

تأثیر عصاره الکلی میوه *Pistacia atlantica* (بنه) بر روی ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از مبتلایان به دنچر استوماتیت در مقایسه با نیستاتین

رضا بازیار^۱، فاطمه خواجه‌زاده^{۲*}، مارال قرقانی^۳، اسماعیل پناهی کوخدان^۴، حسن بردانیا^۴

^۱گروه دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۲گروه پاتولوژی دهان و فک و صورت، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۳مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۴مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: دنچر استوماتیت شایع‌ترین عفونت قارچی دهانی در سالمندان است که عمدتاً به وسیله کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌شود، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره هیدروالکلی میوه درخت بنه (*Pistacia atlantica*) در مقایسه با نیستاتین علیه ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به دنچر استوماتیت بود.

روش بررسی: این یک مطالعه توصیفی - آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۲ انجام شد و از ۱۹ بیمار سالمند مبتلا به دنچر استوماتیت نمونه‌برداری شد. ایزوله‌های کاندیدا با کشت روی سابورو دکستروز آگار، کروم آگار کاندیدا، تست جرم تیوب و رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد شناسایی و تأیید شدند. در نهایت ۱۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس به دست آمد. عصاره هیدروالکلی میوه بنه با روش ماسراسیون تهیه و حساسیت‌سنجی به روش برات میکرودیوژن (CLSI M27-S4) در محیط RPMI ۱۶۴۰ در سه تکرار انجام گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری شاپرویلک، نان پارامتریک و ویلکاکسون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: دامنه MIC عصاره بنه ۱-۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، MIC ۵۰، ۱ و MIC ۹۰ برابر با ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. دامنه MIC نیستاتین ۰/۱۲۵ تا بیش از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، MIC ۵۰، ۰/۱۲۵ و MIC ۹۰، ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. تفاوت بین MIC دو ترکیب از نظر آماری معنی‌دار بود (آزمون ویلکاکسون $p=0/004$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی میوه درخت بنه فعالیت ضدقارچی قابل‌توجهی علیه ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس دارد، هرچند به‌طور معنی‌داری ضعیف‌تر از نیستاتین عمل می‌کند. این عصاره می‌تواند به‌عنوان مکمل یا پایه‌ای برای توسعه فرآورده‌های گیاهی ضدقارچی موضعی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: استوماتیت، دنچر، کاندیدا آلبیکنس، عصاره‌های گیاهی، نیستاتین

* نویسنده مسئول: فاطمه خواجه‌زاده، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، گروه پاتولوژی دهان و فک و صورت

Email: fatemeh.khajezhadeh@yums.ac.ir

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

امروزه یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تهدیدکننده سلامت دهان در بیماران دارای پروتزهای دندانی (دندانهای مصنوعی)، دنچر استوماتیت است که نوعی التهاب مزمن مخاط دهان در ناحیه زیر پروتز است و با علایمی چون اریتم، ادم، درد و سوزش همراه است (۱). کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی این بیماری می‌باشد. عوامل خطر این بیماری شامل: مصرف آنتی‌بیوتیک، دیابت، ضعف سیستم ایمنی و بهداشت ضعیف دنچر، بارداری، داروهای ضد بارداری، تماس بلندمدت پوست با آب، درمان با استروئیدهای موضعی و برخی از بیماری‌های غدد است که باعث بیماری‌زا شدن این مخمرها می‌گردند (۲).

درمان‌های رایج برای دنچر استوماتیت شامل: میکونازول، کلوتریمازول، کلرگزیدین، فلوکنازول و نیستاتین است (۳-۶). نیستاتین به دلیل اثربخشی بالا و ایمنی در سنین مختلف، درمان انتخابی است (۷ و ۸)، اما طعم نامطلوب و عوارض گوارشی از شایع‌ترین مشکلات آن است (۹).

در دهه‌های اخیر افزایش مقاومت‌های دارویی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از یک سو و آثار زیان بار ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها از سوی دیگر و همچنین هزینه‌های گزاف درمان‌های ترکیبی و عوارض جانبی نامطلوب آنها باعث افزایش تمایل نسبت به روش‌های جایگزین، نظیر استفاده از داروهای گیاهی شده است (۱۰ و ۱۱). ترکیبات گیاهی

به دلیل عوارض جانبی کمتر، خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی، حفظ تعادل فلور دهانی و سازگاری با رویکردهای سنتی، گزینه‌های ایمن‌تری برای بیماران حساس به داروهای شیمیایی هستند (۱۲).

در ایران از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد داشته است و امروزه در بسیاری از جوامع پیشرفته نیز از ترکیبات گیاهی مختلف جهت مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده می‌شود (۱۲) از جمله مطالعه‌ای که بروی عسل انجام شده و نتیجه قابل قبولی در ارتباط با خاصیت ضدقارچی به دست آمده است (۱۳) و عصاره‌های اتانولی تهیه شده از برگ و پیاز *Fessia khorassanica* اثر مهاری بالایی نسبت به شاهد بر روی کاندیدا آلبیکانس داشته است (۱۴) و همچنین عصاره متانولی پوست میوه و برگ گردو، دارای قابلیت ضد قارچی بر روی گونه‌های کاندیدا می‌باشد (۱۵). یکی از این گیاهان که بسیار مورد مطالعه قرار گرفته بنه (*Pistacia atlantica*) می‌باشد. بنه از خانواده آناکاردیاسه، یکی از گونه‌های پسته وحشی در ایران است که دارای ارقام *mutica*، *kurdica*، *cabulica* می‌باشد و انتشار آن از جزایر قناری و کشورهای ساحل دریای مدیترانه شروع می‌شود و تا آسیای صغیر، سوریه، قفقاز، ایران، افغانستان و پاکستان امتداد می‌یابد (۱۶). در استان کهگیلویه و بویراحمد، این گونه به وفور یافت می‌شود و در طب سنتی برای درمان عفونت‌ها، زخم‌ها و التهابات دهانی استفاده می‌شود.

صمغ بنه علی‌رغم عملکردهای مختلف درمانی، دارای سطح بالایی از مس، آهن و روی می‌باشد (۱۷) و همچنین ترکیبات فعال اسانس برگ، میوه و صمغ درخت بنه شامل؛ رزین و روغن فرار و آلفا پینن و بتا پینن، سابینن و لیمونن هستند (۱۶-۱۸). این صمغ، به دلیل افزایش ترشح بزاق و جلوگیری از تجمع پلاک و همچنین به دلیل عملکرد آنتی‌اکسیدانی طبیعی، بیماری لثه را بهبود می‌بخشد و از دندان‌ها محافظت می‌کند و در مواردی از صمغ بنه به عنوان ماده‌ای برای پرکردن دندان‌ها نیز استفاده می‌شود (۲۱-۱۹)، لذا با توجه به افزایش مقاومت گونه‌های قارچ، هزینه بالای درمان‌های ترکیبی، عوارض جانبی داروهای شیمیایی و پتانسیل بالای گیاهان دارویی بومی، بررسی اثرات ضدقارچی عصاره میوه بنه بر ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس ضروری به نظر می‌رسد (۱۸)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره هیدروالکلی میوه درخت بنه (*Pistacia atlantica*) در مقایسه با نیستاتین علیه ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جداشده از بیماران مبتلا به دنچر استوماتیت بود.

روش بررسی

این یک مطالعه توصیفی - آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۲ انجام شد، نمونه‌گیری از دهان ۱۹ بیمار سالمند دارای دنچر استوماتیت که در مراکز سالمندان شهر یاسوج زندگی می‌کردند و همچنین بیماران

بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان شهید جلیل شهر یاسوج، انجام شد. برای این منظور با استفاده از سوآپ استریل از ضایعات سفیدرنگ زیر دست دندان موجود در دهان بیماران نمونه برداشته شد و مستقیماً بر روی پلیت محیط کشت سابوردکستروز آگار کشت گردید. سپس، نمونه‌های کشت به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی یاسوج منتقل و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوبه شد.

به منظور اطمینان از خالص بودن تمامی ایزوله‌های کاندیدای رشد کرده در مرحله نمونه‌گیری، با استفاده از آب مقطر استریل از آن‌ها لام تهیه شد. لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ بررسی و پس از اطمینان از وجود مخمرهای تک سلولی با یا بدون جوانه جهت ذخیره‌سازی در آب مقطر استریل استفاده و در نهایت محلول‌های حاوی آب مقطر و کلونی قارچی در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این مطالعه معیار ورود بیماران، افراد سالمند با تشخیص بالینی دنچر استوماتیت بود و بیمارانی که سابقه مصرف داروی ضدقارچی در ۲ هفته اخیر را داشتند و یا مبتلا به بیماری‌های سیستمیک کنترل‌نشده مانند دیابت و سرطان فعال بودند از مطالعه خارج شدند.

مقدار ۶۵ گرم از پودر محیط کشت سابوردکستروز آگار، به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در ارلن مایر اضافه گردید و به کمک حرارت تا زمانی که محلول شفاف شود، جوشانده شد، سپس به مدت

جهت استریل کردن محیط کشت با استفاده از دستگاه هود لامینار (مدل JTLV C2X) که در جهت اعمالی که نیاز به محیط استریل و خالص دارند مورد استفاده قرار گرفت و در شیشه‌های استریل که از قبل اتوکلاو شده بودند ریخته شد. از این محیط جهت تهیه رقت‌های دارویی و مخمری در تست حساسیت دارویی استفاده گردید.

با توجه به این که برای محاسبه، MIC₅₀³ (حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک جهت مهار ۵۰ درصد از تمامی سویه‌های باکتریایی) MIC₉₀² (حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک جهت مهار ۹۰ درصد از تمامی سویه‌های باکتریایی) هر دارو ضد قارچ نیاز به حداقل ده ایزوله مختلف می‌باشد (۲۲)، در این مطالعه از ده ایزوله بالینی کاندیدا آلبیکنس استفاده شد و جهت بالا بردن دقت کلیه تست‌ها طبق دستورالعمل CLSI M₂₇A₃ (برای قارچ‌های مخمری) به صورت سه بار تکرار انجام گرفت.

به منظور شناسایی فنوتایپی، ایزوله‌های کاندیدای رشد کرده بر روی محیط سابوردکستروز آگار، بر روی محیط کروم آگار کاندیدا کشت داده شدند و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس، کلونی‌های سبز رنگ تشکیل شده بر روی محیط کروم آگار کاندیدا به عنوان ایزوله کمپلکس گونه‌ای کاندیدا آلبیکنس شناسایی گردید.

مقدار ۵۰۰ میکرولیتر سرم تازه انسان را درون لوله آزمایشگاه ریخته و به آن یک لوپ پر از

۱۵ دقیقه در اتوکلاو با حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند استریل گردید. پس از بیرون آوردن محیط از اتوکلاو، محیط کشت در پلیت‌های استریل تقسیم شد. از این محیط جهت کشت ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس در هنگام نمونه‌گیری و آماده‌سازی جهت تست دارویی استفاده گردید.

از جمله محیط‌های کشت جدید برای افتراق کاندیدا‌های شایع، محیط کروم آگار یا کروموژنیک آگار است. این محیط کشت حاوی ۱۰ گرم پپتون، ۲۰ گرم گلوکز، ۱۵ گرم آگار، ۰/۵ گرم کلرامفنیکل و گروهی از مواد رنگ‌زا (کروموژنیک میکس) به میزان ۲ گرم در هر لیتر می‌باشد. ماده کروموژن موجود در محیط کشت با سوبسترای آنزیم مورد ارزیابی که توسط میکروارگانیزم تولید می‌شود به صورت باند می‌باشد. خصوصیت ویژه این محیط کشت این است که کلونی هر کدام از گونه‌های شایع کاندیدا پس از رشد روی این محیط به رنگ خاصی است (کلونی سبز: مشکوک به کاندیدا آلبیکنس) که با سایر گونه‌ها اشتباه نمی‌شود. تنوع رنگی ایجاد شده مربوط به واکنش بین آنزیم‌های اختصاصی هر گونه با سوبسترای رنگ‌زای موجود در محیط کشت است.

ترکیبات محیط RPMI ۱۶۴۰ شامل ۱۷/۲۷ گرم پودر موپس (بیوبیسیک، ساخت کانادا) و ۵/۰۲ گرم پودر RPMI (گیبوکو، ساخت انگلستان) و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. ترکیبات فوق پس از آن که مخلوط شدند pH آن‌ها با استفاده از سدیم هیدراکساید ۴ درصد (کیان کاوه، ایران) روی ۷ تنظیم شد. سپس

کلونی کشت مخمری ۲۴ ساعته که از محیط جامد برداشته شده است اضافه گردید. سپس آن را به صورت یک سوسپانسیون در آورده و به مدت ۲-۳ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت این مدت یک قطره از سرم حاوی مخمر را روی لام قرار داده و با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به الگوی مشابه فنوتایپی ایزوله‌های کاندیدا آلبیکانسنس و کاندیدا دابلینینسیس (*Candida dubliniensis*) در کشت بر روی محیط کرم آگار کاندیدا، از تست ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای افتراق آن‌ها استفاده گردید (۲۳) بدین منظور تمامی ایزوله‌ها روی محیط سابوردکستروز آگار انکوبه و در در انکوباتور در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

میوه درخت بنه، از ارتفاعات کوه‌های اطراف شهرستان بویراحمد (جاده شهرستان اقلید به یاسوج) تهیه شد و در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مورد تأیید قرار گرفت. پس از خشک شدن میوه‌های درخت، با استفاده از آسیاب برقی پودر شدند. به منظور تهیه عصاره از روش ماسراسیون استفاده گردید. بدین صورت که مقدار مناسبی از پودر درون ظرف ریخته شده و به آن هیدروالکل ۷۰ درصد اضافه شد، سپس به مدت ۳ روز در دمای اتاق قرار گرفت. عصاره به دست آمده در این مرحله به وسیله قیف جدا کننده و به صورت قطره قطره جمع‌آوری گردید. پس از خشک نمودن عصاره

در حرارت ۴۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد، به منظور خشک نمودن بیشتر، به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه دسیکاتور قرار داده شد پس از آن عصاره خشک شده از کف ظروف تراشیده شده و با هاون چینی به صورت کامل به صورت پودر درآمده و عصاره خشک شده در DMSO ۵ درصد حل و غلظت‌های ۰/۵ تا ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس برای استفاده در ویال‌های در بسته تقسیم بندی شدند.

در این بررسی حساسیت ۱۰ ایزوله کاندیدا آلبیکانسنس جداسازی و شناسایی شده در مرحله قبل، علیه ترکیب نیستاتین، عصاره الکلی میوه درخت بنه، مطابق با دستورالعمل CLSI M₂₇S₄ برای مخمرها در محیط RPMI 1640، با کنترل مثبت و منفی در ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جهت تهیه سوسپانسیون مخمری از مخمرهای کاندیدا کشت شده بر روی محیط سابوردکستروز آگار که در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده بودند استفاده شد. به این منظور مقداری از کلونی مخمری در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس و سپس با خوانش اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر از آن محلول نیم مک فارلند تهیه گردید. بر طبق روش CLSI خوانش جذب ۰/۱۳ - ۰/۰۸ برابر با نیم مک فارلند است. سپس از سوسپانسیون حاصل مطابق دستور العمل به رقت ۱:۱۰۰۰ (۱:۲۰ و ۱:۵۰) با RPMI ۱۶۴۰ رقیق شد.

برای انجام تست ابتدا از غلظت اولیه مورد استفاده برای هر کدام از داروهای ذکر شده در RPMI۱۶۴۰ یک غلظت سریالی تهیه و رقیق شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌ها به ترتیب درون چاهک هر کدام از میکرو پلیت‌های ۹۶ خانه ای ریخته شد و در پایان مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری رقیق شده که در مرحله قبل تهیه شده بود به آن اضافه گردید. در هر پلیت کنترل مثبت شامل سوسپانسیون مخمری بدون دارو به همراه RPMI۱۶۴۰ و کنترل منفی شامل دارو بدون سوسپانسیون مخمری جهت کنترل صحت تست قرار داده شد، تمامی پلیت‌ها در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند.

در این مطالعه MIC محاسبه شد. سپس MIC_۰ یا کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی رشد به ترتیب ۵۰ و ۹۰ درصد ایزوله‌ها برای دارو به تفکیک گونه محاسبه گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری شاپرویلک، نان پارامتریک و ویلکاکسون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این بررسی در مجموع از ۱۹ نفر از افراد سالمند ساکن در سرای سالمندان شهر یاسوج و بیماران بستری در بیمارستان شهید جلیل نمونه‌گیری انجام گرفت. که از این میان ۱۳ کشت مثبت عوامل کاندیدا شناسایی گردید.

بر اساس رنگ تشکیل شده بر روی محیط کروم آگار کاندیدا در مجموع ۱۰ ایزوله با رنگ سبز (مشکوک به کاندیدا آلبیکنس) و ۳ ایزوله با رنگ بنفش (مشکوک به کاندیدا گلابراتا) شناسایی گردیدند.

نتایج حاصل از تست تشکیل لوله زایا نشان داد که تمامی ۱۰ مورد از ایزوله‌های مشکوک به گونه کاندیدا آلبیکنس قادر به تشکیل لوله زایا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۳ ساعت بوده‌اند.

تمامی ۱۰ ایزوله مشکوک به کاندیدا آلبیکنس به منظور افتراق از کاندیدا دابلینسیس بر روی محیط کشت سابوردکستروز آگار کشت شدند و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. تمامی ایزوله‌ها قادر به رشد در این دما بودند.

در این مطالعه میزان حساسیت ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس به تفکیک ترکیب مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شد. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، کمترین میزان دامنه MIC مربوط به داروی نیستاتین برابر با ۰/۱۲۵-۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بر این اساس تنها در یک ایزوله کاندیدا آلبیکنس میزان MIC برای داروی نیستاتین بالاتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره میوه درخت پسته کوهی نیز دارای فعالیت ضد کاندیدایی مطلوبی بوده است. به طوری که میزان MIC این ترکیب برابر با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

برای مقایسه میزان MIC بین گروه‌های مختلف ابتدا با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک نرمالیتی داده‌ها بررسی شد و با توجه به این که گروه داده‌ها نرمال نبودند ($p < 0.05$) جهت مقایسه گروه‌ها از آزمون‌های ناپارامتریک استفاده شد.

در ابتدا با استفاده از آزمون ناپارامتریک فریدمن هر دو گروه با هم مقایسه شدند که با توجه به مقدار سطح معنی‌داری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود داشت. در ادامه گروه‌ها با استفاده از آزمون ویلکاکسون مقایسه شدند که در جدول ۲ آمده است که اختلاف بین MIC نیستاتین با ترکیب مورد بررسی بر اساس p-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

بحث

دنچر استوماتیت به عنوان شایع‌ترین عفونت قارچی دهان در سالمندان، عمدتاً به وسیله کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌شود و درمان انتخابی آن یعنی نیستاتین، علی‌رغم اثربخشی بالا، با محدودیت‌هایی نظیر طعم نامطلوب، عوارض گوارشی و ظهور سویه‌های مقاوم همراه است (۹ و ۸، ۱). از سوی دیگر،

افزایش مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، ضرورت بررسی جایگزین‌های گیاهی بومی با خواص ضدقارچی را دوچندان ساخته است (۱۱ و ۱۰). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره هیدروالکلی میوه درخت بنه (*Pistacia atlantica*) در مقایسه با نیستاتین علیه ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به دنچر استوماتیت بود.

عدم رعایت بهداشت دهان و وجود پروتئ‌های دندان‌ی از عوامل کلیدی ابتلا به دنچر استوماتیت می‌باشد. رایت و همکاران ارتباط مستقیمی بین روش تمیز کردن پروتز و بروز کاندیدیازیس دهانی گزارش کردند (۲۴). در مطالعه حاضر نیز از ۱۹ بیمار مبتلا به دنچر استوماتیت، در ۱۰ مورد *Candida albicans* به عنوان پاتوژن اصلی جدا شد. این یافته با عوامل ساختاری (ساخت نامناسب دنچر)، بهداشت ضعیف و بیماری‌های سیستمیک نظیر دیابت و هپاتیت که سبب کاهش ایمنی و غالب شدن فلور طبیعی دهان می‌شوند، همخوانی داشت.

جدول ۱: نتایج حساسیت ضد قارچی ایزوله های کاندیدا آلبیکنس بروی عصاره و نیستاتین

کاندیدا آلبیکنس تعداد= ۱۰			عصاره میوه گیاه پسته کوهی (بنه) (میلی گرم بر میلی لیتر)			نیستاتین (میکروگرم بر میلی لیتر)		
Range	MIC _۰	MIC _۱	Range	MIC _۱	MIC _۰	Range	MIC _۱	MIC _۰
۱	۲	۲-۱	۰/۱۲۵	۲	۴<-۰/۱۲۵			

جدول ۲: مقایسه آماری نیستاتین با ترکیبات مورد بررسی در مطالعه

عصاره بنه - نیستاتین	
Z	a ۲/۹۱۳-
Asymp. Sig. (2-tailed)	۰/۰۰۴

a. Based on negative ranks.

در این مطالعه، MIC₅₀ عصاره هیدروالکلی میوه بنه ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نیستاتین ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، به این معنی که نیستاتین در شرایط آزمایشگاهی قوی‌تر از بنه می‌باشد. با این حال، بررسی‌های متعدد مقادیر MIC متفاوتی گزارش کرده‌اند از جمله مطالعه زارع بیدکی و همکاران (۲۵) که مقدار MIC برای عصاره آبی بنه را ۴۳/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، شیالی و همکاران، که (MIC) عصاره‌های میوه و برگ میوه بنه را بر روی تعدادی از گونه‌های کاندیدا و آسپرژیلوس به ترتیب در محدوده ۶/۲۵ تا ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۶/۲۵ تا ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در برابر گونه‌های مورد آزمایش برای قارچ کاندیدا و آسپرژیلوس گزارش کردند (۲۶). دالوند و همکاران MIC برای عصاره هیدروالکلی میوه بنه علیه گونه‌های کاندیدا و باکتری‌های بیماری‌زا را ۴۶-۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۷). MIC پایین‌تر در مطالعه حاضر احتمالاً ناشی از استخراج الکلی بهتر ترکیبات غیرقطبی (ترپن‌ها و فنولیک‌ها) است که در پژوهش سالاری و ملکلو بر روی عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی شش گونه جنس *Fessia* بر روی (۱۳) و آرجی و همکاران بر روی عصاره متانولی پوست و برگ گردو نیز تأیید شده است (۱۴).

گوئرا و همکاران در مرور جامع خود بر خانواده *Anacardiaceae* ترکیباتی مانند ترپنوئیدها، فنولیک‌ها و کینون‌ها را با MIC اغلب پایین‌تر از آزول‌ها علیه *C. albicans* معرفی و بر اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی اضافی آن تأکید

کردند. این نتایج با MIC₅₀ ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بنه در مطالعه ما همخوانی دارد و جایگاه *Pistacia atlantica* را به عنوان گونه بومی ایران در مدیریت عفونت‌های قارچی دهانی، به ویژه در شرایط مقاومت به آزول‌ها و پلی‌ان‌ها، تقویت می‌کند. مکانیسم‌های گزارش شده به وسیله این گروه (مهار بیوفیلم و القای آپوپتوز) نقش چندجانبه بنه را در دنچر استوماتیت توضیح می‌دهد (۲۸).

الیاسی قهفرخی و همکاران در سال α -pinene را با فراوانی ۶۴/۸ درصد به عنوان جزء غالب اسانس رزین بنه کرمانشاه گزارش و فعالیت ضد میکروبی رضایت‌بخش همراه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسط MIC₅₀ ۱۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأیید کردند (۲۹). این یافته‌ای که با کاربرد سنتی بنه در درمان عفونت‌ها و استرس اکسیداتیو ناشی از رشد بیش از حد قارچ در دنچر استوماتیت هم‌راستاست.

سبحانی و همکاران در غربالگری ۹۰ عصاره از ۳۰ گیاه ایرانی، *plumbagin* را با MIC برابر با ۲ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان قوی‌ترین نفثوکینون ضد *C. albicans* معرفی کردند (۱۵). وجود ترکیبات کینونی مشابه در گونه‌های *Pistacia*، مکانیسم احتمالی فعالیت ضدقارچی عصاره ما را تقویت می‌کند، هرچند غلظت بالاتر در عصاره خام نسبت به ترکیب خالص، لزوم فرمولاسیون مناسب را نشان می‌دهد.

با وجود نتایج امیدوارکننده، مطالعه حاضر محدودیت‌هایی از جمله حجم نمونه کم، عدم

فرمولاسیون موضعی (ژل یا دهان شویه) و نبود ارزیابی بالینی داشت. مرورهای سیستماتیک اخیر نیز نشان داده‌اند که با وجود پتانسیل بالای محصولات طبیعی در درمان دنچر استوماتیت، هنوز قطعیت شواهد بالینی پایین است و نیاز به کارآزمایی‌های بالینی استاندارد و تصادفی‌سازی شده به شدت احساس می‌شود (۳۰)، گوئرا و همکاران، دالوند و همکاران و الیاسی قهفرخی و همکاران نیز به طور مشترک بر لزوم نانوفرمولاسیون، آزمون‌های سینرژی با نیستاتین، مدل‌های بیوفیلیم و کارآزمایی‌های بالینی تأکید کردند (۲۹-۲۷). انجام این پژوهش‌ها برای قضاوت قطعی درباره ایمنی، تحمل‌پذیری و اثربخشی واقعی عصاره هیدروالکی میوه بنه در بیماران مبتلا به دنچر استوماتیت ضروری می‌باشد. در مطالعات آتی، فرمولاسیون‌های موضعی (ژل، دهان شویه) حاوی عصاره بنه تهیه و در کارآزمایی‌های بالینی تصادفی‌سازی شده ارزیابی شوند. همچنین بررسی اثر سینرژیستیک عصاره بنه با نیستاتین و فلوکونازول، ارزیابی اثر بر بیوفیلیم کاندیدا و انجام بررسی‌های سمیت سلولی برای تعیین ایمنی مصرف موضعی ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که ترکیب عصاره میوه درخت بنه، دارای اثر بازدارندگی قابل قبولی از رشد بر ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس بوده است،

لذا این امکان وجود دارد که این عصاره به صورت ترکیب با دیگر مواد بازدارنده جهت درمان دنچر استوماتیت مورد استفاده قرار گیرد از این رو انجام پژوهش‌های تکمیلی جهت بررسی بیشتر اثر توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی یاسوج به ویژه آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و همچنین مدیریت محترم سرای سالمندان یاسوج و پرسنل بیمارستان شهید جلیل یاسوج به‌خاطر فراهم کردن امکانات، تجهیزات و همکاری صمیمانه در انجام آزمایش‌ها و جمع‌آوری نمونه‌ها صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

در این پژوهش، هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

حمایت مالی

حمایت مالی از این پروژه به وسیله دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکتری دندانپزشکی با کد اخلاق IR.YUMS.BLC.1403.020 از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

رضا بازیار: انجام آزمایش‌ها و نگارش اولیه؛
فاطمه خواجه‌زاده: ایده‌پردازی، نظارت بر طرح، ویرایش
نهایی و نویسنده مسئول؛ مارال قرقانی: انجام آزمایشات
قارچ‌شناسی و آنالیز آماری و تفسیر داده‌ها؛ اسماعیل
پناهی کوخدان: همکاری در تهیه عصاره و انجام
آزمایشات؛ حسن بردانیا: همکاری در تهیه عصاره و اعمال
عصاره بروی پاتوژن.

REFERENCES

1. Khalilirad M, Haji MH, Lesan S. Evaluation of the relationship between nitric oxide and candida albicans-associated denture stomatitis: A cross-sectional study. *Caspian Journal of Dental Research* 2023; 12(2): 82-8.
2. Kappe R. Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. *Mycoses* 2000; 43(5-6): 159-63.
3. Behzadi RA, Salehi SM, Madani M. Comparison of the effects of rhus coriaria aqueous and alcoholic extracts on the growth of sensitive and resistant strains of *Candida albicans* to fluconazole, 2015.
4. Brincker H. Treatment of oral candidiasis in debilitated patients with miconazole—a new potent antifungal drug. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1976; 8(2): 117-20.
5. Kirkpatrick CH, Alling DV. Treatment of chronic oral candidiasis with clotrimazole troches: a controlled clinical trial. *New England Journal of Medicine* 1978; 299(22): 1201-3.
6. Langslet A, Langslet A, Olsen I, Lie SO, Løkken P. Chlorhexidine treatment of oral candidiasis in seriously diseased children. *Acta Pædiatrica* 1974; 63(6): 809-11.
7. Amaranayake LPK, Cheung L, Samaranayake YH. Treatment of refractory oral candidiasis with fluconazole: a case report. *Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology* 1991; 71(1): 42-4.
8. Samiei N, Olyaei E, Saberi S, Zolfaghari ME. Development of a gum base formulation for nystatin: a new drug delivery approach for treatment of oral candidiasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2018; 48: 59-65.
9. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Design Development and Therapy* 2016; 16: 1161-1171.
10. Ali R MR, Rabani Kh M, Rahmani MR, Zarkesh E SH. The effect of native Iranian medicinal plants on *Helicobacter pylori*: A review study. *Journal of Microbial Biology* 2019; 8(31): 1-18.
11. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Inhibitory effects of *Tamarix hispida* extracts on planktonic form and biofilm formation of six pathogenic bacteria. *Journal of Microbial Biology* 2015; 4(13): 43-56.
12. Bokaeian M, Farazmand R, Kyghobadi S, Saeidi S. Study of the antimicrobial activity of *Allium Sativum* extract on *Staphylococcus aureus* strains resistant to different antibiotics, 2015; 30-34.
13. Salari Z, Malekloo m. The study of antimicrobial effects of ethanolic, methanolic, and aqueous extracts of six species of *Fessia* (Asparagaceae) on some pathogenic bacteria and *Candida albicans*. *Nova Biologica Reperta* 2026; 6(2): 254-60.
14. Arji P, Naseri A, Rakhshandeh H, Najafzadeh MJ. Investigation of antifungal activity of methanol and aqueous extracts of walnut (*Juglans regia*) leaves and peel against *Candida* species. *Journal of Scientific Research in Medical Sciences* 2015; 22(2): 115-24.
15. Sobhani M, Abbas-Mohammadi M, Ebrahimi SN, Aliahmadi A Tracking leading anti-*Candida* compounds in plant samples; *Plumbago europaea*. *Iranian Journal of Microbiology*, 2018 10(3): 187.
16. Padulosi S, Hadj-Hassan a. Towards a comprehensive documentation of distribution and use of *Pistacia*: genetic diversity in central and West Asia, North Africa, and Mediterranean Europe. In Report of the IPGRI Workshop 1998; 4; 25-30.
17. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM, Eslami SH. Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastication. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; . 14(9): 765-9.
18. Sharifi MS, Hazell SL. Isolation, analysis and antimicrobial activity of the acidic fractions of mastic, kurdica, mutica and cabolica gums from genus *pistacia*. *Global Journal of Health Science* 2012; 4(1): 217.
19. Najafi MH, Farimani RH, Tavakoli J, Madayeni S. GC-MS analysis and antimicrobial activity of the essential oil of trunk exudates of *pistacia atlantica* var *mutica*. *Chemistry of Natural Compounds* 2014; 50(2): 376-8.
20. Minaiyan M, Karimi F, Ghannadi A. Anti-inflammatory effect of *Pistacia atlantica* subsp. *Kurdica* volatile oil and gum on acetic acid-induced acute colitis in rats. *Research Journal of Pharmacognosy* 2015; 2(2): 1-12.
21. Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. Composition of leaf, fruit, and gall essential oils of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. *Journal of Essential Oil Research* 2008; 20(3): 215-9.

- 22.Santos ER, Forno CF, Hernandez MG, Kubiça 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 São Paulo* 2014; 56(6): 477-82.
- 23.Jan A, Bashir G, Altaf I, Fomda BA, Hamid S, Jan K. Evaluation of various phenotypic methods for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Microbiological Methods* 2022; 193: 106400.
- 24.Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Molecular Oral Microbiology* 2013; 28(2): 83-101.
- 25.Zare-Bidaki M, Ghasemi F, Allahyari E, Ashrafipour M, Mohammadparast Tabas P, Nikoomanesh F. Investigated inhibitory effect of aqueous extract of pistachio leaf (*Pistacia atlantica*) on the isolates of pathogenic *Escherichia coli* and *Candida albicans* from urinary and vaginal samples. *Journal of Translational Medical Research* 2022; 29(3): 275-84.
- 26.Shialy Z, Zarrin M, Nejad BS, Naanaie SY. In vitro antifungal properties of *Pistacia atlantica* and olive extracts on different fungal species. *Current Medical Mycology* 2015; 1(4): 40.
- 27.Dalvand H, Hamdi SM, Kotanaee FN, Ahmadvand H. Evaluation of antibacterial and antifungal activities of *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk*.
- 28.Guerra RN, Oliveira AS, Farias JR, Franco DC, Santos PG, Barbosa NT, Muniz SB, Abreu AG, Nascimento FR. *Anacardiaceae* family: effect of isolated compounds and other identified phytochemicals against clinically relevant *Candida* species—a short review. *Antibiotics* 2025; 14(3): 308.
- 29.Elyasi Ghahfarrokhi A, Saeedi M, Mojtabavi S, Kobarfard F, Faramarzi MA. Chemical composition and biological effects of *Pistacia atlantica* Desf. oleoresin essential oil. *Research Journal of Pharmacognosy* 2022; 9(3): 25-33.
- 30.Silveira DQ, Lia EN, Massignan C, Stefani CM. Natural products for the treatment of denture stomatitis: A systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2023; 129(3): 413-24.

The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Pistacia atlantica* Fruit (Bene) on Clinical Isolates of *Candida albicans* from Patients with Denture Stomatitis Compared to Nystatin

Baziar R¹, Khajehzadeh F^{2*}, Ghorghani M³, Panahi Kokhdan E³, Bardania H⁴

¹Department of Dentistry, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ²Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ⁴Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received Date: 20 Dec 2024 Accepted Date: 21 Dec 2025

Abstract

Background & aim: Denture stomatitis is the most common oral fungal infection in the elderly, primarily caused by *Candida albicans*. The present study aimed to investigate the antifungal activity of the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* fruit (bene) compared to nystatin against clinical isolates of *Candida albicans* obtained from patients with denture stomatitis.

Methods: The present in vitro descriptive-analytical study was conducted in 2023. Samples were collected from 19 elderly patients with denture stomatitis. *Candida* isolates were identified and confirmed by culture on Sabouraud dextrose agar, CHROMagar *Candida*, germ tube test, and growth at 42°C. Ultimately, 10 isolates of *Candida albicans* were obtained. The hydroalcoholic extract of bene fruit was prepared using the maceration method, and susceptibility testing was performed by the broth microdilution method (CLSI M27-S4) in RPMI 1640 medium in triplicate. Data were analyzed using Shapiro-Wilk, Friedman, and Wilcoxon tests via SPSS software version 20.

Results: The MIC range for the bene extract was 1–2 mg/mL, with MIC₅₀ of 1 mg/mL and MIC₉₀ of 2 mg/mL. The MIC range for nystatin was 0.125 to more than 4 µg/mL, with MIC₅₀ of 0.125 µg/mL and MIC₉₀ of 2 µg/mL. The difference in MIC between the two compounds was statistically significant (Wilcoxon test, p=0.004).

Conclusion: The hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* fruit exhibits notable antifungal activity against clinical isolates of *Candida albicans*, although it is significantly less potent than nystatin. This extract could be considered as a supplement or a basis for further investigation in the development of topical herbal antifungal products.

Keywords: Stomatitis, Denture, *Candida albicans*, Plant extracts, Nystatin

***Corresponding author:** Khajehzadeh F, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: fatemeh.khajehzadeh@yums.ac.ir

Please cite this article as follows: Baziar R, Khajehzadeh F, Ghorghani M, Panahi Kokhdan E, Bardania H. The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Pistacia atlantica* Fruit (Bene) on Clinical Isolates of *Candida albicans* from Patients with Denture Stomatitis Compared to Nystatin. Armaghane-danesh 2026; 31(2): 212-224.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal