

بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌ی الکلی گیاه بومادران و زینان بر روی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از دنچر استوماتیت

نازلی ابراهیم نتاج^۱، مریم رضایی دستجردی^۲، سهام انصاری^۳، کامران امیریان چایجان^{۴*}، مهدی سپیدار کیش^۵،

جلال جعفرزاده^۶، اکبر حسین نژاد^۷، مجتبی تقی‌زاده ارمکی^{۷*}

چکیده

زمینه و هدف: استوماتیت دندان مصنوعی شایع‌ترین ضایعه مخاطی دهان در بین استفاده‌کنندگان از پروتز است. از آنجایی که در دو دهه اخیر گزارش‌های متعددی مبنی بر مقاومت گونه‌های کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروهای ضدقارچی وجود دارد، در صورت تأیید اثرات ضدقارچی گیاه بومادران و زینان، این ترکیبات ممکن است داروی کمکی مناسبی در کنار مصرف داروهای ضدقارچی رایج باشند. از این رو مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره‌های الکلی بومادران معمولی و زینان رومی علیه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از استوماتیت دندان مصنوعی انجام شد.

روش بررسی: حساسیت دارویی ۵۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس با منشا دنچر استوماتیت نسبت به عصاره‌های الکلی گیاهان بومادران، زینان و نیز داروهای ضد قارچی میکونازول و نیستاتین به روش میکروداپلوشن براث و بر اساس دستورالعمل CLSI-M27S4 انجام گرفت. دامنه‌ی رقت برای تمامی ترکیبات ۱۶-۱۰/۱۶ میکروگرم/میلی لیتر بود. غلظتی از ترکیبات که حداقل ۵۰٪ مهار رشد را نسبت به گروه کنترل مثبت نشان داد به‌عنوان MIC (حداقل غلظت مهاری رشد) در نظر گرفته شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید و سطح معنی‌داری به‌صورت $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: دامنه‌ی MIC به‌دست آمده در روش میکروبراث داپلوشن برای داروهای ضدقارچی میکونازول، نیستاتین و نیز عصاره‌های الکلی گیاهان بومادران و زینان بر روی کاندیدا آلبیکنس، نزدیک به هم بوده که نشان می‌دهد تاثیرگذاری آن‌ها بر روی گونه‌های کاندیدا آلبیکنس تفاوت معنی‌داری ندارد ($P > 0/05$). بیشترین و کمترین مقدار MIC به ترتیب مربوط به عصاره متانولی بومادران با میانگین $2/67 \pm 2/55$ میکروگرم/میلی لیتر و میکونازول با میانگین $0/67 \pm 0/57$ میکروگرم/میلی لیتر بود. مقایسه‌ی نتایج MIC ها بین عصاره‌های الکلی گیاهی و داروهای ضدقارچی، تفاوت معناداری نشان داد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: باتوجه به MIC ها به‌دست آمده، تاثیرگذاری عصاره‌های الکلی گیاهان بومادران و زینان در مقایسه با داروهای ضدقارچی نیستاتین و میکونازول کمتر بوده اما امکان دارد نسبت به داروهای شیمیایی دیگر MIC کمتر و تاثیرگذاری بیشتری داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، بومادران معمولی، زینان رومی، نیستاتین، میکونازول، دنچر استوماتیت

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۴

پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱۰

* نویسندگان مسئول:

کامران امیریان چایجان؛

دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

مجتبی تقی‌زاده ارمکی؛

پژوهشکده سلامت دانشگاه علوم پزشکی بابل

Emails :

kamranamirian@gmail.com

M.Taghizadeh@mubabol.ac.ir

۱ دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲ استادیار گروه پروتز، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳ استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

۴ استادیار گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۵ کارشناس ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۶ دانشجوی دکتری قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

۷ استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

مقدمه

گونه‌های کانیدیدا جزو فلور نرمال پوست و مخاط بوده و در صورت فراهم‌بودن فاکتورهای زمینه مانند ضعف سیستم ایمنی و لوسمی، به حالت پاتوژن تغییر می‌یابد. در بین اشکال کانیدیدیازیس، فرم دهانی شایع‌ترین عفونت فرصت‌طلب مخاط دهان است که به دنبال رشد بیش از حد کانیدیدا در حفره‌ی دهان ایجاد می‌شود. شایع‌ترین گونه‌ی کانیدیدا در ایجاد کانیدیدیازیس دهانی، *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد (۱). دنچر استوماتیت یک پاسخ التهابی مزمن توسط مخاط دهان به محرک‌های آسیب‌رسان مختلف در افراد بی‌دندان بوده که با تغییرات التهابی در نواحی زیر پروتز فک بالا، اریتم، تورم مخاط و گاه همراه با درد و سوزش است (۲). مطالعات اپیدمیولوژیک شیوع استوماتیت دندان مصنوعی را در بین استفاده‌کنندگان از پروتز از ۱۵٪ تا بیش از ۷۰٪ گزارش کرده‌اند (۳). شایع‌ترین داروهای ضدقارچی مورد استفاده در درمان کانیدیدیازیس دهانی متعلق به داروهای گروه پیلان (نیستاتین) و آزولها (میکونازول) است (۴). درمان‌های مکرر با داروهای ضدقارچ معمولاً موجب ایجاد عوارض جانبی متعدد، مقاومت‌های دارویی و عود مکرر عفونت‌های کانیدیدیایی می‌شود (۲). بنابراین استفاده از راهکارهای مناسب برای جایگزینی داروهای جدیدی که مشکلات ذکر شده را از بین ببرد همواره مورد توجه بوده است. یکی از این راهکارها بهره‌گیری از داروهای گیاهی است (۵). بومادران معمولی (*Achillea millefolium*) گیاه دارویی از تیره گل ستاره‌ای‌ها، جنس بومادران است که تمام قسمت‌های گیاه بومادران (برگ، دانه، گل، ریشه و ...) دارای خواص دارویی می‌باشد و فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس روغنی و همچنین اثر درمانی آن در انواع گوناگونی از اختلالات و بیماری‌های عفونی مورد تایید قرار گرفته است (۶ و ۷). زنیان رومی (*Trachyspermum copticum*) گیاهی از تیره چتریان، جنس زنیان است که برگ و دانه آن به صورت خوراکی به عنوان ضدنفخ، ضدتهوع، خلط‌آور و به عنوان مسکن برای دردهای روماتیسمی استفاده می‌شود (۸). در ساختار فیتوشیمیایی گیاه زنیان رومی ترکیباتی همچون تیمول، پاراسیم، ترپینن، گاماترپینن، سابینن و ترکیبات شیمیایی دیگر نظیر پروتین، چربی و عناصر معدنی شامل سدیم، پتاسیم، آهن، کلسیم، منیزیم، روی، مس و کبالت گزارش گردیده است (۹ و ۷). با توجه به خاصیت ضد میکروبی گیاه بومادران و زنیان علیه میکروارگانیسم‌های مختلف مانند باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*، در صورت تایید اثر ضدقارچی

این گیاهان می‌توانند داروی کمکی مناسبی در کنار مصرف داروهای ضدقارچی رایج باشند. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات ضدقارچی عصاره متانولی گیاه بومادران و زنیان بر روی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از دنچر استوماتیت است.

روش بررسی

این مطالعه‌ی تجربی بر روی ۵۰ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از بیماران دنچر استوماتیت در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام گرفت. ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* که با استفاده از تست‌های فنوتیپی مانند کشت بر روی محیط سابورودکستروز آگار، کروم آگار، تست جرم تیوپ، تست کلامیدوسپور و تست‌های ژنوتیپی بر اساس مطالعات قبلی با استفاده از پرایمرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') و برش آنزیمی با *MspI* و *BlnI* با استفاده از روش PCR-RFLP تایید گردیده بودند (۱۰)، این ایزوله‌ها در بانک گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده علوم پزشکی بابل موجود بودند. در این مطالعه از ایزوله‌ی استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC10231 به عنوان کنترل تست استفاده شده است.

• تهیه عصاره الکلی گیاه بومادران معمولی و زنیان رومی

برگ‌ها و سرشاخه‌های گیاهان مذکور، بومادران معمولی و زنیان رومی با اعداد هرباریومی (HNBG 11381) *Trachyspermum copticum* (L.) و (HNBG 11366) *Achillea millefolium* L. از مرکز تحقیقات باغ گیاه‌شناسی نوشهر در استان مازندران تهیه و در مجاورت هوا (در سایه خشک) گردید. به منظور تهیه عصاره‌های الکلی از روش خیساندن استفاده شد که در این روش سرشاخه‌ها و بذر گیاهان بعد از تمیز شدن، طی دو مرحله داخل هاون استریل آسیاب و پودر شدند. ۱۰۰ گرم پودر گیاه به‌طور جداگانه در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اتانول و متانول ریخته شد و بعد از ۲۴ ساعت، محتویات ظرف به مدت ۲۰ دقیقه و با ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوبات جدا گردید. با کمک دستگاه حذف حلال در خلا در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد اتانول و متانول حذف و عصاره‌ی تغلیظ‌شده برای خشک‌شدن در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد داخل فور قرار داده شد و به محض خشک شدن، عصاره برداشته شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شد. میزان وزن خشک

گیاه mg/ml ۳/۲ بود.

● تست ارزیابی حساسیت دارویی

ارزیابی حساسیت دارویی براساس پروتکل CLSI-M27-S4 با روش میکرو دیالوشن برات در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته‌صاف انجام شد (۱۱). در ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI به همه چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به استثنای ستون اول اضافه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از استوک‌های دارویی عصارهی الکلی گیاه بومادران و زنیان، نیستاتین و میکونازول (به‌صورت پودر از شرکت سیگما آلدریج، آلمان) در چاهک‌های ستون اول ریخته شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های ستون اول به ستون دوم منتقل و رقت‌سازی سریالی تا ستون دهم ادامه یافت. ردیف ۱۱ و ۱۲ به‌عنوان کنترل مثبت و منفی تست استفاده شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری با ترانسمیشن ۷۷-۷۵ به همهی ستون‌ها به جز کنترل منفی اضافه گردید (محدود رقتی ایجاد شده $0.16 \mu\text{g/ml}$ تا ۱۶). میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس به‌صورت چشمی مشاهده شد. MIC به صورت ۵۰٪

مهار رشد نسبت کنترل مثبت گزارش گردید (۱۲). همچنین شاخص‌های مرکزی (میانگین، میانه) و شاخص‌های پراکندگی (دامنه، انحراف معیار، دامنه میان چارکی) نتایج با استفاده از آنالیزهای آماری نمایش داده شدند. جهت آنالیز پیامدهای کمی از آزمون تی مستقل و جهت آنالیز متغیرهای کیفی از آزمون کای مربع استفاده شد که تمامی آزمون‌ها دو دامنه و سطح معناداری ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

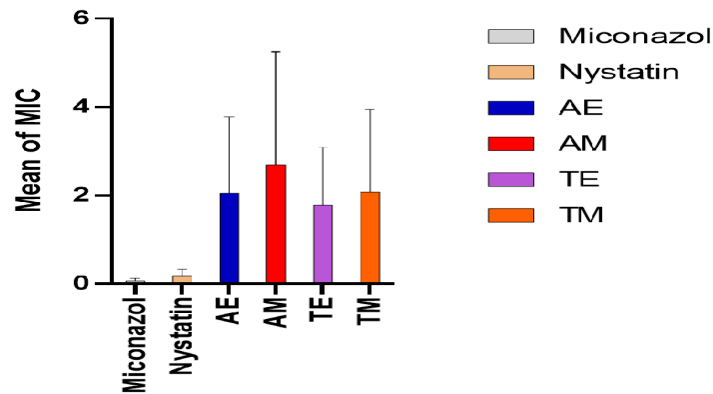
در این تحقیق اثر عصاره‌های الکلی گیاهان زنیان و بومادران و دو داروی شاهد نیستاتین و میکونازول بر روی ۵۰ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از بیماران دنچر استوماتیت انجام گرفت. نتایج آزمون تحلیل تعقیبی T-test نشان داد که حداقل غلظت مهارتی در میکونازول و نیستاتین از MIC های عصاره متانولی گیاهان به‌طور معناداری کمتر می‌باشد ($P < 0.05$) و داروهای ضدقارچی اثرات مهارکنندگی بیشتری نسبت به عصاره‌های الکلی گیاهان بروی گونه‌های *کاندیدا* داشتند.

جدول ۱: شاخص‌های مرکزی و پراکندگی MIC در گروه‌های مطالعاتی

گروه	میانگین	انحراف استاندارد	خطای استاندارد	Min	Max	P- value
میکونازول	۰/۰۶۷	۰/۰۵۷	۰/۰۱	۰/۰۱۶	۰/۲۵	
نیستاتین	۰/۱۷۱	۰/۱۶۵	۰/۰۲	۰/۰۱۳	۰/۵	
عصاره اتانولی زنیان	۱/۷۷۷	۱/۳۱۴	۰/۱۹	۰/۱۲۵	۴	
عصاره متانولی زنیان	۲/۰۷۷	۱/۸۷۳	۰/۲۶	۰/۱۲۵	۸	<۰/۰۵
عصاره اتانولی بومادران	۲/۰۵۲	۱/۷۲۳	۰/۲۴	۰/۱۲۵	۸	
عصاره متانولی بومادران	۲/۶۷۹	۲/۵۵۵	۰/۳۶	۰/۱۲۵	۸	

نسبت به هم از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). MIC عصاره اتانولی و متانولی زنیان از MIC های عصاره اتانولی و متانولی بومادران کمتر بود و همچنین در دو گیاه زنیان و بومادران MIC عصاره‌های اتانولی از MIC عصاره متانولی کمتر بوده اما به دلیل این که اختلاف بین آن‌ها از نظر آماری معنادار نبود ($P > 0.05$)؛ در واقع اثر مهارکنندگی گیاه زنیان و بومادران و همچنین عصاره‌های اتانولی و متانولی آن‌ها بر روی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۱).

بیشترین مقدار MIC مربوط به عصاره متانولی بومادران ($0.125 \mu\text{g/ml}$) با میانگین 2.67 ± 2.55 بود و کمترین مقدار MIC مربوط به میکونازول ($0.16 \mu\text{g/ml}$) با میانگین 0.67 ± 0.57 بود که نشان می‌دهد عصاره‌ی متانولی بومادران و میکونازول به ترتیب کمترین و بیشترین تاثیر را بر روی ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* داشتند. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی MIC در گروه‌های مطالعاتی در جدول ۱ نشان داده شده است. اما کمتری بودن MIC میکونازول نسبت به نیستاتین و همچنین عصاره‌های متانولی و اتانولی



* AE: عصاره اتانولی بومادران، AM: عصاره متانولی بومادران، TE: عصاره اتانولی زنیان، TM: عصاره متانولی زنیان
نمودار ۱: میانگین MIC گروه‌های مختلف مورد آزمایش

بحث

گونه‌های کاندیدا به‌عنوان عوامل فرصت‌طلب طیف وسیعی از عفونت‌های سطحی، جلدی، جلدی-مخاطی و سیستمیک را در بیمارانی با ضعف سیستم ایمنی، گیرندگان پیوند عضو، اختلالات اندوکرینی، ایدز، بیماران بستری طولانی‌مدت با مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف ایجاد می‌کند (۱۳). این مطالعه نشان داد که بررسی اثرات مهارکنندگی عصاره‌های اتانولی و متانولی دو گیاه بومادران و زنیان در مقایسه با داروهای ضدقارچی نیستاتین و میکونازول در کاندیدا/آلبیکس جداشده از بیماران دنچر استوماتیت بسیار کم بوده است. در مطالعه‌ی Dadpe و همکاران (۲۰۱۸)، که فعالیت ضد میکروبی روغن زنیان رومی را در برابر کلرگزیدین برای کاندیدا/آلبیکس بررسی کرده بودند، نتایج آن‌ها نشان داد که روغن زنیان رومی به‌طور متوسط با میانگین MIC، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد کاندیدا/آلبیکس جلوگیری نموده است (۱۴). اما در مطالعه‌ی حاضر عصاره‌ی الکلی زنیان به‌ترتیب به‌طور متوسط با میانگین MIC، ۲/۰۷۷ و ۱/۷۷۷ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد کاندیدا/آلبیکس جلوگیری نموده است که در مقایسه با میکونازول و نیستاتین با میانگین MIC، ۰/۰۶۷ و ۰/۱۷۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاتر بوده و از لحاظ آماری معنی‌دار بود. برخلاف مطالعه حاضر، در مطالعه‌ی اشرفی‌تمای و همکاران (۲۰۱۳) که به ارزیابی اثرات ضدقارچی زنیان بر روی ایزوله‌های کاندیدا جدا شده از دهان افراد مبتلا به ایدز پرداخته شده بود، حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت قارچ‌کش (MFC) اسانس زنیان با استفاده از روش میکروداپلوشن برات تعیین شد. در مورد اسانس زنیان، میزان ۳۰ میکرولیتر این اسانس، به‌طور کامل از رشد کاندیدا/آلبیکس در پلیت جلوگیری نمود. کمترین غلظت بازدارندگی اسانس (MIC) به روش میکروداپلوشن برات

در ۷۲ درصد جدایه‌ها ۵۰۰ ppm و در ۲۸ درصد دیگر ۷۵۰ ppm و کمترین غلظت کشندگی (MFC) هم در ۷۰ درصد ایزوله‌ها ۷۵۰ ppm و مابقی ۱۰۰۰ ppm مشاهده شد (۱۵). نتایج مطالعه‌ی حاضر در راستای نتایج مطالعه‌ی نطنزبان قهفرخی و همکاران (۱۳۸۷) بود (۱۶). آن‌ها MIC و MFC اسانس و عصاره الکلی زنیان را برای ۱۱ سویه‌ی بالینی و سویه‌ی استاندارد کاندیدا/آلبیکس (PTCC5027) به روش میکروداپلوشن برات تعیین کردند. در مورد اسانس، کمترین غلظت بازدارندگی معادل ۰/۸۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۰/۴۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و در مورد عصاره الکلی کمترین غلظت کشندگی قارچ معادل ۳/۵۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۷/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، که اثرات کمتر و ضعیف‌تر عصاره‌ی زنیان را در مقایسه با اسانس این گیاه نشان داد (۱۶). شکری و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ی خود نشان دادند که روغن زنیان در مقابل گونه‌های کاندیدای آزمایش شده فعال بوده است و قطرهای هاله‌ی مهار رشد بین ۱۸ و ۶۰ میلی‌متر گزارش شد. همچنین روغن زنیان به‌ترتیب با مقادیر MIC و MFC بین ۰/۳-۰/۶ mg/ml و ۰/۱-۰/۶ mg/ml بسیار موثر بود. اسانس روغنی زنیان فعالیت معنی‌داری را در مقابل گونه‌های مختلف کاندیدا در مقایسه با سایر قارچ‌ها نشان داد ($P < 0/05$) (۱۷). مهری اردستانی و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌شان میزان MIC روغن زنیان بر روی گونه‌های استاندارد کاندیدا/آلبیکس ATCC10231 و کاندیدا کروزبی PTCC5295 را به‌ترتیب ۰/۵ mg/ml و ۰/۶۲۵ mg/ml گزارش نمودند (۱۸). در راستای مطالعه‌ی حاضر، Candan و همکاران که تحقیقی روی گیاه بومادران مورد مطالعه‌ی ما انجام دادند در قسمت محلول در آب فعالیتی مشاهده نکردند اما برای عصاره‌ی متانولی گیاه و اسانس روغنی آن ضد کاندیدا/آلبیکس فعالیت

سایر مطالعات کمی دشوار بوده و نمی‌توان به‌طور قطع هیچ عاملی را مسبب نتایج متفاوت دانست. تنها می‌توان استدلال کرد که احتمالاً عصاره‌های الکلی این گیاهان دارای ترکیبات ضدقارچی کمتری می‌باشند. از محدودیت‌های تحقیق حاضر، عدم تعیین مواد موثر گیاهان با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی به‌دلیل محدودیت منابع مالی و عدم بررسی اثرات ضدقارچی آن بر روی گونه‌های غیر آلبیکنس بوده است.

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج MIC به‌دست آمده، تاثیرگذاری عصاره‌های الکلی گیاهان بومادران و زنیان در مقایسه با داروهای ضدقارچی نیستاتین و میکونازول بر روی *کاندیدا آلبیکنس* کمتر بوده است اما امکان دارد نسبت به داروهای شیمیایی دیگر MIC کمتر و تاثیرگذاری بیشتری داشته باشند؛ که بهتر است مورد بررسی قرار گیرند. پیشنهاد می‌شود که از اسانس روغنی گیاه یا تهیه ترکیبات ماده موثر برای بررسی‌های دقیق‌تر در مطالعات بعدی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی و نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی با کد رهگیری ۷۲۴۱۳۳۳۸۷ با کد اخلاق IR.MUBABOL.REC.1399.439 مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل صورت پذیرفت. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل و همچنین همکاری واحد پژوهشکده سلامت دانشگاه علوم پزشکی بابل تقدیر و تشکر نمایند. از جناب آقای دکتر سهام انصاری به جهت بازنگری مقاله، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Gurung S, Sharma TD, Rasaily SM, Singh R & Prakash PY. A six-year hospital-based surveillance study on burden of esophageal candidiasis in Gangtok, Sikkim. *Iranian Journal of Microbiology* 2022; 14(4): 598-605.
- Pfaller MA & Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20(1): 133-63.
- Le-Bars P, Kouadio AA, Bandiaky ON, Le-Guehenec L & De-La-Cochetiere MF. Host's immunity and *Candida* species associated with denture stomatitis: A narrative review. *Microorganisms* 2022; 10(7): 1437.
- Kably B, Launay M, Derobertmeasure A, Lefeuvre S, Dannaoui E & Billaud EM. Antifungal drugs TDM: Trends and update. *Journal of Therapeutic Drug Monitoring* 2022; 44(1): 166-97.

متوسطی ذکر کردند (۱۹). همچنین اثر اسانس روغنی را بیشتر از عصاره الکلی بیان کرد. Candan در این تحقیق اجزای گیاه را به‌وسیله‌ی GC-MS آنالیز کرد که نتیجه نشان داد کامفور و تاجیک لینالول که در تحقیق احمدی و همکاران (۲۰) و Sokmen و همکاران (۲۱) جزء ترکیبات اصلی با خاصیت ضدکاندیدا بودند. Stojanovic و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی چهار نوع از گیاهان خانواده استراسه از جمله *Achillea Millefolium* انجام دادند، بیان نمود که عصاره‌ی الکلی (متانول- اتر- هگزان) هر چهار گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی علیه پنج نوع باکتری و دو نوع قارچ از جمله *کاندیدا آلبیکنس* بوده است (۲۲). Toplan و همکاران (۲۰۲۲) در ترکیه در مطالعه‌شان میزان MIC عصاره متانولی گیاه بومادران بر علیه گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* ATCC10231 ($0.125 \mu\text{g/ml}$)، *کاندیدا آلبیکنس* ATCC90028 ($0.125 \mu\text{g/ml}$)، *کاندیدا آلبیکنس* NRRL Y-12968 ($0.125 \mu\text{g/ml}$)، *کاندیدا آلبیکنس* ATCC750 ($0.125 \mu\text{g/ml}$)، *کاندیدا آلبیکنس* NRRL Y-900 ($0.125 \mu\text{g/ml}$)، *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 22019 ($0.125 \mu\text{g/ml}$)، و *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 6258 ($0.125 \mu\text{g/ml}$) گزارش نمودند (۲۳). یافته‌های مطالعه‌ی حاضر با مطالعه آن‌ها همسو بوده است؛ تفاوت مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌ی آن‌ها در مقایسه اثرات ضدقارچی بومادران با داروهای ضدقارچ آموتریسین و کنوکونازول بر روی ایزوله‌های کاندیدا بوده است؛ درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر اثرات ضدقارچی این گیاه با داروهای ضدقارچ میکونازول و نیستاتین بوده است. موقری‌پور و همکاران (۱۳۹۵) به مقایسه آزمایشگاهی اثر ضدقارچی عصاره گیاه بومادران با میکونازول ۲ درصد بر *کاندیدا آلبیکنس* پرداختند (۲۴). هرچند روش دو مطالعه تفاوت داشت اما نتایج تاییدکننده‌ی اثر کمتر عصاره‌های الکلی بومادران نسبت به میکونازول بود. به‌دلیل محدود بودن مطالعات مشابه و نتایج متفاوت آن‌ها مقایسه این مطالعه با

5. Namdar-Ahmad-Abad H, Roudbary M, Roudbar-Mohammadi S, Mohammad-Hassan Z & Nezafat-Firizi M. Anti-fungal effect of fresh, aged and pickled garlic aqueous extract on *Candida albicans* in vitro. Internal Medicine Today Gonabad University of Medical Sciences 2013; 18(4): 179-83[Article in Persian].
6. Soltani Howyzeh M, Sadat Noori SA, Shariati JV & Niazian M. Essential oil chemotype of Iranian ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Journal of Essential Oil Bearing Plants 2018; 21(1): 273-6.
7. Naquvi KJ, Ansari SH, Salma A, Ahamad J & Najib S. A review on phytochemical investigations and biological activities of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. Research Journal of Pharmacy and Technology 2022; 15(5): 2364-70.
8. Heidari Damani M, Partovi R, Shahavi MH & Azizkhani M. Nanoemulsions of *Trachyspermum copticum*, *Mentha pulegium* and *Satureja hortensis* essential oils: formulation, physicochemical properties, antimicrobial and antioxidant efficiency. Journal of Food Measurement and Characterization 2022; 16(3): 1807-19.
9. Modareskia M, Fattahi M & Mirjalili MH. Thymol screening, phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of Iranian populations of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Apiaceae). Scientific Reports 2022; 12(15645): 1-15.
10. Shokohi T, Soteh MH, Pouri ZS, Hedayati MT & Mayahi S. Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. Indian Journal of Medical Microbiology 2010; 28(2): 147-51.
11. Dos-Santos ER, Dal-Forno CF, Hernandez MG, Kubica TF, Venturini TP, Chassot F, et al. Susceptibility of *Candida* spp. Isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo 2014; 56(6): 477-82.
12. Hosukoglu FG, Eksi F, Erinmez M & Ugur MG. An epidemiologic analysis of vulvovaginal Candidiasis and antifungal susceptibilities. Infectious Microbes and Diseases 2022; 4(3): 131-6.
13. Rahimkhani M, Saberian M, Mordadi AR, Varmazyar S & Tavakoli A. Urinary tract infection with *Candida glabrata* in a patient with spinal cord injury. Acta Medica Iranica 2015; 53(8): 516-7.
14. Dadpe MV, Dhore SV, Dahake PT, Kale YJ, Kendre SB & Siddiqui AG. Evaluation of antimicrobial efficacy of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) oil and chlorhexidine against oral bacteria: An in vitro study. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry 2018; 36(4): 357-63.
15. Ashrafi Tamai I, Zahraei Salehi T, Khosravi AR, Sharifzadeh A & Balal A. Chemical Composition and Anticandida Activity of *Trachyspermum ammi* Essential Oil on Azoles Resistant *Candida albicans* Isolates from Oral Cavity of HIV+ Patients. Journal of Medicinal Plants 2013; 12(46): 137-49[Article in Persian].
16. Natanzian-Ghahfarkhi M, Sattari M, Yadegari MH, Goudarzi GhR & Saharkhiz MJ. Antifungal activity of essential oil and alcoholic extract of *Carum copticum* against fluconazole-resistant and susceptible *Candida albicans* isolated. Journal of Pathobiology Research 2008; 11(1-2): 91-7[Article in Persian].
17. Shokri H, Sharifzadeh A & Khosravi AR. Antifungal activity of the *Trachyspermum ammi* essential oil on some of the most common fungal pathogens in animals. Iranian Journal of Veterinary Medicine 2016; 10(3): 173-80[Article in Persian].
18. Mehri-Ardestani M, Aliahmadi A, Toliat T, Dalimi AH, Momeni Z & Rahimi R. Evaluation of antimicrobial activity of *Trachyspermum ammi* (L.) sprague essential oil and its active constituent, thymol, against vaginal pathogens. Traditional and Integrative Medicine 2020; 5(2): 49-58.
19. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afan (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology 2003; 87(2-3): 215-20.
20. Ahmadi Z, Sattari M, Tabarrae B & Bigdeli M. Identification of the constituents of *Achillea santolina* essential oil and evaluation of the anti-microbial effects of its extract and essential oil. Journal of Arak University of Medical Sciences 2011; 14(3): 1-10[Article in Persian].

21. Sokmen A, Vardar-Unlu G, Polissiou M, Daferera D, Sokmen M & Donmeze E. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae). *Phytotherapy Research* 2003; 17(9): 1005-10.
22. Stojanovic G, Radulovic N, Hashimoto T & Palic R. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 101(1-3): 185-90.
23. Toplan GG, Taskın T, Iscan G, Goger F, Kurkcuoglu M, Civas A, et al. Comparative studies on essential oil and phenolic content with in vitro antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial activities of *achillea biebersteinii* afan. and a. *Millefolium* subsp. *Millefolium* afan. L. Growing in eastern Turkey. *Molecules* 2022; 27(6): 1956.
24. Movaghari-Pour A, Sheikh-Fathollahi M & Pour-Khosravani M. Comparison of antifungal effect of *achillea millefolium* extract with miconazole 2 on *Candida albicans*: An in vitro study. *Journal of Mashhad Dental School* 2016; 40(2): 149-58[Article in Persian].

Evaluation of Antifungal Effect of Alcoholic Extract of *Achillea Millefolium* and *Trachyspermum ammi* Against *Candida albicans* Isolated from Denture Stomatitis

Nazli Ebrahim Netaj¹ (D.D.), Maryam Rezaei Dastjerdi² (D.D.), Saham Ansari³ (Ph.D.), Kamran Amirian Chayjan^{2*} (D.D.), Mahdi Sepidar Kish⁴ (Ph.D.), Jalal Jafarzadeh⁵ (M.S.), Akbar Hoseinnezhad⁶ (M.S.), Mojtaba Taghizadeh Armaki^{7*} (Ph.D.)

1 Dentist, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

2 Assistant Professor, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3 Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Assistant Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

5 Master of Science in Medical Mycology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

6 Ph.D. Candidate in Medical Mycology, School of Medicine, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

7 Assistant Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Abstract

Received: 26 Aug. 2022

Accepted: 1 Nov. 2022

Background and Aim: Denture stomatitis is the most prevalent oral mucosal lesion among denture wearers. Because there have been multiple reports of resistance of *Candida* species to antifungal drugs in the last two decades, if the antifungal properties of *Achillea millefolium* and *Trachyspermum ammi* are validated, these compounds may be a suitable adjuvant drug along with the use of common antifungal drugs. Therefore, the current study aimed to assess the antifungal activity of alcoholic extracts of *Achillea millefolium* and *Trachyspermum ammi* against *Candida albicans* isolated from denture stomatitis.

Materials and Methods: Antifungal sensitivity of 50 isolates of *C. albicans* with the origin of denture stomatitis to the alcoholic extracts of *Achillea millefolium* and *Trachyspermum ammi* plants as well as the antifungal drugs miconazole and nystatin was determined by broth microdilution method and according to CLSI-M27S4 guidelines. The range of dilution for all compounds was 0.016-16 µg/ml. A concentration of compounds that showed at least 50% growth inhibition as compared to the positive control group was considered MIC (minimum growth inhibitory concentration). Statistical analysis was done using SPSS software and the significance level was considered as $P < 0.05$.

Results: The MIC ranges in microbroth dilution method for the antifungal drugs miconazole, nystatin, as well as the alcoholic extracts of *Achillea millefolium* and *Trachyspermum ammi* plants on *C. albicans*, were close to each other, indicating that their effectiveness against *C. albicans* species does not differ significantly ($P < 0.05$). The *Achillea millefolium* methanolic extract had the highest and lowest MIC values, with an average of 2.67 ± 2.55 µg/ml and 0.067 ± 0.057 µg/ml, respectively. A significant difference ($P < 0.001$) was observed when the MICs outcomes the herbal alcoholic extracts and antifungal drugs were compared.

Conclusion: Based on the obtained MICs, *Achillea millefolium* and *Trachyspermum ammi* alcoholic plant extracts have a lesser efficacy than the antifungal drugs, but even though they may have a lower MIC and more effectiveness than other chemical drugs.

Keywords: *Candida albicans*, *Achillea Millefolium*, *Trachyspermum ammi*, Nystatin, Miconazole, Denture Stomatitis

* Corresponding Authors:

Amirian Chayjan K

Taghizadeh Armaki M

Emails:

kamranamirian@gmail.com

M.Taghizadeh@mubabol.ac.ir