

Medical Ethics and Law
Research Center

Tārīkh-i pizishkī i.e., Medical History

2023; 15(48): e3

Shahid Beheshti
University of Medical Sciences

Investigating the Effect of Watery and Alcoholic Extract of *Calendula officinalis* in Inhibiting the Growth of Fungal Agents Isolated from Patients with Oral Candidiasis in *in Vitro* Conditions

Zahra Rafat¹, Masoumeh Faghani², Hamid NeshandarAsli³, Davoud Roostaei^{4*}, Yasaman Rahimabadi⁵

1. Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
2. Department of Anatomy, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
3. Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
4. Department of Pharmacology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
5. Student Research Committee, Anzali International Medical Campus, Guilan University of Medical Sciences, Guilan, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Nowadays, a large number of antifungal drugs are produced in the world. But the main problem is the resistance to these drugs and for this reason, finding new drugs and substances that have an antifungal effect has always been of interest to researchers in different fields. This study aimed to determine the antifungal effects of extracts of *Calendula officinalis* on the growth of fungal agents isolated from patients with oral candidiasis in *in vitro* conditions.

Methods: In this experimental study, watery and alcoholic extracts of *Calendula officinalis* were prepared by maceration method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of watery and alcoholic extract of *Calendula officinalis* was evaluated against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* according to the Clinical and Laboratory Standards Institute document M27-A3 (CLSI M27-A3) by microdilution protocol.

Ethical Considerations: In this paper, the originality of the text, honesty and trustworthiness are observed.

Results: The MIC and MFC of the watery extract of *Calendula officinalis* for *Candida albicans* were 512 µg/mL and for *Candida glabrata* were 1024 µg/mL, while the MIC and MFC of the alcoholic extract for *Candida krusei* and *Candida glabrata* were 16 µg/mL. Also, no sensitivity was observed for *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* to watery and alcoholic extracts. In addition, *Candida krusei* isolates were resistant to watery extract and *Candida albicans* isolates were resistant to alcoholic extract.

Conclusion: The results showed that the alcoholic extract of *Calendula officinalis* in comparison with the watery extract has a more inhibitory effect on *Candida glabrata* isolates.

Keywords: Watery Extracts of *Calendula Officinalis*; Alcoholic Extract of *Calendula Officinalis*; Oral Candidiasis; *Candida Albicans*; *Candida Glabrata*; *Candida Tropicalis*; *Candida Parapsilosis*; *Candida Krusei*

Corresponding Author: Davoud Roostaei; **Email:** droostaei@gmail.com.

Received: April 16, 2023; **Accepted:** April 23, 2023; **Published Online:** June 19, 2023

Please cite this article as:

Rafat Z, Faghani M, Neshandar Asli H, Roostaei D, Rahimabadi Y. Investigating the Effect of Watery and Alcoholic Extract of *Calendula Officinalis* in Inhibiting the Growth of Fungal Agents Isolated from Patients with Oral Candidiasis in *in Vitro* Conditions. *Tārīkh-i pizishkī, i.e., Medical History*. 2023; 15(48): e3.



مجله تاریخ پزشکی

دوره پانزدهم، شماره چهل و هشتم، ۱۴۰۲



مرکز تحقیقات سلامت و حقوق پزشکی

بررسی اثر عصاره آبی و الکلی گل همیشه بهار (*Calendula Officinalis*) در مهار رشد عوامل قارچی جدا شده از مبتلایان به کاندیدیازیس دهانی در شرایط آزمایشگاهی

زهرا رفعت^۱، معصومه فغانی^۲، حمید نشاندار اصلی^۳، داود روستائی^{۴*}، یاسمن رحیم آبادی^۵

۱. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۲. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۳. گروه پروتئین‌های دندانی، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۴. گروه داروشناسی (فارماکولوژی)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۵. کمیته تحقیقات دانشجویی، واحد پردیس، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، انزلی، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: امروزه تعداد زیادی از داروهای ضد قارچی در دنیا تولید می‌شوند، اما مسأله اصلی مقاومت به این داروها است و به همین دلیل یافتن داروهای جدید و موادی که اثر ضد قارچی داشته باشند، همواره مورد توجه پژوهشگران حوزه‌های مختلف بوده است. در این تحقیق به بررسی اثرات ضد قارچی عصاره گل همیشه بهار بر روی گونه‌های کاندیدیایی جدا شده از مبتلایان به کاندیدیازیس دهانی پرداخته می‌شود.

روش: در این مطالعه تجربی عصاره‌های آبی و الکلی گل همیشه بهار با روش خیساندن تهیه شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره‌های آبی و الکلی گل همیشه بهار علیه ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزه‌ای به روش میکرودایلوشین (پروتکل CLSI M27-A3) تعیین گردید.

ملاحظات اخلاقی: در این مقاله، اصالت متن، صداقت و امانتداری رعایت شده است.

یافته‌ها: MIC و MFC عصاره آبی گلبرگ گیاه همیشه بهار برای کاندیدا آلبیکنس ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کاندیدا گلابراتا ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که MIC و MFC عصاره الکلی برای کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا گلابراتا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین برای کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس نسبت به عصاره آبی و عصاره الکلی حساسیتی مشاهده نشد، به علاوه کاندیدا کروزه‌ای به عصاره آبی و کاندیدا آلبیکنس به عصاره الکلی مقاوم بودند.

نتیجه‌گیری: کاندیدا گلابراتا نسبت به هر دو نوع عصاره گل همیشه بهار حساس بود و عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی در غلظت کمتری قادر به مهار کردن رشد ایزوله‌های کاندیدا گلابراتای مورد آزمون بود.

واژگان کلیدی: عصاره آبی گل همیشه بهار؛ عصاره الکلی گل همیشه بهار؛ کاندیدازیس دهانی؛ کاندیدا آلبیکنس؛ کاندیدا گلابراتا؛ کاندیدا پاراپسیلوزیس؛ کاندیدا تروپیکالیس؛ کاندیدا کروزه‌ای

نویسنده مسئول: دکتر داود روستائی؛ پست الکترونیکی: droostaei@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۳؛ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹

خواهشمند است این مقاله به روش زیر مورد استناد قرار گیرد:

Rafat Z, Faghani M, Neshandar Asli H, Roostaei D, Rahimabadi Y. Investigating the Effect of Watery and Alcoholic Extract of *Calendula Officinalis* in Inhibiting the Growth of Fungal Agents Isolated from Patients with Oral Candidiasis in Vitro Conditions. *Tārīkh-i pizishkī*, i.e., *Medical History*. 2023; 15(48): e3.

مقدمه

قارچ‌ها از عوامل شایع ایجاد عفونت در بافت نرم دهان هستند. در میان عفونت‌های قارچی دهان، کاندیدیازیس شیوع بالایی دارد. مخمر فرصت‌طلب *Candida albicans* شایع‌ترین گونه کاندیدایی ایجادکننده کاندیدیازیس دهانی است (۱). در مطالعه E-orkoD و همکارانش روی نمونه سوآب دهانی ۱۷۱ فردی که از دندان مصنوعی استفاده می‌کردند، *Candida albicans* از ۹۵ بیمار، *Candida tropicalis* و *Candida parapsilosis* از ۲۰ بیمار، *Candida krusei* از ۱۴ بیمار، *Candida guilliermondii* از ۱۲ بیمار و *Candida lusitanae* از ۱ بیمار جدا شد (۲). کاندیدا جزء فلور نرمال دهان می‌باشد و شیوع آن در ۴۰ تا ۶۵ درصد بالغین سالم گزارش شده است. این ارگانیزم در مخاط زبان و کام نرم، گونه، لثه و یا حلق دیده می‌شود (۳). لازم به ذکر است که سطح پرزدار شکمی زبان و مخاط پالاتال (Palatal velum) زیر پروتز فک بالا نواحی مورد علاقه این قارچ می‌باشند و با فراهم شدن شرایط مناسب، از جمله حضور پروتز (مدت استفاده، طریقه تمیزنمودن، عدم تناسب و استفاده شبانه)، خشکی دهان، مصرف سیگار، سن (کودکان و سالمندان)، شرایط فیزیولوژیک بدن (بارداری)، ابتلا به دیابت و نقص سیستم ایمنی می‌تواند به صورت فرصت‌طلبانه ایجاد عفونت نماید (۳-۴). عفونت کاندیدایی دهان با ضایعات سفید کراتوتیک و غیر کراتوتیک مخاط دهان دیده می‌شود. کاندیدا از ۸۴ درصد از مبتلایان به برفک، ۷۵ درصد از مصرف‌کنندگان آنتی‌بیوتیک‌های دهانی، ۷۷ درصد از مبتلایان به التهاب لب و گوشه دهان (*Angular Cheilitis*)، ۶۹ درصد از مبتلایان به زخم‌های ناشی از پروتز، ۸۴ درصد از مبتلایان به کاندیدیازیس مزمن هایپریپلاستیک و ۱۰۰ درصد از مبتلایان به کاندیدیازیس مزمن پوستی - مخاطی جدا شده است (۵).

به علت ارتباط کاندیدیازیس دهانی با ایجاد سوءتغذیه در مبتلایان و به دنبال آن ضعف در سیستم ایمنی بدن تسریع روند بهبود این بیماری همواره مورد توجه پزشکان بوده است، زیرا این عفونت به طور معمول دیر و به سختی بهبود می‌یابد (۶)، لذا درمان صحیح آن برای افزایش سرعت بهبودی، همچنین جلوگیری از مزمن شدن همواره مد نظر بوده است. نکته قابل توجه آن است که حساسیت گونه‌های قارچی مختلف به عوامل ضد قارچی متفاوت است. گزارش‌های جدید مبنی بر مقاومت و یا کاهش حساسیت به آزول‌ها (مانند فلوکونازول که داروی روتین درمان انواع کاندیدیازیس می‌باشد) در پاتوژن‌هایی نظیر کاندیدا گلابراتا (*Candida glabrata*) و کاندیدا کروژنی می‌باشد. به همین خاطر طی سال‌های اخیر نیاز به کشف داروهای ضد قارچی جدید بیش از پیش احساس می‌شود.

نتایج یک مطالعه مروری سیستماتیک که به بررسی و جمع‌آوری عوارض جانبی ناشی از استفاده از داروهای ضد قارچی در ۴۴ مطالعه پرداخته است، نشان داد که شیوع کلی عارضه تب در بیماران تحت درمان از ۴ تا ۱۰۰ درصد برای آمفوتریسین B، از ۰ تا ۳۶ درصد برای آمفوتریسین B لیپوزومال و از ۱۲ تا ۸۸ درصد برای آمفوتریسین متغیر است (۷). علامت بالینی تهوع با یا بدون استفراغ اغلب برای بیماران که ایتراکونازول دریافت می‌کردند (۱۹/۷ درصد از بیماران دریافت‌کننده) (۷) و علائم تنفسی شامل برونکواسپاسم یا سرفه با یا بدون تنگی نفس یا هیپوکسی بیشتر برای ایتراکونازول (۹/۴ درصد از بیماران) و آمفوتریسین (۸/۵ درصد از بیماران) گزارش شد (۷). همچنین بالاترین میزان سمیت کلیوی در بیماران دریافت‌کننده آمفوتریسین B معمولی مشاهده شد (۳۲/۲ درصد) (۷). به علاوه نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از داروهای ضد قارچی با افزایش آنزیم‌های کبدی یا بیلی‌روبین کل، به میزان بیش از سه برابر مقدار نرمال ارتباط دارد (۷).

گیاه، pH خاک، ژنتیک گیاه و میزان رطوبت خاک) متفاوت است، جمع‌آوری اطلاعات در خصوص اثر ضد قارچی گل همیشه بهار که به صورت طبیعی در ایران می‌روید، ضروری به نظر می‌رسد.

ملاحظات اخلاقی

تحقیق حاضر از سوی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان به تأیید رسیده است (کد کمیته اخلاق: IR.GUMS.REC.1401.296).

اطلاعات جامع در رابطه با دلایل تحقیق، نتایج، حفظ محرمانگی و نحوه انجام تحقیق به افراد داده شد و رضایت آگاهانه از شرکت‌کنندگان اخذ گردید.

روش

۱. **سویه‌های قارچی و تهیه سوسپانسیون از ایزوله‌های مورد بررسی:** نمونه‌های قارچی به کاررفته در این تحقیق از نمونه‌های بالینی جداشده از مبتلایان به کاندیدیازیس دهانی در شرایط آزمایشگاهی که در پژوهش قبلی (کد اخلاق: IR.TUMS.SPH.REC.1400.030) جمع‌آوری شدند، تأمین و به صورت در دسترس انتخاب شدند. به این ترتیب که از کشت‌های مثبت از نظر عوامل قارچی مخمری تعدادی انتخاب و پس از تست تولید رنگ روی محیط‌های کروموژن و مولکولی (PCR-Sequencing) وارد مطالعه شدند. از سویه‌های قارچی مذکور که در محیط کشت ساپرو دکستروز آگار رشد کردند، ۲-۳ کلنی به لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی استریل اضافه و کاملاً مخلوط گردید، سپس کدورت آن با لوله استاندارد نیم مک فارلند تنظیم شد. برای به دست آوردن سوسپانسیون‌های یکنواخت از غلظت‌های قارچی، تعداد سلول‌های قارچی برای سوسپانسیون تهیه شده از سویه‌های مخمری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در

بنابراین عوارض جانبی متعدد داروهای ضد قارچی و مقاومت دارویی روزافزون قارچ‌ها به این داروها باعث شد تا تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی ادامه یابد.

گل همیشه بهار با نام علمی *Calendula officinalis* از خانواده Asteraceae گیاهی علفی و پایا با ساقه هوایی افراشته منشعب و گل‌های زردرنگ و بومی منطقه مدیترانه است (۸-۱۰). گلبرگ‌های تازه خشک‌شده این گیاه در طب قدیم با اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گرفت (۱۱-۱۳). این گیاه به علت دارابودن ترکیبات فیتوشیمیایی از قبیل فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، کاروتنوئیدها، تریترپنوئیدها و تانن‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی است (۱۳) و از خواص دارویی آن می‌توان به ضد نفخ معده و روده، تحریک‌کننده کار کلیه‌ها و افزایش‌دهنده جریان خون و فعالیت‌های قلبی اشاره کرد. همچنین در درمان تب، هموروئید و سرطان مؤثر است. عصاره هیدروالکلی گیاه همیشه بهار در درمان التهاب گلو، التهاب ناشی از استوماتیت و التهاب دهان و لثه اثربخشی قابل ملاحظه‌ای دارد (۱۴-۱۶). در مطالعات مختلف انجام‌شده در ایران و جهان خواص آنتی‌باکتریال گل همیشه بهار و نقش آن در بهبود التهابات دهانی ثابت شده (۱۲-۱۳، ۱۵، ۱۷)، اما تاکنون مطالعه جامعی پیرامون بررسی اثر ضد قارچی این گیاه در درمان عفونت کاندیدیازیس دهانی انجام نشده است.

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد قارچی گل همیشه بهار بر گونه‌های مختلف قارچی جداشده از دهان مبتلایان به کاندیدیازیس دهانی و امکان استفاده از عصاره آبی و الکلی این گیاه به عنوان فرآورده ضد قارچی در درمان عفونت‌های کاندیدیایی دهان به منظور ارائه به صنعت داروسازی جهت تولید فرآورده‌های دارویی می‌باشد. با توجه به اینکه ترکیبات عصاره‌های گیاهی و اثرات آنتی‌میکروبی آن‌ها تحت تأثیر فاکتورهای اندوژن و اگزوژن (میزان نور محیط، محل رشد

مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شدند تا عصاره‌های اولیه به دست آید. عصاره‌های اولیه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس عصاره حاصل در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت تا حلال آن‌ها تبخیر و عصاره‌های تغلیظ‌شده به دست آید. عصاره‌های تغلیظ‌شده در ظرف تیره استریل غیر قابل نفوذ نسبت به هوا و نور ریخته شد و تا زمان مصرف در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱).



طول موج ۵۳۰ نانومتر و با میزان عبور نور ۷۷-۷۵ درصد تقریباً حاوی ۱۰^۵ سلول در هر میلی‌لیتر تخمین زده شد.

۲. عصاره‌گیری از گل همیشه بهار: گلبرگ‌های گل همیشه بهار پس از تمیزشدن در شرایط مناسب و سایه خشک و سپس توسط آسیاب پودر شد. جهت تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی به روش خیساندن (Maceration) ۱۰۰ گرم از گلبرگ‌های پودر شده به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول ۹۶ درجه (به طور جداگانه) اضافه شد و ارلن به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق بر روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت تا استخراج عصاره به طور کامل انجام گیرد، سپس



شکل ۱: گلبرگ‌های پودر شده گیاه همیشه بهار (سمت چپ) و عصاره اولیه (سمت راست)

کنترل مثبت محتوی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی رقیق شده و چاهک کنترل منفی محتوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ بود. در چاهک اول ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی گلبرگ‌های گیاه همیشه بهار و در چاهک‌های دوم تا دهم، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ ریختیم و سپس به چاهک دوم از چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر

۳. تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی عصاره (MFC) به روش میکرودیالوژن طبق پروتکل CLSI/NCCSL M27-A3: در این روش به منظور ارزیابی اثر ضد قارچی عصاره الکلی گلبرگ‌های گیاه همیشه بهار، از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته صاف به ابعاد ۸×۱۲ استفاده شد. در هر سری دو چاهک آخر به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد که چاهک

در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر افزوده شد و با حرکت رفت و برگشت پیپت مخلوط گردید. رقت عصاره الکلی گلبرگ‌ها در مجاورت قارچ‌ها به ترتیب زیر بود:

4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 µg/mL

درصد) و کاندیدا کروزه‌ای (۳ عدد، ۱۰۰ درصد) نسبت به عصاره آبی و همه ایزوله‌های کاندیدا تروپیکالیس (۳ عدد، ۱۰۰ درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (۳ عدد، ۱۰۰ درصد) و کاندیدا آلبیکنس (۳ عدد، ۱۰۰ درصد) نسبت به عصاره الکلی گل همیشه بهار مقاومت نشان دادند. همچنین طبق این جدول همه ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس (۳ عدد، ۱۰۰ درصد) و کاندیدا گلابراتا (۳ عدد، ۱۰۰ درصد) نسبت به عصاره آبی گل همیشه بهار و همه ایزوله‌های کاندیدا کروزه‌ای (۳ عدد، ۱۰۰ درصد) و کاندیدا گلابراتا (۳ عدد، ۱۰۰ درصد) نسبت به عصاره الکلی گل همیشه بهار حساسیت نشان دادند.

MIC و MFC عصاره آبی گلبرگ گیاه همیشه بهار برای کاندیدا آلبیکنس ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کاندیدا گلابراتا ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که MIC و MFC عصاره الکلی برای کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا گلابراتا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین برای کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس نسبت به عصاره آبی و عصاره الکلی حساسیتی مشاهده نشد، به علاوه کاندیدا کروزه‌ای به عصاره آبی و کاندیدا آلبیکنس به عصاره الکلی مقاوم بودند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، کاندیدا گلابراتا نسبت به هر دو نوع عصاره گل همیشه بهار حساس بود و عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی در غلظت کمتری قادر به مهار کردن رشد ایزوله‌های کاندیدا گلابراتای مورد آزمون بود (جداول ۱ و ۲).

از عصاره الکلی گل همیشه بهار افزودیم. بعد از شیک کردن از چاهک شماره دو ۱۰۰ میکرولیتر از محلول (عصاره + RPMI) را به چاهک شماره سه افزوده و دور ریختیم و به همین ترتیب تا چاهک شماره ده پیش رفتیم و در نهایت بعد از شیک کردن از لوله شماره ده ۱۰۰ میکرولیتر محلول را دور ریختیم، سپس

میکروپلیت‌ها بدون هیچ‌گونه حرکتی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از طی این مدت حداقل غلظتی از عصاره که فاقد رشد قارچ بود، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ (MIC) در نظر گرفته شد، سپس از محتوی لوله MIC و دو لوله ماقبل آن مقدار ۲۰ میکرولیتر روی سابرو دکستروز آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بالاترین رقت موجود از عصاره که در آن رشد قارچ مشاهده نشد، به عنوان MFC این عصاره در نظر گرفته شد. همین روش برای عصاره آبی گل همیشه بهار نیز تکرار شد.

۴. روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: نتایج با استفاده از کامپیوتر در جداول مورد نظر جمع‌آوری و با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2022 و SPSS 24 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk Test) استفاده شد.

یافته‌ها

جداول ۱ و ۲ بیانگر حداقل غلظت ضد قارچی و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره‌های آبی و الکلی گل همیشه بهار بر روی گونه‌های کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا (۳ ایزوله از هر گونه) می‌باشند. همه ایزوله‌های کاندیدا تروپیکالیس (۳ عدد، ۱۰۰ درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (۳ عدد، ۱۰۰

جدول ۱: نتایج اثر ضد قارچی (MIC) عصاره آبی گل همیشه بهار روی گونه‌های کاندیدایی مورد مطالعه به روش میکروداپلوشن

| نوع عصاره | نوع گونه کاندیدا | غلظت عصاره آبی گل همیشه بهار (میکروگرم بر میلی‌لیتر) در میکروپلیت | | | | | | | | | | کنترل مثبت | کنترل منفی |
|-----------|----------------------|---|------|------|-----|-----|-----|----|----|----|---|------------|------------|
| | | ۴۰۹۶ | ۲۰۴۸ | ۱۰۲۴ | ۵۱۲ | ۲۵۶ | ۱۲۸ | ۶۴ | ۳۲ | ۱۶ | ۸ | | |
| آبی | کاندیدا تروپیکالیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا تروپیکالیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا تروپیکالیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا پاراپسیلوزیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا پاراپسیلوزیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا پاراپسیلوزیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا کروزه‌ای | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا کروزه‌ای | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا کروزه‌ای | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا آلبیکنس | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا آلبیکنس | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا آلبیکنس | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا گلابراتا | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا گلابراتا | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| آبی | کاندیدا گلابراتا | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |

+ : رشد قارچ؛ - : عدم رشد قارچ.

جدول ۲: نتایج اثر ضد قارچی (MIC) عصاره الکلی گل همیشه بهار روی گونه‌های کاندیدایی مورد مطالعه به روش میکروداپلوشن

| نوع عصاره | نوع گونه کاندیدا | غلظت عصاره الکلی گل همیشه بهار (میکروگرم بر میلی‌لیتر) در میکروپلیت | | | | | | | | | | کنترل مثبت | کنترل منفی |
|-----------|----------------------|---|------|------|-----|-----|-----|----|----|----|---|------------|------------|
| | | ۴۰۹۶ | ۲۰۴۸ | ۱۰۲۴ | ۵۱۲ | ۲۵۶ | ۱۲۸ | ۶۴ | ۳۲ | ۱۶ | ۸ | | |
| اتانولی | کاندیدا تروپیکالیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا تروپیکالیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا تروپیکالیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا پاراپسیلوزیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا پاراپسیلوزیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا پاراپسیلوزیس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا کروزه ای | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا کروزه ای | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا کروزه ای | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا آلبیکنس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا آلبیکنس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا آلبیکنس | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| اتانولی | کاندیدا گلابراتا | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا گلابراتا | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| اتانولی | کاندیدا گلابراتا | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |

+ : رشد قارچ؛ - : عدم رشد قارچ.

بحث

عوارض جانبی متعدد داروهای ضد قارچی و مقاومت روزافزون قارچ‌ها به این داروها باعث شده تا تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی ادامه یابد. مطالعات نشان داده‌اند که عصاره‌های آبی و الکلی گیاه همیشه بهار در درمان التهاب ناشی از استوماتیت و التهاب دهان و لثه اثربخشی قابل ملاحظه‌ای دارند (۱۶-۱۴). از طرفی، در مطالعات مختلف انجام‌شده در ایران و جهان خواص آنتی باکتریال گل همیشه بهار و نقش آن در بهبود التهابات دهانی ثابت شده (۱۳-۱۲، ۱۵، ۱۷)، اما تاکنون مطالعه جامعی در خصوص اثر ضد قارچی این گیاه در درمان عفونت کاندیدایزیس دهانی (شایع‌ترین عفونت قارچی دهان) انجام نشده است. به همین دلیل این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد قارچی گل همیشه بهار بر گونه‌های مختلف قارچی (کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا) جداشده از دهان مبتلایان به کاندیدایزیس دهانی و امکان استفاده از عصاره آبی و الکلی این گیاه به عنوان فرآورده ضد قارچی در درمان عفونت‌های کاندیدایی دهان انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که همه ایزوله‌های کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزه‌ای نسبت به عصاره آبی و همه ایزوله‌های کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا آلبیکنس نسبت به عصاره الکلی گل همیشه بهار مقاومت نشان دادند. همچنین همه ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا نسبت به عصاره آبی و همه ایزوله‌های کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا گلابراتا نسبت به عصاره الکلی گل همیشه بهار حساسیت نشان دادند. در مطالعه‌ای که

توسط Efstratiou و همکاران در سال ۲۰۱۲ در انگلیس انجام شد، اثر ضد قارچی عصاره متانولی و اتانولی گل همیشه بهار روی ایزوله‌های استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC 90028)، کاندیدا کروزه‌ای (ATCC 6258)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (ATCC 22019)، کاندیدا گلابراتا (ATCC 2001)، آسپرژیلوس نایجر (۲۷)، آسپرژیلوس فومیگاتوس (۲۷/۵)، آسپرژیلوس فلاووس (GC 6158) و اگزوفیالا درماتیتیدیس (GC 7895) به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد هر دو عصاره متانولی و اتانولی گل همیشه بهار اثر ضد قارچی قابل توجهی روی ایزوله‌های قارچی تست شده دارند (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Gazim و همکاران در سال ۲۰۰۸ در برزیل انجام شد، اثر ضد قارچی عصاره گل همیشه بهار روی ایزوله‌های استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC64548)، کاندیدا دابلینینسیس (ATCC777)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (ATCC22019)، کاندیدا گلابراتا (ATCC90030)، کاندیدا کروزه‌ای (ATCC6258) و ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا دابلینینسیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گیلرموندی، کاندیدا کروزه‌ای و رودوتورولا (جداشده از نمونه‌های خون، ادرار، ولوواژینیت کاندیدایی، کلونیزاسیون دست، اونیکومایکوزیس و ضایعات گرانولوماتوز) به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که گل همیشه بهار روی تمام ایزوله‌های مورد بررسی اثر ضد قارچی قابل توجهی دارد (۱۹)، به علاوه در مطالعه‌ای که توسط Kasiram و همکاران در سال ۲۰۰۰ در هند انجام شد، اثر ضد قارچی عصاره‌های

از دیگر نتایج مطالعه این بود که قارچ کاندیدا آلبیکنس به عصاره آبی گل همیشه بهار حساس است و عصاره آبی حاصل از این گیاه می‌تواند در درمان کاندیدیازیس دهانی ناشی از کاندیدا آلبیکنس مؤثر باشد.

اگرچه کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی ایجادکننده کاندیدیازیس است، اما در دهه اخیر شیوع گونه‌های غیر آلبیکنس رو به فزونی نهاده است. قارچ‌هایی همچون کاندیدا فاماتا و کاندیدا اینکوسپیکا اخیراً به لیست پاتوژن‌های بالقوه افزوده شده‌اند. یکی از مهم‌ترین عوامل این تغییر در نوع عامل ایجادکننده بیماری، مصرف بی‌رویه داروهای ضد قارچی است، به طوری که مصرف طولانی‌مدت این داروها باعث می‌شود گونه‌هایی از کاندیدا که به طور ذاتی مقاومت بیشتری نسبت به این مواد دارند، باقی مانده و گونه‌های حساس حذف شوند. به عنوان مثال گونه‌های گلابراتا و کروزه‌ای مقاومت بیشتری نسبت به فلوکونازول از خود نشان می‌دهند (۲۱، ۲۸). استفاده وسیع از فلوکونازول برای سرکوب عفونت‌های قارچی در بیماران آلوده به ویروس HIV و درمان‌های پروفیلاکسی در بیماران با بیماری‌های زمینه‌ای از یک طرف و مقاومت ذاتی کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا گلابراتا به داروهای آزولی از طرف دیگر باعث افزایش جداسازی این‌گونه مخمری به عنوان عامل ایجادکننده عفونت شده است (۲۲-۲۱). در این مطالعه کاندیدا گلابراتا نسبت به هر دو نوع عصاره گل همیشه بهار حساس بود و عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی در غلظت کمتری قادر به مهارکردن رشد ایزوله‌های کاندیدا گلابراتای مورد آزمون بود. بنابراین نتایج این مطالعه نشان داد عصاره الکلی گل همیشه بهار می‌تواند جایگزین مناسبی برای فلوکونازول در درمان کاندیدیازیس دهانی ناشی از کاندیدا گلابراتا باشد. همچنین نشان داد کاندیدا کروزه‌ای به عصاره الکلی گل همیشه بهار حساس است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره آبی گل همیشه بهار بر گونه‌های کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس و

کلروفرمی، استونی و اتانولی گل همیشه بهار روی آسپرژیلوس نایجر، رایزوپوس ژاپونیکوم، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و رودوتورولا گلوئینیس با روش چاهک‌گذاری بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تمام انواع عصاره‌های تست‌شده گل همیشه بهار روی همه ایزوله‌های ضد قارچی اثر قابل توجهی دارند (۲۰). تفاوت در نتایج مطالعه ما با سایر مطالعات می‌تواند به این علت باشد که ترکیبات عصاره‌های گیاهی و اثرات آنتی‌میکروبی آن‌ها تحت تأثیر فاکتورهای اندوژن و اگزوژن (میزان نور محیط، محل رشد گیاه، pH خاک، ژنتیک گیاه و میزان رطوبت خاک) متفاوت است. به عبارت دیگر با توجه به اینکه شرایط جغرافیایی بر مقدار و حتی نوع متابولیت‌ها مؤثر است، استخراج عصاره گیاهان در مناطق مختلف رشد آن‌ها می‌تواند نتایج ضد قارچی متفاوتی داشته باشد.

مخمر فرصت‌طلب کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین گونه کاندیدایی ایجادکننده کاندیدیازیس دهانی است (۱). داروهای گروه آزول به ویژه فلوکونازول، از جمله مؤثرترین داروهای مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از گونه‌های کاندیدا و نیز رایج‌ترین، مؤثرترین و پرمصرف‌ترین عامل ضد قارچی شناخته شده و سردرد، سرگیجه، راش پوستی، تهوع، درد شکمی، استفراغ، اسهال، اختلال چشایی، سوءهاضمه، پاتیت فولمینانت، هپاتیت، افزایش سطح سرمی آلکالین فسفاتاز، افزایش سطح سرمی آسپاراتات آمینوترانسفراز، افزایش سطح ترانس آمیناز و یرقان از عوارض مصرف این داروها می‌باشند. همچنین فلوکونازول دارای تداخل با داروهای پرپیانت، آستمیزول، آساناپرویر، بوسوتینیب، بودزوناید (سیستمیک)، سیزاپراید، کوبی متینیب، دمپریدون، انترکتینیب، اریترومایسین (سیستمیک)، فدراتینیب، فکسی نیدازول [INT]، فلیبانسین، فوس آپریتانت، ایوآبرادین، لمبورکسانت، لومیتاپید، لوماتپرون، میزولاستین، نالوکسگل، اوسپمیفن، پیموزاید، کینیدین، سیمپرویر، ساکارومایسس بولاردی، سیپونیمود، اولیپریستال و وریکونازول می‌باشد و اثر داروهای آموگوتریسین بی، کلویپدوگرل، ایفوسفامید و لوزارتان را کاهش می‌دهد (۶).

کاندیدای کروزه‌ای اثر ضد قارچی ندارد، ولی بر روی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا اثر ضد قارچی دارد، به علاوه عصاره الکلی گل همیشه بهار روی کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس اثر ضد قارچی نداشت، ولی در مهار رشد کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزه‌ای مؤثر بود. به طور کلی عصاره الکلی گل همیشه بهار نسبت به نوع آبی آن اثر ضد قارچی بیشتری روی کاندیدا گلابراتا دارد. بنابراین در درمان عفونت‌های کاندیدایی دهان با استفاده از عصاره‌های گل همیشه بهار، تعیین هویت قارچ‌های عامل بیماری در آزمایشگاه قارچ‌شناسی ضروری است. در ادامه لازم است مطالعات بیشتری در شرایط *in vitro* انجام شود تا بتوان این عصاره را به عنوان یک ماده ضد قارچی طبیعی و جدید معرفی کرد.

مشارکت نویسندگان

زهرا رفعت: نگارش مقاله و جمع‌آوری داده‌ها.
معصومه فغانی، حمید نشاندار اصلی و داود روستائی: نظارت و راهنمایی بر مقاله.
یاسمن رحیم‌آبادی: گردآوری مقاله.
نویسندگان نسخه نهایی را مطالعه و تأیید نموده و مسئولیت پاسخگویی در قبال پژوهش را پذیرفته‌اند.

تشکر و قدردانی

ابراز نشده است.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافع احتمالی را در رابطه با تحقیق، تألیف و انتشار این مقاله اعلام نکرده‌اند.

تأمین مالی

نویسندگان اظهار می‌نمایند که هیچ‌گونه حمایت مالی برای تحقیق، تألیف و انتشار این مقاله دریافت نکرده‌اند.

References

- Friedland JS. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th ed. London, UK: Hodder Arnold Publisher; 2005.
- Dağistan S, Aktas AE, Caglayan F, Ayyildiz A, Bilge M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, Candida and their variations in patients using complete denture: A clinical and mycological study. *Mycoses*. 2009; 52(3): 266-271.
- Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. Essentials of clinical mycology. New York: Springer New York; 2011.
- Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE, editors. Essentials of clinical mycology. New York: Springer New York; 2011.
- Lewis MA. Burket's Oral Medicine. Diagnosis and Treatment. Edited by Greenberg MS, Glick M. 10th ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2003.
- Zaini F, Mahbod ASA, Emami M. Comprehensive medical mycology. 5th ed. Tehran: Tehran University Publications; 2016. [Persian]
- Girois SB, Chapuis F, Decullier E, Revol BG. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006; 25(2): 138-149.
- Khare CP. Indian medicinal plants: an illustrated dictionary. 10th ed. New Delhi: Springer Science & Business Media; 2008.
- Gerard J. The herbal or general history of plants. 163th ed. Mineola, New York: Courier Dover Publications; 2015.
- Bone K, Mills S. Principles and practice of phytotherapy: Modern herbal medicine. 2nd ed. New England: Elsevier Health Sciences; 2012.
- Nelofer J, Khurshid IA, Riffat J. Calendula officinalis - An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Indian National Science Academy*. 2017; 83(4): 769-787.
- Pazhohideh Z, Mohammadi S, Bahrami N, Mojab F, Abedi P, Maraghi E. The effect of Calendula officinalis versus metronidazole on bacterial vaginosis in women: A doubleblind randomized controlled trial. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2018; 9(1): 15-19.
- Olfati A, Kahrizi D, Balaky ST, Sharifi R, Tahir MB, Darvishi E. Green synthesis of nanoparticles using Calendula officinalis extract from silver sulfate and their antibacterial effects on Pectobacterium caratovorum. *Inorganic Chemistry Communications*. 2021; 125(1): 108439.
- Cruceriu D, Balacescu O, Rakosy E. Calendula officinalis: Potential roles in cancer treatment and palliative care. *Integrative Cancer Therapies*. 2018; 17(4): 1068-1078.
- Patil K, Sanjay C, Doggalli N, Devi KR, Harshitha N. A Review of Calendula Officinalis-Magic in Science. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. 2022; 16(2): 53-60.
- Simões FV, Santos VO, Silva RN, Silva RC. Effectiveness of skin protectors and calendula officinalis for prevention and treatment of radiodermatitis: An integrative review. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2020; 73(3): 11-17.
- Babae N, Moslemi D, Khalilpour M, Vejdani F, Bijani A, Akbar Moghadamnia A, Ameri A. Investigation of the effect of Calendula officinalis extract on preventing radiotherapy-induced oral mucositis. *Reports of Radiotherapy and Oncology*. 2013; 1(1): 3-9.
- Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of Calendula officinalis petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2012; 18(3): 173-176.
- Gazim Z, Rezende C, Fraga S, Dias Filho B, Nakamura Cortez D. Analysis of the essential oils from Calendula officinalis growing in Brazil using three different extraction procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 44(1): 391-395.
- Kasiram K, Sakharkar PR, Patil AT. Antifungal activity of Calendula officinalis. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 62(6): 464-468.
- Chander J. Textbook of medical mycology. 5th ed. London: JP Medical Ltd; 2017.
- Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida species. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 12(7): 2173.