین CFU به دست آمده از نمونه‌های کشت دهانی تمام رت‌ها (n=٢٨) مشابه نتایج به دست آمده توسط سایر محققین با همان میزان ماده تلقیحی بود [٤٧،٤٨] و تمام رت‌ها دارای عفونت بوده و معاینات بالینی وجود کاندیدیازیس دهانی را تأیید نمود [٢٩،٣٠،٣١].

در گروه ایمونوساپرس عفونی اما درمان نشده (گروه ٣ یا دارونما)، نمونه‌های کشت دهانی تمام حیوانات در هشت روز درمان مثبت بود و رت‌ها یک عفونت پایدار از خود نشان دادند که تقریباً در طی هشت روز درمان ثابت بود (البته با یک کاهش ٨ درصدی در روز هشت درمان نسبت به روز صفر). مشاهدات هیستوپاتولوژیکی نیز نشان دهنده وجود عناصر مخمری و هایفی فراوان و نفوذ عناصر هایفی در اپی تلیوم

Archive of SID
www.SID.ir

مخاط پشتی زبان بود و با نتایج میکروبیولوژیکی مطابقت داشت. همچنین وجود ضایعات بالینی کاندیدیازیس دهانی در تمام رت‌های این گروه در طی هشت روز درمان، نشان‌دهنده یک عفونت پایدار در این حیوانات بود.

چهار روز پس از درمان با اسانس مورت سبز حیوانات هنوز عفونی بودند اما کمیت لگاریتم میانگین CFU آن نسبت به گروه دارونما به میزان ۸۲/۲ درصد کاهش یافته بود. در صورتیکه پس از چهار روز درمان با نیستاتین تنها کشت ۵٪ حیوانات مثبت بوده و کمیت لگاریتم میانگین CFU این گروه نسبت به گروه دارونما ۹۰/۶۲ درصد کاهش یافته بود. این مسأله نشان‌دهندهٔ تأثیر بیشتر نیستاتین برای درمان کاندیدیازیس دهانی نسبت به اسانس مورت در چهار روز اول درمان بود. در روز هشتم درمان در گروه درمانی اسانس مورت، کشت نمونه‌های دهانی تمام حیوانات مثبت بود ولی از میزان لگاریتم میانگین CFU کاسته شده همچنین علایم بالینی کاندیدیازیس در روی مخاط پشتی زبان این حیوانات محو شده بود. نتایج هیستوپاتولوژیکی این گروه نشان داد که در مناطق محدودی از سطح اپی تلیوم مخاط پشتی زبان تعداد کمی از سلول‌های مخمری و هایف کاندیدا وجود داشته و بافت زبان به طور کامل پاکسازی نشده و کانون‌های محدودی از عفونت هنوز وجود داشت.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های میکروبیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی نشان داد پس از هشت روز درمان با اسانس مورت، کانون‌های محدودی از عفونت در برخی از نقاط مخاط زبان وجود داشته که به صورت نهفته باقی‌مانده است و در صورت وجود شرایط زمینه‌ای و عدم درمان قطعی ممکن است مجدداً باعث بروز عودهای مکرر بیماری شود. بنابراین هشت روز درمان توسط اسانس مورت با غلظتی معادل دو برابر MIC برای ریشه‌کنی کاندیدیازیس دهانی در رت‌های ایمونوساپرس کافی نمی‌باشد. از آنجا سمیت خوراکی (LD_{50}) اسانس مورت در رت برابر ۳٪ ml/kg می‌باشد [۳۳] و دوزهای مورد استفادهٔ اسانس مورت سبز در این تحقیق به مراتب کمتر از دوزهای کشندگی حاد (LD_{50}) آن می‌باشد و از طرفی اسانس مورت اثر درمانی معنی‌داری نیز داشته‌است پیشنهاد می‌شود که اثر درمانی این اسانس در دوزهای بالاتر و طول دوره درمانی بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis*. 1995; 20 (1): 115 - 25.

2. Calderone RA and Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans. Trends in Microbiol*. 2001; 9 (7): 327 - 35.

3. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 33: 1692 – 6.

4. Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*. 1992; 73: 171 – 80.

5. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. Candida. In: Anaissie EJ, McGinnis MR and Pfaller MA, eds. Clinical Mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003, pp: 195 - 227.

6. Samaranayake LP and Lamey PJ. Oral Candidosis: 1. Clinicopathological aspects. *Dental Update*, 1988; 15: 227 - 31.

7. MacPhail LM, Greenspan D, Dodd CL, Heinic GS, Beck C and Ekoku E. Association of fungal species with oral candidiasis in HIV infection. *J. Dent. Res*. 1993; 72: 353.

8. Samaranayake YH and Samaranayake LP.

Archive of SID

www.SID.ir

Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin. Microbiol. Rev*. 2001; 14 (2): 398 - 429.

9. Ellepola ANB and Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*. 2000; 11 (2): 172 - 98.

10. Kauffman CA and Carver PL. Antifungal agents in the 1990s. Current status and future developments. *Drugs* 1997; 53 (4): 539 - 49.

11. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS and Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J. Clin. Microbiol*. 40: 2483 - 9.

12. Baghalian K and Naghdi Badi H. Volatile oil crops; their biology, biochemistry, and production. Andarz Publications. 2000, pp: 139 - 88.

13. Ghasemi Dehkordi N (Ed.). Iranian Herbal Pharmacopoeia (IHP). Ministry of Health Pub, Tehran. 2002, vol. 2, pp: 749 - 53.

14. Garg SC, Dengre SL. Antifungal activity of the essential oil of *Myrtus Communis* Var *Microphylla*. *Herba Hungarica* 1988; 27: 123 - 6.

15. Martinetz H, Johnson M, Phillips B. Antimicrobial effects of *Myrtus communis* L. essential oil on cilinical isolates of *Fusarium* and *Penicilium*. *Med. Plant*. 1998; 34 (6): 85 - 9.

16. Mccoy K, Lima J. Antimicrobial activity of *Myrtus communis* L. against *Candida albicans*. *Med Hypo*: 2003; 89 (15): 166 - 71.

17. Bonjar GHS, Nik AK, Aghighi S. Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran. *J. Biol. Sci*. 2004; 4: 405 - 12.

18. Miller P, Danniel R. Inhibitory Effects of *Zingiber officinalis* and *Myrtus Communis* L. Against Dimatiaceouses. *Fito*. 2005; 22 (8): 211 - 5.

19. Ameziane N, Boubaker H, Boudyach H, Msanada F, Jilal A and Ait Benaoumar A. Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron. Sustain. Dev*. 2007; 27: 273 - 7.

20. Owlia P, Saderi H, Aghaee H, Yaraee R and Zayeri F. The effect of *Myrtus communis* L. essential oil on treatment of Herpes simplex infection in animal model. *Iranian J. Medicinal and Aromatic Plants* 2007; 23 (2): 157 - 65.

21. Romani A, Coinu R, Carta S, Pinelli P, Galardi C, Vincieri FF and Franconi F. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radic. Res*. 2004; 38 (1): 97 - 103.

22. Feisst C, Franke L, Appendino G, Werz O. Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2005; 315 (1): 389 - 96.

23. Mendes MM, Gazarini LC and Rodrigues ML. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments: Effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environ. Exp. Bot.* 2001; 45: 165 - 78.

24. Azadbakht M, Ziaiye H, Abdollahi F and Shabankhani B. Effect of Methanolic essence and extract of *Myrtus Communis* on *Trichomonas Vaginalis*. *Journal of Medical Faculty Guilan University of Medical Sci*. 2004; 48 (12): 8 - 13.

25. Khalighi-Sigaroodi F, Jarvandi S and Taghizadeh M. Therapeutic indications of medicinal plants. Arjmand Pub. Tehran, Iran. 2010, pp: 181 - 4.

26. British Pharmacopoeia, HMSO, London, 1988, pp: 2, A137 – A138.

27. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing. Carol Stream, IL, USA 2001, p: 469.

28. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1997.

29. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J and Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol

www.SID.ir

and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz. J. Infect. Dis*. 2004; 8 (3): 217 - 26.

30. Martinez A, Regardera J, Jimenez E, et al. Antifungal efficacy of GM237354,a sordarin derivative, in experimental oral oandidiasis in immunosuppressed rats. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001; 45: 1008 - 13.

31. Martinez A, Ferrer S, Santos I, Jimenez E, Sparrowe J, Regadera J, De Las Heras FG and Gargallo-Viola D. Antifungal activities of two new azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of oral and vulvovaginal candidiasis in immunosuppressed rats. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001; 45 (12): 3304 - 9.

32. Ahmet U, Tonay I, Mehiha UH and Hande D. Immune deficiency and cryptosporidiosis in rats. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2003; **27**: 1187 - 92.

33. Najib-Zadeh T. Evaluation of Antifungal Efficacy of *Satureja khuzestanika* and *Myrtus communis* Essential Oils on Oral Candidiasis in Immunosupressed Rats (In Persian). M.Sc. Thesis. Tarbiat Modares University, Iran, 2009.

34. Carleton HM.Carleton's Histological tednique. Oxford University press 1980, pp: 520.

35. Mc Manus FA and Mowry RW. Staining methods. In: Hober PB, ed. Histology and Histochemistry. New York: Harper and Brothers; 1965.

36. Cohn HJ. Staining procedures used by the Biological stain Commission. New York, Biotech Publication 1994.

37. Smith A and Bruton J. A Colour atlas of histological Staining techniques. Wolfe Medical Publications, London, 1978, p: 192.

38. Davenport HA. Staining Sections. In: Davenport HA, editor. Histological and Histochemical Techniques. Philadelphia: W.B Saunders, 1960: 217 – 62.

39. Rasooli I, Moosavi ML, Rezaee MB and Jaimand K. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *J. Agric. Sci. Technol.* 2002; 4: 127 - 33.

40. Russell C and Jones JH. Effects of oral inoculation of *Candida albicans* in tetracycline - treated rats. *J. Med. Microbiol.* 1973; 6: 275 - 79.

41. Fisker AV, Rindom Schiøtt C and Phillipsen HP. Short–term oral condidosis in rats, with special reference to the site of infection. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand B.* 1982; 90 (1): 49 - 57.

42. Philipsen HP, Cleaton PJ, Fisker AV. Correlative light microscopic and scanning electron microscopic study of completely and incompletely orthokeratinized rat oral epithelium. *European Journal of Oral Sci*. 1982; 90: 255 – 262.

43. O'Grady J. Trauma and oral candidosis. M.D.Sc. thesis. University of Melbourne, Melbourne, Australia. 1986.

44. Kimura LH and Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun*. 1980; 28: 464 - 8.

45. Martin MV, Craig GT and Lamb DJ. An investigation of the role of true hypha production in the pathogenesis of experimental oral candidosis. *Sabouraudia* 1984; 22 (6): 471 - 6.

46. Odds FC. Candida and candidiasis. Leicester University Press, Leicester, UK. 1979, pp: 382.

47. Seelig MS. Mechanisms by which antibiotics increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defenses. *Bacteriol. Rev*. 1966; 30: 442 - 59.

48. Knight L and Fletcher J. Growth of *candida albicans* in *saliva*: Stimulation by glucose associated with antibiotics, corticosteroids and diabetes mellitus. *J. Infect. Dis*. 1971; 123 (4): 371 - 7.

Archive of SID

www.SID.ir