View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Repository of Research and Investigative Information

مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل

دوره بیستم، شمارهٔ ۱۰، مهر ۱۳۹۷، صفحه ۷۱-۶۳

اثر مهارکنندگی کارواکرول بر بیان ژن اختصاصی ریسه (*HWP1*) *کاندیدا آلبیکانس*

علیرضا خداوندی (PhD)[۱]، فهیمه علیزاده (PhD)[۲*]، شهره زابلی زاده (MSc)[۲]

۱-گروه زیست شناسی، واحد گچساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گچساران، ایران

۲-گروه میکروبیولوژی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران

دریافت: ۹۷/۱/۱۵، اصلاح: ۹۷/۶/۱۴، پذیرش: ۹۷/۶/۱۷

خلاصه

سابقه و هدف: عفونت ناشی از *کاندیدا آلبیکانس* مشکل عدیده و رو به افزایش در بالین و به ویژه در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر مهاری کارواکرول بر تشکیل ریسه و بیان ژن *HWP1* *کاندیدا آلبیکانس* انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی بر روی نمونه های سواب واژن، دهان و سطوح پوست از بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی انجام گردید. جدایه های کلونیزه *کاندیدا آلبیکانس* حساس به دارو با استفاده از نرم افزار WHONET شناسایی شدند. آزمون حساسیت سنجی برای کارواکرول (محدوده رقت ۶/۲۵ -۳۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) با استفاده از روش میکرودایلوشن براث (CLSI) علیه جدایه های حساس *کاندیدا آلبیکانس* تعیین شد. سنجش زمان مرگ سلولی کارواکرول (محدوده رقت دو برابر MIC تا یک چهارم MIC) انجام گردید. ممانعت از تشکیل ریسه با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از RT-PCR کمی میزان بیان ژن *HWP1* در *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 تعیین گردید.

یافته ها: ده جدایه بالینی کلونیزه *کاندیدا آلبیکانس* حساس به دارو شناسایی گردید. کارواکرول با محدوده MIC ۲۵-۲۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر موجب مهار رشد جدایه های حساس به دارو *کاندیدا آلبیکانس* شد. نتایج سنجش زمان مرگ سلولی تاثیر مهاری معنی دار کارواکرول را در رشد *کاندیدا آلبیکانس* نشان داد ($p\leq0.05$) . کاهش معنی دار تبدیل سلول های مخمری به ریسه وجود داشت. در جدایه های حساس به دارو *کاندیدا آلبیکانس*، کارواکرول ممانعت از تشکیل ریسه نمود. بیان ژن *HWP1* در رقت های معادل دو برابر MIC و برابر MIC کارواکرول به ترتیب۰/۲۰±۱/۸۲ و۰/۰۷±۱/۶۲ برابر کاهش پیدا کرد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه اثباتی برای رویکرد بالینی ایمن و بهبود یافته‌ای از کارواکرول در درمان عفونت های ناشی از *کاندیدا* و مهار تشکیل ریسه توسط آن ارائه می دهد.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکانس، بیان ژن، ریسه.

مقدمه

تبدیل فرم مخمری به ریسه ای نه تنها با سایر فاکتورهای بیماریزایی مانند ترشح هیدرولازها تقویت می‌شود، بلکه برای انتشار قارچ در بخش‌های مختلف بدن میزبان نیز ضروری است. *کاندیدا آلبیکانس* یک عامل بیماری‌زای چند شکلی با توانایی تبدیل فرم مخمری به ریسه ای است. سلول‌های رشته‌ای ریسه مقاومت به فاگوسیتوز را با واسطه سلول‌های میزبان افزایش داده و سبب بهبود اتصال به سطوح سلول میزبان با توانایی حمله به سلول‌های اپی‌تلیال می‌شوند. اتصال منجر به کلونیزاسیون، تولید لوله زایا، طویل شدن رشته‌ها و مشارکت در انتشار درون بافت‌ها شده و سبب آسیب‌های بافتی می گردد (۴-۱). تهاجم به بافت میزبان از طریق بیان مولکول اتصال به سطح سلول صورت می‌گیرد. واکنش‌های اختصاصی و غیراختصاصی امکان اتصال *کاندیدا آلبیکانس* به طیف وسیعی از بافت‌ها را از طریق پروتئین اختصاصی اتصالی فراهم می‌کنند. مولکول‌های مهم اتصالی عبارتند از پروتئین‌های توالی مشابه اگلوتینین (ALS) و پروتئین دیواره سلولی ریسه (Hwp1). توالی N-ترمینال Hwp1 سوبسترایی برای آنزیم‌های ترانس گلوتامیناز پستانداران است و سبب القای تشکیل یک پیوند میان ریسه *کاندیدا آلبیکانس* و سلول‌های میزبان می شود. هرچند گونه‌های *کاندیدا* اعضای همزیست میکروبیوتای طبیعی انسان هستند، اما اختلالات موضعی و متناوب در محل های مخاطی می‌تواند به عفونت‌های ناشی از رشد بیش از حد *کاندیدا* کمک کند (۵و۳و۲). شواهد نشان می دهد که الگوی بیان ژن *HWP1* در بیماریزایی *کاندیدا آلبیکانس* با سایر عوامل بیماریزایی مخمر و تعدادی از عوامل خطر میزبان مرتبط است (۷و۶). داروهای ضدقارچی مهم بالینی شامل پلی ان ها، آزول‌ها، اکینوکاندین‌ها، ۵-

---

▣ این مقاله حاصل پایان نامه شهره زابلی زاده دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر فهیمه علیزاده

آدرس: یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۷۴-۳۳۳۱۳۹۳۰

E-mail: mnalizadeh@yahoo.com

فلوروسیتوزین و میازین‌ها هستند که سنتز غشاء سلولی، دیواره سلولی، پروتئین و DNA را مهار یا مختل می نمایند (۱۱-۸).

غربالگری محصولات طبیعی ابزار قدرتمندی برای شناسایی مکانیسم ضدقارچی محصولات طبیعی است که می‌تواند برای درمان‌ها عفونت‌ها مورد استفاده قرار گیرند. در طول سال‌های اخیر، مطالعات نشان داده‌اند که کارواکرول می‌تواند با هدف قرار دادن و اتصال به ارگوسترول غشایی قارچ به عنوان یک عامل مخرب غشاء عمل نماید (۱۰و۱۱). علاوه بر این، کارواکرول فعالیت ضدقارچی علیه *کاندیدا آلبیکانس* نشان می‌دهد(۱۷-۹). Dalleou و همکارانش تاثیر ضدقارچی کارواکرول را بر سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلم‌های *کاندیدا آلبیکانس* نشان دادند(۱۸).

کاندیدا آلبیکانس بعنوان عامل اصلی بیماری انسانی ظهور کرده و سبب بروز عفونت های سطحی تا کاندیدیازیس تهاجمی عمیق، مخصوصا در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی می‌گردد(۲۰و۱۹). هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدقارچی کارواکرول علیه *کاندیدا آلبیکانس* حساس به دارو می‌باشد. بویژه، تاثیر مهاری کارواکرول با استفاده از سنجش زمان مرگ سلول، تشکیل ریسه و پروفایل بیان ژن *کاندیدا آلبیکانس* می‌باشد.

مواد و روش ها

میکروارگانیسم‌ها، ترکیبات و محیط کشت‌ها: مطالعه مقطعی در یک بازه زمانی ۶ ماهه، نمونه های سواب واژن، دهان و سطوح پوست ۶۰ بیمار مبتلا به ضعف سیستم ایمنی (بیماران دیابتی، سرطانی و تحت همودیالیز) مراجعه کننده به بیمارستان شهید بهشتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ایران جمع آوری گردید. بیماران مبتلا به عفونت کاندیدیازیس از مطالعه خارج شدند. نمونه‌های بالینی با رضایت بیماران جمع‌آوری شده و سریع به آزمایشگاه میکروبشناسی دانشگاه آزاد اسلامی یاسوج، ایران، انتقال یافتند. مطالعه حاضر در کمیته اخلاق پژوهشی با کد IR.IAU.YASOOJ.REC.1395.21 به تصویب رسید. (پروتکل مطالعه به تایید دستورالعمل‌های اخلاقی هلینسکی در سال ۲۰۰۸ رسید).

نمونه‌های بالینی بر روی سابورو دکستروز آگار (SDA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) کشت داده و در ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. جدایه های کلونیزه *کاندیدا آلبیکانس* با روش‌های مرفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی، تشکیل لوله زایا، کشت بر روی محیط کشت کروم آگار *کاندیدا* (CHROMagar Company, France)، تخمیر و جذب کربوهیدرات ها، هیدرولیز اوره و روش های جداسازی بر پایه PCR با استفاده از پرایمرهای قارچی عمومی (ITS1 و ITS4) شناسایی شدند.

سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. برای تعیین حساسیت *کاندیدا آلبیکانس* به آمفوتریسین بی، فلوکونازول، کتوکونازول و میکونازول، نتایج حاصل از آزمون‌های سنجش حساسیت موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CSLI) انتشار دیسک (M44-A2) و میکرودایلوشن براث (M-27-A3 و M27-S4) با استفاده از نرم‌افزار WHONET آنالیز شدند (۲۲و۲۱). به منظور آماده‌سازی سوسپانسیون‌های *کاندیدا آلبیکانس*، همه جدایه های کلونیزه *کاندیدا آلبیکانس* در SDA کشت داده شدند. محلول‌های استوک کارواکرول، آمفوتریسین بی، فلوکونازول، کتوکونازول و میکونازول (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) در حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه شدند.

سنجش‌های حساسیت: صد میکرولیتر از سوسپانسیون‌های *کاندیدا آلبیکانس* (10^6 × ۵-۱ CFU/ml) بر روی SDA پخش شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک های آمفوتریسین بی (۱۰ میکروگرم)، فلوکونازول (۱۵ میکروگرم)، کتوکونازول (۱۵ میکروگرم) و میکونازول (۱۰ میکروگرم) (Rosco, Denmark) بر روی سطح آگار قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۵ درجه سلیسیوس، قطر هاله ممانعت از رشد مشاهده شده در اطراف دیسک بر اساس میلی‌متر گزارش شد. کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) برای سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از آزمون سنجش حساسیت ضدقارچی میکرودایلوشن براث مطابق با دستورالعمل‌های CSLI M27-A3 و M27-S4 تعیین شد. رقت های متوالی دو برابر از هر عوامل ضدقارچی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ال-گلوتامین (Sigma-Aldrich) که توسط مورفولینو پروپان سولفونیک اسید (MOPS) ۰/۱۶۵ مولار با اسیدیته ۷ تنظیم شده، تهیه گردید و به میکروپلیت های ۹۶ چاهکی (Moheb Qazvin, Iran) اضافه شد.

سوسپانسیون جدایه‌های بالینی *کاندیدا آلبیکانس* مورد بررسی با تراکم سلولی 10^3×۰/۵-۲/۵ CFU/ml در محیط کشت RPMI-1640 تهیه شد و به چاهک های مورد بررسی حاوی عوامل ضدقارچی اضافه گردید. کنترل های بدون دارو و بدون مخمر به ترتیب به عنوان کنترل های رشد و استریل تهیه گردید. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد و توسط الیزا ریدر Stat Fax 303 (Awareness Technology, Inc., USA) در طول موج ۵۳۰ نانومتر میزان جذب نوری چاهک ها اندازه گیری شد. کمترین غلظت هر ترکیب ضدقارچی که از ۵۰ و ۹۰ درصد رشد در مقایسه با کنترل ممانعت نماید، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۲۲).

سنجش زمان مرگ سلولی: سنجش زمان مرگ سلولی مطابق روش ذکر شده در مطالعات دیگر انجام گرفت (۲۳). سوسپانسیون‌های سلولی *کاندیدا آلبیکانس*، 10^6×۵-۱ سلول/ میلی لیتر در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید و غلظت های مختلف کارواکرول (دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC) به آن اضافه شد. لوله ها در دمای ۳۵ درجه سیلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد و در فواصل زمانی متوالی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، کلنی های حاصل از رقت های متوالی ۱۰ تایی بر روی محیط کشت SDA شمارش شد.

تشکیل ریسه و تیمار: تشکیل ریسه *کاندیدا آلبیکانس* بر روی سطح کاور اسلیپ‌های پلاستیکی در پلیت های ۶ چاهکی کشت سلولی انجام شد (۲۴). سوسپانسیون‌های سلولی *کاندیدا آلبیکانس*، 10^6×۵-۱ سلول/ میلی لیتر در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید و ۴ میلی لیتر به چاهک های حاولی ۴ میلی لیتر غلظت های مختلف کارواکرول (دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC) اضافه شد و در دمای ۳۵ درجه سیلسیوس به مدت ۹۰ دقیقه گرمخانه گذاری گردید. سپس تشکیل ریسه با گرمخانه گذاری همراه با تکان دادن در ۲۰۰ rpm در دمای ۳۵ درجه سیلسیوس به مدت ۱۶ ساعت القا گردید. در نهایت، کاور اسلیپ ها را با سرم فیزیولوژی شستشو داده شده و از میکروسکوپ نوری (Nikon, Japan) مشاهده شدند.

سنجش کمی نسبی بیان ژن: ریسه های *کاندیدا آلبیکانس* (ATCC 14053) در فقدان یا حضور غلظت‌های مختلف کارواکرول (دو برابر MIC و برابر MIC) در پلیت های ۶ چاهکی کشت سلولی همانند روش ذکر شده در بخش قبلی تشکیل گردید.

سلول‌های ریسه از پلیت‌ها جمع آوری شده و RNA کل آنها با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق دستورالعمل سازنده استخراج شد. ۰/۵ میکروگرم از نمونه RNA با آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Fermentas, USA) نسخه‌برداری معکوس شد. پرایمرها برای بیان ژن اختصاصی ریسه (*HWP1*) گرفته شد (جدول ۱). فرآیند PCR از مراحل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۲۶ چرخه تکثیر (۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۶ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه) و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در یک ترموسایکلر Tpersonal (Biometra- Germany) صورت گرفت. از ژن *بتا-اکتین* برای نرمال کردن و آنالیز تغییرات نسبی در بیان ژن هدف استفاده شد. میزان بیان ژن از مقادیر نسبی بدست آمده از نرم افزار Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad, USA, version 4.6) بر اساس میزان تغییر در بیان ژن هدف=میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه های مورد بررسی/میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه کنترل بدون تیمار، به دست آمده است. محصولات PCR با استفاده از کیت استخراج QIAquick Gel (Qiagen, USA) تخلیص شده و با تعیین توالی DNA (First BASE Laboratories Sdn. Bhd., Malaysia) تایید شدند (۲۴و۲۲).

آنالیزهای آماری: نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار سه تکرار ارائه شده است. آنالیز آماری با استفاده از آزمون یک طرفه ANOVA انجام شد. مقایسه دو میانگین با آزمون تعقیبی توکی محاسبه گردید و $p \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

پرایمر	سکونس	منبع
HWP1-F	F: 5´ GGTAGACGGTCAAGGTGAAACA 3´	(۲۴)
HWP1-R	R: 5´ AGGTGGATTGTCGCAAGGTT 3´	
ACT -F	F: 5´ ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC 3´	(۲۴)
ACT -R	R: 5´ GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA 3´	

یافته ها

از ۶۰ نمونه بالینی جمع آوری شده ۲۰ *کاندیدا آلبیکانس* شناسایی شد. صحت جدایه های *کاندیدا آلبیکانس* فنوتیپی و با استفاده از توالی DNA تایید شد. با استفاده از نرم افزار WHONET، از ۲۰ جدایه *کاندیدا آلبیکانس*، ۱۰ جدایه حساس به دارو شناسایی گردید. جدول های ۲ و ۳ خلاصه نتایج سنجش حساسیت آزمایشگاهی داروهای ضدقارچی علیه *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از آزمون های استاندارد CLSI دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث نشان داده شده است. ضریب کاپا نشان داد که نتایج آزمون های سنجش حساسیت ضدقارچی دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث داروهای آمفوتریسین بی، فلوکونازول، کتوکونازول و میکونازول توافق زیادی وجود دارد.

جدول ۲. نتایج سنجش حساسیت ضدقارچی جدایه های بالینی *کاندیدا آلبیکانس*

نام آنتی بیوتیک	کد	گروه آنتی بیوتیک	درصد مقومت	درصد حدواسط	درصد حساسیت
آمفوتریسین بی	AMB	ضدقارچی	۴۵	–	۵۵
فلوکونازول	FLU	ضدقارچی	۵۰	–	۵۰
کتوکونازول	KET	ضدقارچی	۵۰	–	۵۰
میکونازول	MIC	ضدقارچی	۵۰	–	۵۰

کارواکرول فعالیت ضدقارچی معنی‌داری علیه *کاندیدا آلبیکانس* حساس به دارو نشان داد و MIC آنها با MIC بدست آمده از فلوکونازول قابل مقایسه بود. عامل ضدقارچ فلوکونازول به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (جدول ۴).

MIC کارواکرول در محدوده ۲۰۰–۲۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر بود؛ رشد جدایه های حساس به داروی *کاندیدا آلبیکانس* مهار شده بود. $\log_{10}$ CFU پس از گذشت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت از گرمخانه گذاری در مقایسه با کنترل تیمار نشده کاهش یافته بود ($p \leq ۰/۰۵$). پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، مقدار $\log_{10}$ CFU در *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 144053 تیمار شده با غلظت های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC از کارواکرول به ترتیب ۸/۶۳، ۶/۴۸، ۵/۸۲ و ۶/۴۸ برابر کاهش یافته بود. علاوه براین، در جدایه های حساس به دارو تیمار شده با غلظت‌های دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC کارواکرول، جمعیت قارچی به ترتیب ۷/۱۳، ۶/۰۸، ۴/۹۲ و ۴/۵۴ برابر کشته شدند (شکل ۱).

تاثیر کارواکرول بر ریسه *کاندیدا آلبیکانس* با مشاهدات میکروسکوپ نوری تایید شد. برای نمونه‌های کنترل تیمار نشده، ریسه های *کاندیدا آلبیکانس* تشکیل شده بر روی کاور اسلیپ شامل سلول‌های رشته‌ای و کلنی‌های پراکنده بودند. ریسه‌های تیمار شده با کارواکرول از نظر تعداد و تراکم سلول‌های رشته‌ای و کلنی‌های پراکنده بسته به غلظت کارواکرول کاهش یافته بودند. در مقایسه با نمونه‌های کنترل تیمار نشده، هیچ سلول رشته‌ای در کشت *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با غلظت دو برابر MIC کارواکرول مشاهده نشد و کلنی‌های پراکنده‌ای که اکثرا از سلول‌های مخمری تشکیل شدند، با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند (شکل ۲). میزان بیان ژن اختصاصی ریسه، *HWP1* در تیمار با کارواکرول ضمن تشکیل ریسه مهار شد ($p \leq ۰/۰۰۱$) (شکل ۳). در سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با کارواکرول، میزان بیان ژن *HWP1* در غلظت های معادل دو برابر MIC و برابر MIC به ترتیب ۰/۲۰±۱/۸۲ و ۰/۰۷±۱/۶۲ برابر کاهش پیدا کرد.

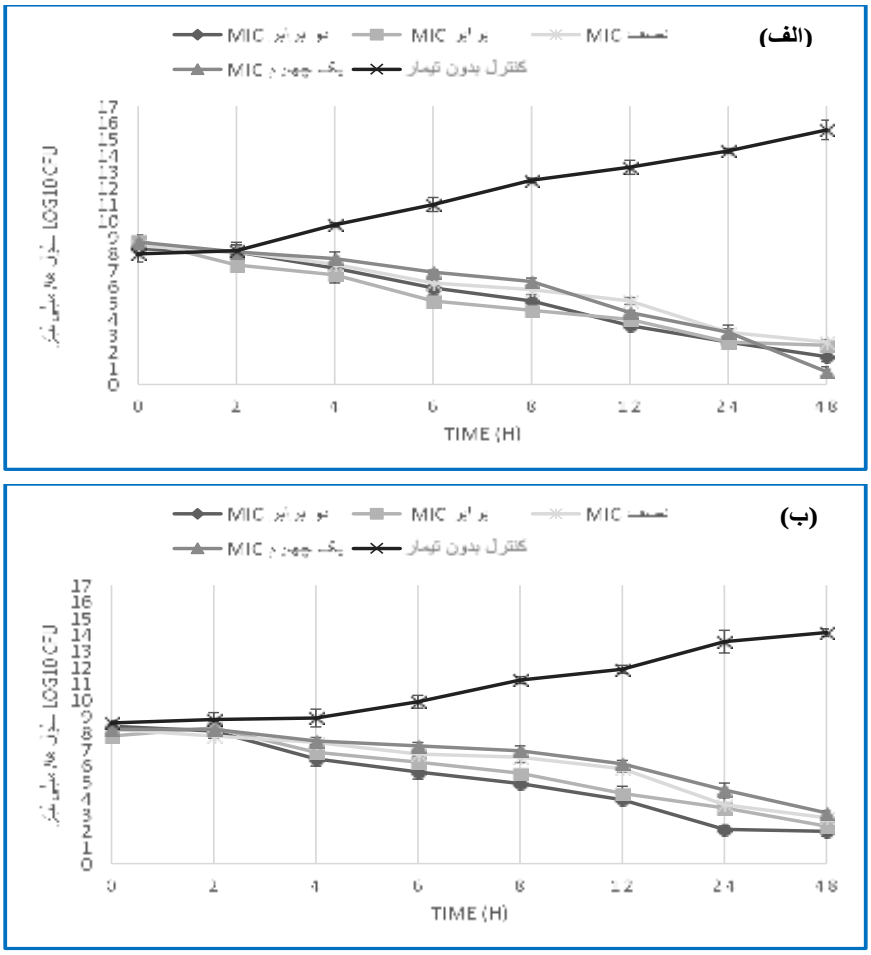
جدول ۳. نتایج سنجش حساسیت ضدقارچی علیه جدایه های بالینی *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث

جدایه ها/ ضدقارچ ها	آمفوتریسین بی		فلوکونازول		کتوکونازول		میکونازول	
	قطر دیسک*	MIC90**	قطر دیسک*	MIC90**	قطر دیسک*	MIC90**	قطر دیسک*	MIC90**
کاندیدا آلبیکانس ATCC 14053	۱۹/۰۰±۰/۰۴	۰/۰۳	۲۲/۰۰±۰/۱۰	۰/۱۲۵	۳۰/۰۰±۰/۰۴	۰/۰۶	۲۲/۰۰±۰/۰۸	۲
جدایه ۱	۹/۵۰±۰/۲۰	۱	۱۲/۰۰±۰/۱۰	۱۶	۱۹/۵۰±۰/۲۰	۱	۸/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۲	۱۴/۷۰±۰/۰۶	۰/۵	۱۸/۷۰±۰/۱۰	۴	۲۴/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۱/۷۰±۰/۰۶	۲
جدایه ۳	۱۶/۰۰±۰/۱۰	۰/۵	۲۱/۰۰±۰/۰۱	۴	۲۵/۷۰±۰/۰۶	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۴	۱۲/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۱۸/۰۰±۰/۰۳	۲	۲۵/۷۰±۰/۱۰	۰/۰۳	۱۸/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۵	۱۷/۰۰±۰/۱۰	۰/۵	۱۵/۷۰±۰/۰۲	۴	۲۴/۰۰±۰/۱۰	۰/۱۲۵	۲۰/۳۰±۰/۰۶	۱
جدایه ۶	۱۵/۱۰±۰/۱۰	۱	۱۱/۰۰±۰/۰۳	۱۶	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۱۰/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۷	۱۵/۷۰±۰/۰۶	۱	۱۶/۰۰±۰/۱۰	۴	۲۸/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۸	۱۴/۳۰±۰/۰۶	۱	۱۸/۰۰±۰/۰۲	۴	۳۱/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۱
جدایه ۹	۸/۱۰±۰/۰۱	۴	۱۱/۰۰±۰/۰۵	۳۲	۱۷/۵۰±۰/۲۰	۰/۵	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۱۰	۱۱/۷۰±۰/۰۶	۰/۵	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۴	۳۰/۳۰±۰/۰۶	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۱
جدایه ۱۱	۱۴/۳۰±۰/۰۶	۱	۱۹/۷۰±۰/۱۰	۲	۲۵/۵۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۱۲	۱۲/۰۰±۰/۱۰	۱	۲۱/۷۰±۰/۰۳	۲	۲۵/۵۰±۰/۱۰	۰/۱۲۵	۱۷/۰۰±۰/۰۶	۲
جدایه ۱۳	۱۶/۰۰±۰/۱۰	۱	۱۶/۸۰±۰/۰۴	۱	۲۶/۶۰±۰/۱۰	۰/۰۳	۱۹/۷۰±۰/۰۶	۲
جدایه ۱۴	۸/۶۰±۰/۰۱	۴	۹/۰۰±۰/۰۳	۱۶	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۹/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۱۵	۹/۵۰±۰/۰۵	۴	۱۰/۰۰±۰/۰۷	۱۶	۱۹/۵۰±۰/۲۰	۱	۱۱/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۱۶	۸/۵۰±۰/۰۱	۴	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۱۶	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۱۰/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۱۷	۸/۰۰±۰/۰۱	۸	۱۱/۰۰±۰/۰۵	۳۲	۱۷/۵۰±۰/۲۰	۰/۵	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۱۸	۸/۵۰±۰/۰۱	۸	۹/۰۰±۰/۰۴	۱۶	۱۹/۵۰±۰/۰۴	۱	۹/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۱۹	۸/۵۰±۰/۰۱	۴	۱۰/۰۰±۰/۰۳	۱۶	۱۷/۵۰±۰/۲۰	۱	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۲۰	۹/۰۰±۰/۰۲	۴	۹/۰۰±۰/۱۰	۶۴	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۱۰/۰۰±۰/۰۸	۸

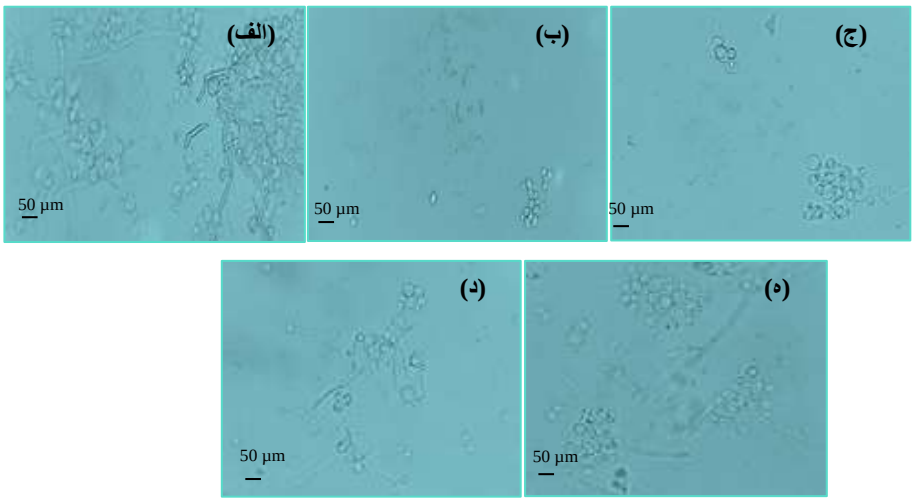
*(میلی متر)، **(میکروگرم/ میلی لیتر)

جدول ۴. میزان MIC (میکروگرم/ میلی لیتر) کارواکرول علیه جدایه های بالینی حساس به داروی *کاندیدا آلبیکانس*

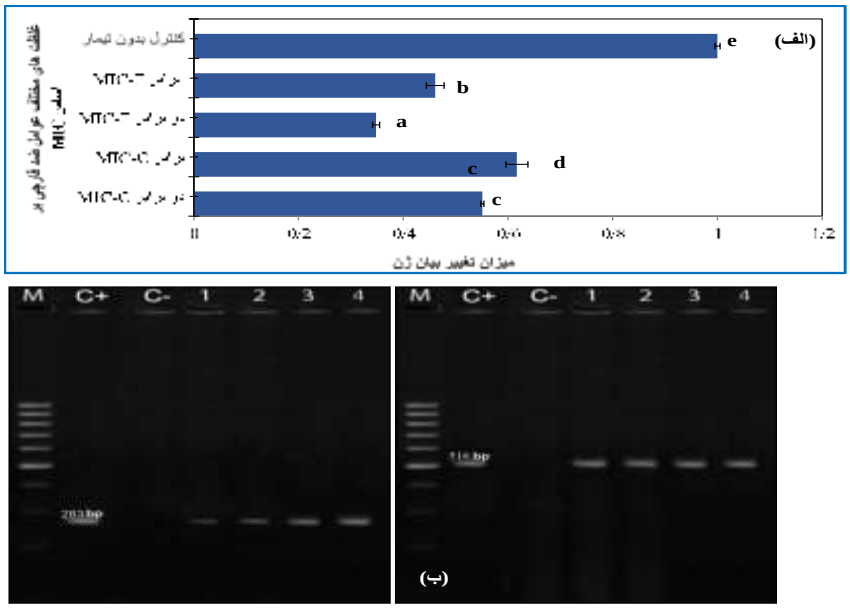
جدایه ها/ ضدقارچ ها	کارواکرول		فلوکونازول	
	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50
کاندیدا آلبیکانس ATCC 14053	۲۵	۱۲/۵	۰/۱۲۵	۰/۰۳
جدایه ۲	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۳	۲۵	۱۲/۵	۴	۲
جدایه ۴	۲۰۰	۱۰۰	۲	۱
جدایه ۵	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۷	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۸	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۱۰	۵۰	۲۵	۴	۲
جدایه ۱۱	۱۰۰	۵۰	۲	۱
جدایه ۱۲	۱۰۰	۵۰	۲	۱
جدایه ۱۳	۵۰	۲۵	۱	۰/۵



شکل ۱. تاثیرکارواکرول در غلظت های محدوده دو برابر MIC تا یک چهارم MIC بر منحنی زمان مرگ سلول. الف) *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 و ب) جدایه حساس به داروی *کاندیدا آلبیکانس*. داده ها میانگین ± انحراف معیار سه اندازه گیری است



شکل ۲. نمونه تصاویر میکروسکوپ نوری نشان دهنده تشکیل ریسه توسط *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 تیمار شده با غلظت های مختلف کارواکرول بعد از ۱۶ ساعت گرمخانه گذاری است. الف: کنترل بدون تیمار، مرفولوژی شامل سلول های رشته ای و مخمری است. ب: تیمار شده با دو برابرMIC از کارواکرول، سلول های رشته ای کاملا از بین رفته اند. ج: تیمار شده با غلظت برابرMIC کارواکرول، اختلال در تشکیل ریسه ایجاد شده، اکثرا سلول های مخمری مشاهده شد. د: تیمار شده با غلظت نصف MIC کارواکرول، کاهش سلول های رشته ای و مخمری مشاهده گردید. ه: تیمار شده با غلظت یک چهارم MIC کارواکرول، تعداد بسیار کمتر سلول های رشته ای و مخمری مشاهده شد. بزرگنمایی بزرگنمایی X ۴۰، Bar = 50 µm



شکل ۳. آنالیز کمی RT-PCR ژن اختصاصی ریسه (*HWP1*) *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 در حضور یا عدم حضور کارواکرول (C) و فلوکونازول (F) در غلظت های دو برابر MIC برابر MIC، داده ها میانگین ± انحراف معیار سه اندازه گیری است. میانگین با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در $p\leq 0/05$ است. ب و ج به ترتیب بیان ژن *HWP1* و بتا اکتین در *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 تیمار شده با غلظت های مختلف کارواکرول با استفاده از RT-PCR کمی هست. M : مارکر DNA، $HWP1:C^{+}$ و یا اکتین بدون کارواکرول (کنترل بدون تیمار)، C^{-}: کنترل منفی PCR، ۱: تیمار شده با غلظت دو برابرMIC فلوکونازول، ۲: تیمار شده با غلظت برابرMIC فلوکونازول، ۳: تیمار شده با غلظت دو برابرMIC کارواکرول، ۴: تیمار شده با غلظت برابرMIC کارواکرول

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه کارواکرول سبب مهار کارآمد تولید ریسه‌های *کاندیدا آلبیکانس* شده است. مطالعات، تاثیرات کارواکرول علیه سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلم‌های *کاندیدا آلبیکانس* را نشان داده‌اند (۲۵و۱۸). فعالیت ضدقارچی کارواکرول را می‌توان به تنش Ca^{2+} و مهار مسیر TOR (هدف راپامایسین) نسبت داد. یافته‌های مطالعه حاضر با سنجش زمان مرگ و تشکیل ریسه سلول‌های تیمار شده با کارواکرول تایید شدند که یک کاهش معنی‌دار در تعداد سلول‌ها نشان دادند. این کاهش سلول‌های رشته‌ای و مخمری به احتمال زیاد بدلیل نفوذ کارواکرول به سلول‌ها و کاهش تعداد سلول‌ها با تاثیر مهاری تبدیل فرم مخمری به ریسه است. کارواکرول می تواند با فعالسازی مسیرهای پیام رسانی اختصاصی، یکپارچگی غشاء را مختل، مسیرهای سنتز ارگوسترول را مسدود و در نتیجه سبب آسیب به سیستم‌های آنزیمی سلولی مانند سیستم‌های مرتبط با تولید انرژی و سنتز ترکیبات ساختاری شود (۲۸-۱۲). علاوه بر این، نتایج فوق با تغییرات میزان بیان ژن ریسه سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده را با کارواکرول پشتیبانی شد. میزان بیان ژن اختصاصی *HWP1* به عنوان شاخصی از تشکیل ریسه در سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* با روش RT-PCR تعیین شد. نتایج حاضر با سایر تحقیقات انجام شده که تغییر میزان بیان ژن *HWP1* در ریسه *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با عوامل ضدقارچی بررسی کرده اند، نیز تایید گردید (۳۰و۲۹و۲۴و۳). در مطالعه حاضر نشان داده شد که کارواکرول مانع از تشکیل ریسه در *کاندیدا آلبیکانس* حساس به دارو می گردد. علاوه بر این، کارواکرول کاهش سلول‌های رشته‌ای و مخمری و تاثیر مهاری بر بیان ژن *HWP1* را نشان داد. این نتایج نشان دادند که کارواکرول می‌تواند یک رویکرد بالینی امن و پیشرفته را در درمان عفونت‌های *کاندیدا* ارائه دهد. ازآنجاکه عفونت‌های حاصل از *کاندیدا آلبیکانس* مقاوم به دارو مشکلات سلامتی جدی هستند، تحقیقات آینده می‌توانند به بررسی تاثیر کارواکرول علیه عفونت‌های مقاوم به درمان های رایج بپردازند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی یاسوج جهت حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می گردد.

Inhibitory Effect of Carvacrol on the Expression of Candida albicans Hyphae-Specific Gene *(HWP1)*

A. Khodavandi (PhD)[1], F. Alizadeh (PhD)[2*], S. Zaboli zadeh (MSc)[2]

1. Department of Biology, Gachsaran Branch, Islamic Azad University, Gachsaran, I.R.Iran
2. Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(10); Oct 2018; PP: 7-13
Received: Apr 4th 2018, Revised: Sep 5th 2018, Accepted: Sep 8th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Candida albicans* infection is a problem of growing clinical importance, particularly in immunocompromised populations. This study aimed to investigate the inhibitory effect of carvacrol on the hyphae formation and expression of *C. albicans HWP1*.

METHODS: This cross-sectional study was done over a 6-month period in 2016-2017. Vaginal, mouth and skin surface swabs were obtained from immunocompromised patients. Colonizing clinical isolates of *C. albicans* were identified and drug susceptible isolates detected using WHONET software. The susceptibility test for carvacrol (range 6.25–300 µg/ml) were carried out with a broth microdilution according to the CLSI guidelines against drug susceptible *C. albicans*. The time kill assay of carvacrol (range 2 × MIC to ¼ × MIC) was determined. Hyphae inhibition was evaluated by light microscopy. We determined the expression levels of *HWP1* implicated in hyphae formation of *C. albicans* ATCC 14053 cells by quantitative RT-PCR.

FINDINGS: Ten colonizing clinical isolates of drug susceptible *C. albicans* were identified. Carvacrol was inhibited the growth of all drugs susceptible *isolates of C. albicans* (MIC range, 25-200 µg/ml). Time kill curve assay demonstrated that carvacrol could significantly inhibit the growth of *C. albicans* ($p \leq 0.05$). Carvacrol efficiently prevented hyphae formation in drug susceptible *C. albicans*. The expression levels of *HWP1* gene were down-regulated by 1.82- and 1.62-fold at concentrations of 2 × MIC and 1×MIC of carvacrol, respectively.

CONCLUSION: These results suggest that carvacrol could provide an improved and safe clinical approach in treating *Candida* infections by prevention of hyphae formation.

KEY WORDS: *Candida albicans, Gene Expression, Hyphae*.

Please cite this article as follows:

Khodavandi A, Alizadeh F, Zaboli zadeh S. Inhibitory Effect of Carvacrol on the Expression of *Candida albicans* Hyphae-Specific Gene (*HWP1*). J Babol Univ Med Sci. 2018;20(10):63-71.

[*]**Corresponding Author: F. Alizadeh (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, I.R.Iran
Tel: +98 74 33313930
E-mail: mnalizadeh@yahoo.com

References

1.Chevalier M, Medioni E, Prêcheur I. Inhibition of Candida albicans yeast–hyphal transition and biofilm formation by Solidago virgaurea water extracts. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 7): 1016-22.

2.Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting Candida albicans infection from the perspective of C. albicans virulence and omics approaches on host–pathogen interaction: a review. Int J Mol Sci. 2016; 17(10): Pii: E1643.

3.Alizadeh F, Khodavandi A, Faraji F. Malva sylvestris inhibits Candida albicans biofilm formation. J HerbMed Pharmacol. 2017; 6(2): 62-8.

4.Misme-Aucouturier B, Albassier M, Alvarez-Rueda N, Le Pape P. Specific human and Candida cellular interactions lead to controlled or persistent infection outcomes during granuloma-like formation. Infect Immun. 2017; 85(1): e00807-16.

5.Richardson JP, Ho J, Naglik JR. Candida–epithelial interactions. J Fungi(Basel). 2018; 4(1): Pii:E22.

6.Kim S, Nguyen QB, Wolyniak MJ, Frechette G, Lehman CR, Fox BK, et al. Release of transcriptional repression through the HCR promoter region confers uniform expression of HWP1 on surfaces of Candida albicans germ tubes. PLoS One. 2018; 13(2): e0192260.

7.Azadmanesh J, Gowen AM, Creger PE, Schafer ND, Blankenship JR. Filamentation involves two overlapping, but distinct, programs of filamentation in the pathogenic fungus Candida albicans. G3 (Bethesda). 2017; 7(11): 3797-808.

8.Li X, Hou Y, Yue L, Liu S, Duc J, Sun S. Potential targets for antifungal drug discovery based on growth and virulence in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(10): 5885-91.

9.Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H, Ablordeppey SY. The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. Mini Rev Med Chem. 2016; 16(7): 555-78.

10.Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida species. Front Microbiol. 2017; 7: 2173.

11.Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in Candida species: a current perspective. Infect Drug Resist. 2017; 10: 237-45.

12.Chaillot J, Tebbji F, Remmal A, Boone C, Brown GW, Bellaoui M, et al. The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus Candida albicans .Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(8): 4584-92.

13.Alizadeh F, Khodavandi A, Esfandyari S, Nouripour-Sisakht S. Analysis of ergosterol and gene expression profiles of sterol Δ5,6-desaturase (ERG3) and lanosterol 14α-demethylase (ERG11) in Candida albicans treated with carvacrol. J Herbmed Pharmacol 2018; 7(2): 79-87.

14.Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. Antimicrob. Agents Chemother 2010; 54(12): 5062-9.

15.Lima IO, de Oliveira Pereira F, de Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against Candida albicans strains. J Essent Oil Res. 2013; 25(2): 138-42.

16.Liu X, Ma Z, Zhang J, Yang L. Antifungal compounds against Candida infections from traditional Chinese medicine. BioMed Res Int. 2017; Article ID 4614183.

17.Khodavandi A, Alizadeh F, Alizandeh E. Antifungal activity of carvacrol in combination with fluconazole or amphotericin B against Candida albicans. Malays J Microbiol. 2018; 14(5): 356-63.

18.Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against Candida biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31(6): 572-6.

19.Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang YY, Cao Y, et al. Innate immune cell response upon Candida albicans infection. Virulence 2016; 7(5): 512-26.

20.Ashrafpour M, Ghorbani A, Sefidgar AA, Kazemi H, Moghaddamnia A, Kazemi S, et al. The Comparison of antifungal effects of methylene chloride and methanol extracts of green and black tea on Candida albicans. J Babol Univ Med Sci 2016; 18(5): 53-60.

21.Badiee P, Badali H, Diba K, Ghadimi Moghadam A, Hosseininasab A, Jafarian H, et al. Susceptibility pattern of Candida albicans isolated from Iranian patients to antifungal agents. Curr Med Mycol. 2016; 2(1): 24-9.

22.Alizadeh F, Khodavandi A, Zalakian S. Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of ERG11 gene in fluconazole-resistant Candida albicans. Curr Med Mycol. 2017; 3(1): 13-19.

23.Khodavandi A, Alizadeh F, Aghai Vanda N, Karimi G, Chong PP. Possible mechanisms of the antifungal activity of fluconazole in combination with terbinafine against Candida albicans. Pharma Biol. 2014; 52(12): 1505-9.

24.Khodavandi A, Harmal NH, Alizadeh F, Scully OJ, Sidik SM, Othman F, et al. Comparison between allicin and fluconazole in Candida albicans biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression. Phytomedicine. 2011; 19(1): 56-63.

25.Khodavandi A, Alizadeh F, Sanaee T. Antifungal activity of carvacrol on ergosterol synthesis in multidrug resistant Candida albicans. Medical J Hormozgan Univ Med Sci. 2018; 22(2): 113-21.

26.Doke SK, Raut JS, Dhawale S, Karuppayil SM. Sensitization of Candida albicans biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. J Gen Appl Microbiol. 2014; 60(5): 163-8.

27.Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. Crit Rev Food Sci Nutr. 2015; 55(3): 304-18.

28.Naghdi Badi H, Abdollahi M, Mehrafarin A, Ghorbanpour M, Tolyat M, Qaderi A, et al. An overview on two valuable natural and bioactive compounds, thymol and carvacrol, in medicinal plants. J Med Plants. 2017; 3(63): 1-32.

29.Ma C, Du F, Yan L, He G, He J, Wang C, et al. Potent activities of roemerine against Candida albicans and the underlying mechanisms. Molecules. 2015; 20(10): 17913-28.

30.Vediyappan G, Rossignol T, d'Enfert C. Interaction of Candida albicans biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(5): 2096-111.