فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۵، بهار ۱۳۹۷، صفحه ۸۷- ۹۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۳۰

مقایسه میزان بیان ژن *ERG 11* *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با *تیموس ولگاریس* به‌تنهایی و در ترکیب با *منتا اسپیکاتا*

علیرضا خداوندی: استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد گچساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گچساران، ایران، alireza_khodavandi@yahoo.com
فهیمه علیزاده *: استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران، mnalizadeh@yahoo.com
زینب آبراهه: دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران، iauyasouj@gmail.com

چکیده

مقدمه: بیماری‌های ناشی از بیماری‌زای فرصت‌طلب *کاندیدا آلبیکانس* به‌طور معمول با داروهای ضد قارچ درمان می‌شوند، هرچند شکست درمان به‌ویژه در میزبان دچار نقص ایمنی شدید محتمل است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه میزان بیان ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با *تیموس ولگاریس* به‌تنهایی و در ترکیب با *منتا اسپیکاتا* انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، پروفیل بیان ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکانس تیمارشده* با *تیموس ولگاریس* به‌تنهایی و در ترکیب با *منتا اسپیکاتا* با تحلیل بر اساس حجم بررسی شد.

نتایج: نتایج تحلیل پروفیل بیان ژن *ERG11* در *کاندیدا آلبیکانس* نشان دادند که *تیموس ولگاریس* در ترکیب با *منتا اسپیکاتا* موجب کاهش بیان ژن شده است و تیمار *کاندیدا آلبیکانس* با *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی به کاهش کمتری از میزان RNA ژن *ERG11* منجر می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: داده‌های حاصل نشان‌دهنده مکانیسم مشترکی برای یافتن اهداف احتمالی، برای نمونه، در پاسخ به کاهش ارگوسترول در *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با *تیموس ولگاریس* به‌تنهایی و در ترکیب با *منتا اسپیکاتا* هستند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، *ERG11*، *کاندیدا آلبیکانس*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

مخمر *کاندیدا آلبیکانس*[1] عفونت دوره‌ای کاندیدیازیس[2] را ایجاد می‌کند. تعداد محدودی داروی ضد قارچ برای درمان بیماری‌های ناشی از گونه‌های *کاندیدا* وجود دارند و استفاده بیش از حد این داروها به پیدایش سوش‌های مقاوم منجر شده است (۱-۳). همچنین، بیشتر داروهای ضد قارچی آثار جانبی بسیاری را نشان می‌دهند (۴).

کاندیدا آلبیکانس[3] عوامل بیماری‌زای بسیاری دارد؛ ازجمله چسبندگی به سلول‌های اندوتلیال و اپی‌تلیال انسان، توانایی ترشح آنزیم‌های هیدرولیزکننده که بیشتر پروتئینازها و فسفولیپازها هستند، تغییر فنوتیپی و همچنین فرار از فاگوسیتوزشدن توسط سلول‌های ایمنی میزبان. علاوه بر این، از عوامل مهم بیماری‌زایی *کاندیدا آلبیکانس* چندشکلی‌بودن با توانایی تغییر برگشت پذیر شکل‌های مخمری، ریسه حقیقی، ریسه کاذب و تشکیل بیوفیلم هستند. شکل ریسه‌ای و بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* قادر به نفوذ به درون بافت میزبان، فرار از سیستم ایمنی و ایجاد عفونت است(۵-۷).

ارگوسترول، از اجزای حیاتی غشای سلولی قارچ‌هاست. ژن‌های بسیاری در تولید آنزیم‌های لازم برای سنتز ارگوسترول دخالت می‌کنند؛ ازجمله ژن‌های دخیل در سنتز ارگوسترول *کاندیدا آلبیکانس*، *ERG1-11* و *ERG25-27* هستند و ژن‌های دیگری مانند *CYB5* و *NCP1* آنزیم‌های سیتوکروم را سنتز می‌کنند (۸).

ثابت شده است که مواد مشتق‌شده از گیاهان دارویی حتی پس از استفاده طولانی‌مدت، عوارض جانبی ندارند. خانواده نعناعیان[4] یکی از معروف‌ترین گیاهان طبیعی هستند که برای چای گیاهی، تونیک، ضد نفخ، ضد سرفه، ضدعفونی‌کننده، ضد التهاب و درمان سرماخوردگی استفاده می‌شود. *تیموس ولگاریس*[5] حاوی ترکیبات تیمول و دارای ویژگی‌های ضد میکروبی است. *منتا اسپیکاتا*[6] دارای ترکیبات پلی‌فنلی است و از این رو، ویژگی‌هی آنتی اکسیدانی بسیاری دارد (۹-۱۳).

مقاومت به داروهای ضد قارچ به جهش‌های نقطه‌ای و سطوح بالای بیان ژن *ERG11* ربط داده شده‌اند (۱۴). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که فلوکونازول بر بیان ژن‌های *ERG11*، *ERG1*، *ERG7*، *ERG25* و *ERG9* در *کاندیدا آلبیکانس* تأثیر درخور توجهی دارد (۱۵).

در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن *ERG11* در *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با رقت‌های مختلف عصاره‌های آبی و متانولی *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهان: گیاهان *تیموس ولگاریس* (آویشن باغی) و *منتا اسپیکاتا* (نعناع) در فصل بهار از فروشگاهای یاسوج تهیه شدند و شرکت دارویی زرد بند یاسوج آنها را تأیید علمی کرد.

عصاره‌گیری: اندام هوایی گیاهان یادشده با آب مقطر استریل شسته و قطعه‌قطعه شدند. سپس در هوای آزاد و سایه خشک شدند تا به‌راحتی در آسیاب برقی خرد شوند. مقدار ۱ گرم از پودر الک‌شده (الک شماره ۸۰) اندام‌های مختلف گیاهان مطالعه‌شده به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و یا متانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد. پس از سوکسیله‌کردن عصاره‌ها، از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شدند. برای استریل‌کردن عصاره‌ها از

میلی‌پور فیلتر (0.22 µm durapore, Millipore) استفاده شد (۱۶).

ریزموجودات: ریزموجودات استفاده‌شده در پژوهش شامل ۹ جدایه بالینی بودند که از افراد دچار ضعف سیستم ایمنی بدن (افراد مبتلا به سرطان خون، تومور مغزی، ایدز و دیابت) جمع‌آوری شده بودند. نمونه‌ها با سواب از ترشحات مخاطی دهان و واژن ۴۰ بیمار جمع‌آوری و بی‌درنگ روی محیط کشت سابوراد دکستروز آگار[۷] حاوی کلرامفنیکل (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) کشت داده شدند. جدایه‌ها با توجه به شکل ظاهری کلنی (ماهواره‌ای کرم‌رنگ) روی محیط کشت SDA، مشاهده‌های میکروسکوپی مخمر، تولید لوله زایا، هیدرولیز اوره و کشت روی محیط کشت کروم آگار *کاندیدا* (CHROMagar Company, France)، شناسایی و در سابوراد دکستروز مایع[۸] (Difco Laboratories) حاوی کلرامفنیکل ذخیره شدند. همچنین، از سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 10231 به‌عنوان منبعی برای کنترل کیفیت استفاده شد (۱۷).

آزمون حساسیت‌سنجی ضد کاندیدیایی به روش دیسک دیفیوژن: برای اطمینان از فاز لگاریتمی رشد، از جدایه‌های *کاندیدا آلبیکانس* و سویه استاندارد دو بار کشت مجدد تهیه و سوسپانسیونی به کدورت معادل نیم مک فارلند $10^6 \times$(1-5 CFU/ml) در سرم فیزیولوژی تهیه شد. به‌طور خلاصه، تعداد ۵ کلنی به قطر تقریبی ۱ میلی‌متر به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه، ورتکس و یک بار شسته شدند. تراکم سلول‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (UNICO 2150-UV, USA) در طول موج ۵۳۰ نانومتر حدود $۱-۵ \times ۱۰^{۶}$ CFU/ml برای دستیابی به کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تنظیم و با روش ویبل کانت[۹] تأیید شد. پس از تهیه سوسپانسیون مخمری، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون به‌شکل کشت چمنی، ۳ بار به‌طور کامل با زاویه ۶۰ درجه و یکنواخت در سطح پلیت ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت SDA تلقیح شد. سپس پلیت‌ها ۱۵ دقیقه زیر هود میکروبیولوژی قرار داده شدند تا مایع اضافی آنها جذب شود و به درون آگار نفوذ کند. سپس دیسک‌های خالی با حجم‌های مختلف (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) عصاره‌های استریل گیاهان *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* و نسبت مساوی از هر دو گیاه آغشته و پس از خشک‌شدن در فاصله ۲/۵ تا ۳ سانتی‌متر قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و سپس، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک با خط‌کش میلی‌متری بررسی شد. در این آزمایش، از دیسک‌های حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسین بی (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) برای شاهد مثبت و دیسک‌های خالی استریل برای شاهد منفی استفاده شد. آزمایش‌ها در دو تکرار سه‌تایی انجام شدند (۱۸).

آزمون حساسیت‌سنجی ضد کاندیدیایی به روش میکرودایلوشن براث[۱۰]: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا مطابق دستورعمل CLSI، سوسپانسیون تهیه‌شده معادل ۰/۵ مک فارلند به میزان ۱:۱۰۰ با سرم فیزیولوژی رقیق و در مرحله بعد به میزان ۱:۲۰ در محیط کشت استریل RPMI-1640 حاوی ال-گلوتامین (Sigma) رقیق شد. در پایان، سوسپانسیون حاصل $۰/۵-۲/۵ \times ۱۰^{۳}$ سلول مخمر در میلی‌لیتر داشت که با روش ویبل کانت تأیید شد (۱۹).

تهیه رقت از عصاره‌ها: دامنه رقت عصاره‌های آبی و الکلی اندام‌های برگ، ساقه و گیاهان مطالعه‌شده ۰/۱۰۲ تا ۱۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. عصاره‌های گیاهان در ظروف تیره‌رنگ شیشه‌ای، در یخچال و دمای منفی ۴ درجه سلسیوس ذخیره شدند. اسیدیته عصاره‌ها ۷ در نظر گرفته شد.

تعیین کمترین رقت ممانعت‌کنندگی از رشد[11]: کمترین رقت ممانعت‌کنندگی عصاره‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی (Brand 781660, Wertheim, Germany) تعیین شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت عصاره در محیط‌کشت RPMI-1640 حاوی ال-گلوتامین به‌تنهایی و یا ترکیب ۵۰:۵۰ به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی درون چاهک میکروپلیت اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. در میکروپلیت‌های حاوی سوسپاسیون میکروبی و عصاره‌ها بسته و با پارافیلم پوشانده شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در یخچال (برای یکسان‌سازی وضعیت چاهک‌ها)، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی، شاهد مثبت در نظر گرفته شدند. در این روش، شاهد مثبت برای بررسی نتایج بسیار مهم و معیار سنجش MIC است و باید *کاندیدا* در چاهک شاهد مثبت به‌خوبی رشد کرده باشد. علاوه بر این، چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در محیط‌کشت به ۱۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت، شاهد منفی در نظر گرفته شد. پس از گرمخانه‌گذاری، ابتدا محتویات هر چاهک به‌خوبی مخلوط و میزان جذب نوری نمونه‌ها با الیزا ریدر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نقطه پایانی برای تأثیر عصاره‌ها بر مخمر، کمترین رقت هر ترکیب ضد قارچی تعریف شد که از ۵۰ و ۹۰ درصد رشد در مقایسه با شاهد ممانعت می‌کند. آزمایش‌ها در دو تکرار سه‌تایی انجام شدند (۳ و ۱۴).

سنجش بیان ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکانس*: برای سنجش میزان بیان ژن *ERG11* در *کاندیدا آلبیکانس*، رقت‌های مختلف بر اساس نتیجه MIC از رقت‌های معادل دو برابر MIC، MIC و **نصف** MIC با ۱×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر *کاندیدا آلبیکانس* مخلوط و ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سوسپانسیون تهیه‌شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ و پلت سه بار با سرم فیزیولوژی شسته شد. استخراج RNA کل با کیت RNeasy Mini ویژه سلول‌های مخمری (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق دستورعمل شرکت سازنده و با اندکی تغییر انجام شد. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن با اسپکتروفتومتری و ژل آگارز بررسی و سپس کیفیت RNA استخراجی پس از سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن اکتین:
(F: 5'ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC3'، R: 5'GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA3') سنجیده شد (۶). برای حذف احتمال هر نوع آلودگی DNA، از تیمار با آنزیم RNase free DNase set (Qiagen) استفاده شد. ۰/۵ میکروگرم از RNA کل با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و پرایمرهای هگزامر تصادفی موجود در کیت سنتز cDNA (Fermentas, USA) به cDNA سنتز شد. آزمایش ها

در دو تکرار سه‌تایی انجام شدند (۲ و ۶).

ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از پرایمر (F: 5'TTGGTGGTGGTAGACATA3'، R: 5'TCTGCTGGTTCAGTAGGT3') که خداوندی[۱۲] و همکاران (۶) طراحی کرده‌اند از cDNA سنتزشده تکثیر شد. علاوه بر این، از ژن اکتین به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. برای اطمینان از اینکه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ناشی از DNA ژنومی نباشند، برای هر نمونه شاهد منفی داخلی بدون آنزیم ترانس کریپتاز معکوس تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۵ میکرولیتر بافر Taq ۱۰X (Fermentas)، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار (Fermentas)، ۰/۵میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای بالادست و پایین‌دست (Bioneer, Korea)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز (Fermentas)، ۱ میکرولیتر cDNA و مقدار مناسبی آب دیونیزه (سیناژن، ایران) تا حجم ۲۵ میکرولیتر آماده شد. شرایط تکثیر مطابق دستور زیر انجام شد: چرخه ۱ (۱X): مرحله ۱. ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ چرخه ۲ (۲۶X): مرحله ۱. ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله ۲. ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله ۳. ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه؛ چرخه ۳ (۱X): مرحله ۱. ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Techno, Germany) انجام شد. آزمایش‌ها در دو تکرار سه‌تایی انجام شدند (۲ و ۶).

مطابق روش خداوندی و همکاران (۱۷)، سنجش نسبی میزان بیان ژن مطالعه‌شده بر اساس حجم باندهای ایجادشده در الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. با استفاده از تصویرساز ژل داک (Bio-Rad, USA)، تصویر ژل آگارز کالیبره ثبت و میزان بیان ژن با نرم‌افزار Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad, USA, version 4.6) ارزیابی شد.

طرح مطالعه و تحلیل آماری: مطالعه حاضر به‌شکل طرح کاملاً تصادفی و آزمایش‌ها در دو تکرار سه‌تایی انجام شدند. نتایج مطالعه پس از نرمال‌کردن داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰(SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل شدند. ارزش $p<0.05$ سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آزمون حساسیت‌سنجی ضد کاندیدیایی انتشار دیسک نشان دادند که در مقایسه با داروی ضد قارچی آمفوتریسین بی، عصاره‌های گیاهان *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* روی جدایه‌های بالینی و سویه استاندارد ATCC *کاندیدا آلبیکانس* مؤثر بوده‌اند. عصاره‌های مطالعه‌شده هاله ممانعت از رشدی ایجاد کردند که نشان داد حجم ۱۰۰ میکرولیتر دارای پتانسیل ضد قارچی بیشتری بوده است. در همه تیمارهای مطالعه‌شده، عصاره‌های آبی و متانولی تفاوت درخور توجهی نشان ندادند. نتایج، تأثیر بیشتر عصاره *تیموس ولگاریس* در ترکیب با *منتا اسپیکاتا* علیه *کاندیدا آلبیکانس* را در مقایسه با عصاره‌های دیگر نشان دادند. همچنین، گیاه *تیموس ولگاریس* به‌تنهایی تأثیر ضد کاندیدیایی بیشتری در مقایسه با *منتا اسپیکاتا* داشت (جدول ۱). نتایج آزمون حساسیت‌سنجی ضد کاندیدیایی میکرودایلوشن براث، نتایج آزمون انتشار دیسک را تأیید کردند؛ کمترین میزان رقت ممانعت از رشد (MIC) به عصاره *تیموس ولگاریس* در ترکیب با *منتا اسپیکاتا* تعلق داشت (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج آزمون حساسیت‌سنجی ضد کاندیدیایی به روش دیسک دیفیوژن (میلی‌متر) عصاره‌های آبی و متانولی اندام هوایی گیاهان *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم علیه *کاندیدا آلبیکانس*

عصاره‌های آزمایش‌شده/جدایه‌ها		حجم عصاره (میکرولیتر)	*کاندیدا آلبیکانس* ATCC 10231	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴	جدایه ۵	جدایه ۶	جدایه ۷	جدایه ۸	جدایه ۹
تیموس ولگاریس	عصاره آبی	۱۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۱۰±۰/۳۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۹۰±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۵۰	۷/۰۳±۰/۹۵
		۵۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۹/۳۰±۰/۲۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۷۰±۰/۳۴	۶/۶۲±۰/۴۵	۶/۲۶±۰/۴۶
		۲۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۷۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۹۰±۰/۰۰	۷/۱۰±۰/۳۴	۶/۳۰±۰/۵۱
	عصاره متانولی	۱۰۰	۶/۹۰±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۲۵	۸±۰/۱۷	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷/۹۰±۰/۱۷	۶/۷۰±۰/۳۶	۹±۰/۲۰	۹±۰/۲۰
		۵۰	۶/۹۰±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷/۲۰±۰/۵۵	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶/۵۰±۰/۵۰	۷/۵۰±۰/۵۰	۶/۳۰±۰/۲۶	۸/۲۰±۰/۵۲	۸/۲۰±۰/۵۲
		۲۰	۶/۹۰±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷±۰/۵۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۵۰±۰/۵۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۵۰±۰/۳۴	۶/۵۰±۰/۳۴
منتا اسپیکاتا	عصاره آبی	۱۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۵۰	۶±۰/۰۰	۷/۲۰±۰/۲۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
		۵۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۴۰±۰/۲۵	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
		۲۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰

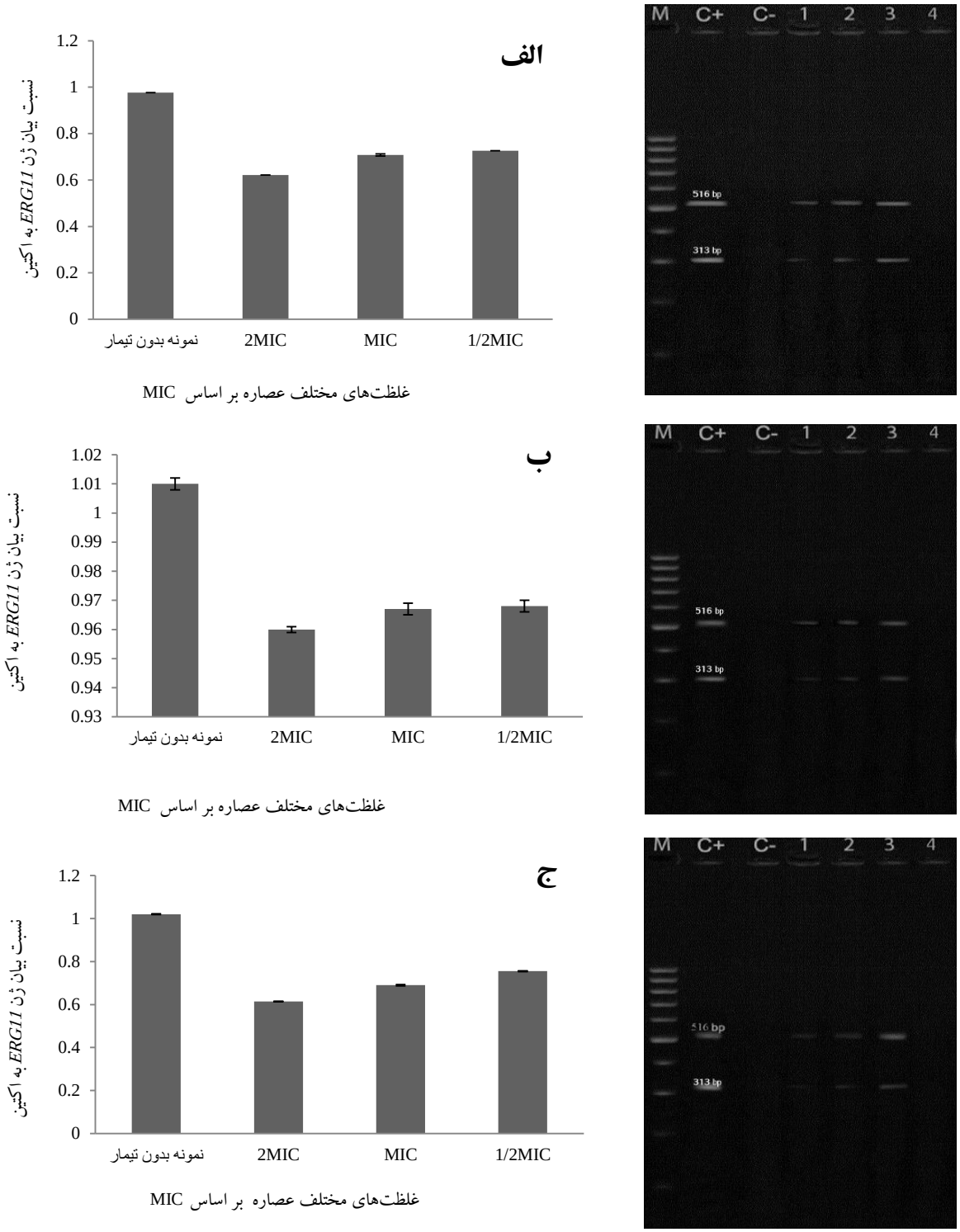
ادامه جدول ۱- نتایج آزمون حساسیت‌سنجی ضد کاندیدیایی به روش دیسک دیفیوژن (میلی‌متر) عصاره‌های آبی و متانولی اندام هوایی ...

عصاره‌های آزمایش‌شده/جدایه‌ها		حجم عصاره (میکرولیتر)	*کاندیدا آلبیکانس* ATCC 10231	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴	جدایه ۵	جدایه ۶	جدایه ۷	جدایه ۸	جدایه ۹
	عصاره متانولی	۱۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۷۰±۰/۳۶	۷±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۳۶	۶±۰/۰۰	۸/۱۰±۰/۱۷	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
		۵۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۷۰±۰/۳۴	۷±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۳۰±۰/۳۴	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
		۲۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۲۰±۰/۲۶	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶/۶۰±۰/۵۲	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
متنا اسپیکاتا + *تیموس ولگاریس*	عصاره آبی	۱۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۸۰±۰/۳۰	۱۰±۰/۴۳	۷/۵۰±۰/۴۰	۶±۰/۰۰	۶/۵۰±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
		۵۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۹/۲۰±۱/۰۴	۷/۳۰±۰/۳۶	۶±۰/۰۰	۶/۵۰±۰/۰۰	۶/۸۰±۰/۲۶	۶±۰/۰۰
		۲۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۴۵	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
	عصاره متانولی	۱۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۸±۰/۲۰	۶/۹۰±۰/۲۶	۹/۲۰±۰/۳۶	۹/۵۰±۰/۰۰	۸±۰/۳۰	۱۰/۶۰±۰/۳۴	۶±۰/۰۰	۹±۰/۰۰
		۵۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۷۰±۰/۲۶	۶/۵۰±۰/۴۳	۸/۹۰±۰/۳۶	۹±۰/۳۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۹/۶۰±۰/۱۷	۶±۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۴۳
		۲۰	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶/۱۰±۰/۱۷	۸±۰/۳۶	۸/۲۰±۰/۳۰	۷±۰/۰۰	۷/۸۰±۰/۲۶	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۴۰
آمفوتریسین بی			۲۲/۰۱±۰/۰۱	۲۲/۱۱±۰/۱۶	۲۲/۰۲±۰/۵۹	۲۳/۰۱±۰/۵۵	۲۲/۱۱±۰/۱۱	۲۲/۱۱±۰/۰۰	۲۲/۱۱±۰/۰۰	۲۳/۶۱±۰/۰۰	۲۳/۸۱±۰/۴۱	۲۳/۳۱±۰/۱۱

جدول ۲- نتایج آزمون حساسیت‌سنجی ضد کاندیدیایی به روش میکرودایلوشن براث عصاره‌های آبی و متانولی اندام هوایی گیاهان *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم علیه *کاندیدا آلبیکانس*

عصاره های آزمایش شده/جدایه ها		MIC (میلی گرم بر میکرولیتر)	ATCC 10231	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴	جدایه ۵	جدایه ۶	جدایه ۷	جدایه ۸	جدایه ۹
تیموس ولگاریس	عصاره آبی	MIC_{90}	۱۱/۲۸	۱۱/۲۶	۱۲/۲۴	۱۲/۲۷	۱۱/۸۲	۱۱/۸۰	۱۱/۴۴	۱۲/۲۴	۱۱/۵۵	۱۲/۱۵
		MIC_{50}	۶/۲۷	۶/۲۵	۶/۸۰	۶/۸۲	۶/۵۷	۶/۵۵	۶/۳۶	۶/۸۰	۶/۴۲	۶/۷۵
		MFC	۱۲/۵۴	۱۲/۵۱	۱۳/۶۰	۱۳/۶۴	۱۳/۱۴	۱۳/۱۰	۱۲/۷۲	۱۳/۶۰	۱۲/۸۴	۱۳/۵۰
	عصاره متانولی	MIC_{90}	۱۲/۲۰	۱۱/۳۰	۱۱/۷۹	۱۲/۴۲	۱۱/۲۵	۱۱/۲۵	۱۱/۰۷	۱۲/۲۵	۱۱/۲۸	۱۲/۲۱
		MIC_{50}	۶/۷۸	۶/۳۰	۶/۵۵	۶/۹۰	۶/۲۵	۶/۲۵	۶/۱۵	۶/۲۵	۶/۲۷	۶/۲۳
		MFC	۱۳/۵۶	۱۲/۵۶	۱۳/۱۰	۱۳/۸۰	۱۲/۵۰	۱۲/۵۰	۱۲/۳۰	۱۲/۵۰	۱۲/۵۴	۱۲/۴۶
منتا اسپیکاتا	عصاره آبی	MIC_{90}	۲۲/۵۷	۲۳/۳۱	۲۳/۲۵	۲۳/۲۲	۲۳/۰۴	۲۲/۹۵	۲۳/۳۱	۲۳/۳۲	۲۳/۱۱	۲۲/۵۷
		MIC_{50}	۱۲/۵۴	۱۲/۹۰	۱۲/۹۲	۱۲/۹۰	۱۲/۸۰	۱۲/۷۵	۱۲/۹۵	۱۲/۹۶	۱۲/۸۴	۱۲/۵۴
		MFC	۲۵/۰۸	۲۵/۹۰	۲۵/۸۰	۲۵/۸۴	۲۵/۸۰	۲۵/۶۰	۲۵/۵۰	۲۵/۹۰	۲۵/۹۲	۲۵/۶۸
	عصاره متانولی	MIC_{90}	۲۲/۱۲	۲۲/۱۲	۲۲/۲۳	۲۲/۱۴	۲۲/۴۱	۲۲/۷۷	۲۲/۵۹	۲۲/۴۱	۲۲/۷۷	۲۲/۴۸
		MIC_{50}	۱۲/۲۹	۱۲/۳۰	۱۲/۳۵	۱۲/۳۰	۱۲/۴۵	۱۲/۶۵	۱۲/۵۵	۱۲/۴۵	۱۲/۶۵	۱۲/۴۹
		MFC	۲۴/۵۸	۲۴/۵۸	۲۴/۷۰	۲۴/۶۰	۲۴/۹۰	۲۴/۳۰	۲۴/۱۰	۲۴/۹۰	۲۴/۳۰	۲۴/۹۸
تیموس ولگاریس +منتا اسپیکاتا	عصاره آبی	MIC_{90}	۸/۲۰	۸/۳۲	۷/۰۴	۷/۳۱	۷/۲۲	۸/۲۲	۹/۱۳	۸/۲۲	۸/۰۲	۸/۱۴
		MIC_{50}	۵/۸۹	۶/۹۵	۶/۸۰	۶/۹۵	۶/۹۰	۶/۹۰	۶/۸۵	۶/۹۰	۶/۷۹	۶/۸۶
		MFC	۸/۷۸	۸/۹۱	۷/۶۰	۸/۹۰	۷/۸۰	۹/۸۰	۹/۷۰	۸/۸۰	۸/۵۸	۸/۷۲
	عصاره متانولی	MIC_{90}	۸/۰۴	۸/۴۸	۸/۶۰	۸/۴۱	۸/۴۱	۸/۵۹	۸/۷۷	۸/۲۶	۸/۰۵	۸/۴۱
		MIC_{50}	۵/۷۸	۶/۴۵	۶/۵۶	۶/۴۵	۶/۴۵	۶/۵۵	۶/۶۵	۶/۳۷	۶/۲۵	۶/۴۵
		MFC	۸/۵۶	۸/۹۸	۸/۱۲	۸/۹۰	۹/۹۰	۸/۱۰	۸/۳۰	۸/۷۴	۹/۵۰	۹/۹۰

شکل ۱، نتایج تکثیر قطعه ۳۱۳ جفت بازی ژن *ERG11* و قطعه ۵۱۶ جفت بازی برای ژن مرجع را نشان می‌دهد. داده‌ها نشان دادند که میزان بیان ژن مرجع در *کاندیدا آلبیکانس* شاهد و تیمارشده با عصاره یکسان بود و میزان بیان ژن *ERG11* در رقت‌های معادل دو برابر MIC، MIC و نصف MIC در تیمارهای مختلف تفاوت معناداری ($p \leq 0.05$) داشته است. در مقایسه با شاهد، بیان ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با عصاره *تیموس ولگاریس*، *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم کاهش نشان داده است.



شکل ۱- مقدار نسبی بیان ژن *ERG11* در *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با رقت‌های مختلف بر اساس MIC. عصاره: الف. *تیموس ولگاریس*، ب. *منتا اسپیکاتا*، ج. ترکیب *تیموس ولگاریس* با *منتا اسپیکاتا* پس از ۲۴ ساعت همراه با نتایج بیان ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با رقت‌های مختلف عصاره‌های مطالعه‌شده بر اساس MIC پس از ۲۴ ساعت روی ژل آگارز: M. نشانگر، +C. شاهد مثبت و حاوی DNA ژنومی، -C. نمونه بدون تیمار (شاهد منفی)، ستون ۱. رقت دو برابر MIC عصاره، ستون ۲. رقت برابر MIC عصاره، ستون ۳. رقت نصف MIC عصاره، ستون ۴. شاهد داخلی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس

بحث و نتیجه‌گیری

مدت زمانی طولانی است که عفونت‌های قارچی مشکلات بسیاری را برای سلامت انسان‌ها و به‌ویژه افراد دچار نقص ایمنی ایجاد کرده‌اند. با وجود تلاش پی‌درپی پژوهشگران، نبرد علیه کاندیدیازیس همچنان ادامه دارد و تا حد زیادی ناموفق بوده است. با در نظر گرفتن اثر درمان‌های ضد قارچی رایج و محدود فعلی و ظهور مقاومت در برابر داروها توسط سویه‌های مختلف *کاندیدا*، نیاز شدید به روش ضد قارچ ضروری به نظر می‌رسد و به استفاده از توان ضد میکروبی گیاهانی مانند *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا*، مولکول‌های زیستی با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی و دارویی جایگزین داروهای شیمیایی توجه شده است (۶ و ۱۱-۱۳).

گزارش‌های بسیاری نشان داده‌اند که *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* فعالیت ضد قارچی قوی علیه *کاندیدا آلبیکانس* دارند (۱۷ و ۲۰-۲۳). در مطالعه حاضر، عصاره‌های *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم علیه *کاندیدا آلبیکانس* سنجیده شدند و مکانیسم مولکولی احتمالی عصاره‌های آبی اندام هوایی این گیاهان با سنجش میزان بیان ژن *ERG11*، از مهم‌ترین ژن های دخیل در بیوسنتز ارگوسترول غشای سلولی قارچ، ارزیابی شد.

نتایج مطالعه حاضر، تأثیر عصاره‌های اندام‌های هوایی گیاهان *تیموس ولگاریس* و *منتا اسپیکاتا* راعلیه کاندیدا آلبیکانس نشان دادند و با مطالعه‌های پیشین هم‌خوانی داشتند (۱۷و ۲۰-۲۳). در مطالعه حاضر، ترکیب عصاره *تیموس ولگاریس* با *منتا اسپیکاتا* بیشترین تأثیر ضد قارچی را علیه *کاندیدا آلبیکانس* نشان داد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که *تیموس ولگاریس* حاوی ترکیبات مونوترپن فنلی مانند تیمول و کارواکرول و *منتا اسپیکاتا* نیز دارای ترکیبات پلی‌فنلی است (۹ و ۱۰). بنابراین، وجود ترکیبات مؤثره در گیاهان، نقش مهمی در افزایش تأثیر ترکیبی عصاره‌های *تیموس ولگاریس* با *منتا اسپیکاتا* دارد.

ارگوسترول جزو اصلی استرول غشای سلولی و فرآیندهای غشایی سلول مخمر و همچنین مسئول حفظ عملکرد و یکپارچگی سلول است. مکانیسم اولیه عملکرد برخی داروهای ضد قارچی ازجمله آزول‌ها و پلی‌ان‌ها، مهار رشد سلول مخمر از طریق اختلال در بیوسنتز استرول طبیعی است که به کاهش در بیوسنتز ارگوسترول منجر می‌شود (۲۴). یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در بیوسنتز ارگوسترول غشای سلولی *کاندیدا آلبیکانس* *ERG11* است و جهش در ژن‌های بیوسنتز ارگوسترول موجب مقاومت قارچ به برخی داروهای ضد قارچی شده است (۲۵).

نتایج مطالعه حاضر تفاوت معنادار میزان بیان ژن *ERG11* در تیمارهای مختلف را نشان دادند و در مقایسه با شاهد، بیان ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با عصاره *تیموس ولگاریس*، *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم کاهش یافت. *ERG11* تولید لانوسترول ۱۴-α دمیتلاز را کدگذاری می کند و بیان بیشتر *ERG11* موجب تولید مقدار زیادی آنزیم لانوسترول ۱۴-α دمیتلاز و در نتیجه سنتز بیشتر ارگوسترول و نگهداری یکپارچگی غشای سلولی *کاندیدا* می‌شود؛ برعکس، کاهش بیان ژن *ERG11* موجب سنتز ارگوسترول کمتر و از بین رفتن یکپارچگی غشای سلولی *کاندیدا* می‌شود (۲۶). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن *ERG11* یا جهش در این ژن موجب مقاومت به داروهای ضد قارچی مؤثر بر غشای

سلولی شده است (۲۷-۲۹).

اصلانی[۱۳] و همکاران (۳۰)، تأثیر ضد میکروبی *اکینوفورا پلتی‌لوبا*[۱۴] (خوشاریزه) و *ساتورجا بختیاریکا*[۱۵] (مرزه بختیاری) را در مهار رشد جدایه‌های بالینی مقاوم به فلوکونازول *کاندیدا آلبیکانس* با ارزیابی میزان بیان ژن‌های *ERG11* و *MDR1* سنجیدند. نتایج نشان دادند که *اکینوفورا پلتی‌لوبا* موجب کاهش بیان *ERG11* شد در حالی که گیاه *ساتورجا بختیاریکا* روی بیان ژن *ERG11* تاثیری نداشت.

نتایج مطالعه‌های خداوندی و همکاران (۱۶)، کاهش بیان ژن‌های *ERG1, 3, 11* *کاندیدا آلبیکانس* تیمارشده با ترکیب فلوکونازول و تربینافین را نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر، خداوندی و همکاران (۱۷) تأثیر ضد بیوفیلم کاندیدیایی عصاره آبی ریشه *تیموس ولگاریس* را با ارزیابی تغییرات نسبی میزان بیان ژن *HWP1* سنجیدند. نتایج نشان دادند که گیاه یادشده موجب کاهش بیان ژن *HWP1* در رقت‌های مختلف MIC شده است.

موسوی‌نژاد[۱۶]، تأثیر ضد کاندیدیایی گیاهان آویشن شیرازی[۱۷] و وشا[۱۸] را ارزیابی (۳۱) و تأثیر عصاره‌های الکلی گیاهان یادشده را بر میزان بیان ژن‌های *MDR1* و *ERG11* بررسی کرد. نتایج نشان دادند که MIC عصاره الکلی آویشن شیرازی و وشا در جدایه‌های بالینی *کاندیدا آلبیکانس* به‌ترتیب ۲۵۶ و ۶۴ میلی گرم در میلی‌لیتر و MFC عصاره الکلی آویشن شیرازی و وشا در جدایه‌های بالینی *کاندیدا آلبیکانس* به‌ترتیب ۵۱۲ و ۱۲۸ میلی گرم در میلی‌لیتر بوده است. گیاه آویشن شیرازی، ژن‌های *MDR1* و *ERG11* را مهار کرد و عصاره وشا روی هر دو ژن تأثیری نداشت.

در دهه‌های اخیر به دلیل مقاومت‌های دارویی، عوارض جانبی داروهای شیمیایی و الزام‌های زیست‌محیطی، گرایش به استفاده از گیاه‌درمانی رو به افزایش است. مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن *ERG11* در تیمارهای مختلف تفاوت معناداری داشته است. از آنجا که ژن *ERG11* یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در بیوسنتز ارگوسترول غشای سلولی *کاندیدا آلبیکانس* است، هدف مؤثری برای تأثیر عوامل ضد کاندیدیایی محسوب می‌شود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر و با انجام آزمایش‌های تکمیلی، ترکیب *تیموس ولگاریس و منتا اسپیکاتا* می‌تواند جایگزین داروهای شیمیایی شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله حاضر از مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج برای همکاری صمیمانه در اجرای این طرح و از شرکت دارویی زرد بند یاسوج برای همکاری در شناسایی و تهیه عصاره گیاهی، کمال امتنان را دارند.

References

(1) Khodavandi A., Nazira Adila BT., Poh WC., Phelim YVC., Alizadeh F., Harmal NS., Chong PP. Antifungal activity of *Rhizome coptidis* and *Alpinia galangal* against *Candida* species. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2013; 7(3): 1725-1730.

(2) Khodavandi A., Alizadeh F., Namvar F., Rosfarizan M., Chong, PP. Anti-*Candida* potential of *Allium ascalonicum* Linn: antibiofilm activity and biomolecular mechanism of action. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2014; 8(2): 349-356.

(3) Han Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine* 2007; 14(11): 733-738.

(4) Vandeputte P., Ferrari S., Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology* 2012; doi:10.1155/2012/713687.

(5) Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* 2008; 52: 1-10.

(6) Khodavandi A., Harmal NS., Alizadeh F., Scully OJ., Sidik SHM., Othman F., et al. Ng KP, Chong PP. Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of *HWP1* gene expression. *Phytomedicine* 2011; 19: 56-63.

(7) Khan MSA., Ahmad I., Aqil F., Owais M., Shahid M., Musarrat J. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. In: Ahmad I., Owais M., Shahid M., Aqil F., editors. *Combating Fungal Infections Problems and Remedy*. New York: Springer; 2010: 21-45.

(8) Pierson CA., Eckstein J., Barbuch R., Bard, M. Ergosterol gene expression in wild-type and ergosterol-deficient mutants of *Candida albicans*. *Medical Mycolology* 2004; 42(4): 385-389.

(9) Hudaib M., Speroni E., Di Pietra AM., Cavrini V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 29(4): 691-700.

(10) Dorman HJD., Koşar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha species*, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51(16): 4563-4569.

(11) Fayad NK., AL-Obaidi OHS., Al-Noor TH., Ezzat MO. Water and alcohol extraction of thyme plant (*Thymus vulgaris*) and activity study against bacteria, tumors and used as anti-oxidant in margarine manufacture. *Innovation Union- European Commission* 2013; 4(1): 41-51.

(12) Yousuf PMH., Noba NU., Shohel M., Bhattacherjee R., Das B.K. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effect of *Mentha spicata* (spearmint). *British Journal of Pharmaceutical Research* 2013; 3(4): 854-864.

(13) Mohsenipour Z., Hassanshahian M. The inhibitory effect of Thymus vulgaris extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2015; 5(4): 309-318.

(14) White TC., Holleman S., Dy F., Mirels LF., Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46: 1704-1713.

(15) Borecka-Melkusova S., Moran GP., Sullivan DJ., Kuchariova S., Chorvat Jr D., Bujdakva H. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. *Mycoses* 2009; 52: 118-128.

(16) Khodavandi A., Alizadeh F., Aghai Vanda N., Karimi G., Chong, PP. Possible mechanisms of the antifungal activity of fluconazole in combination with terbinafin against *Candida albicans*. *Pharmaceutical Biology* 2014; 52: 1505-1509.

(17) Khodavandi A., Alizadeh F., Shahinipor M. Relative quantitation of hyphae-specific gene *HWP1* expression in inhibition of *Candida albicans* biofilm. *Journal of Microbial World* 2016; 9 (1): 22-33.

(18) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline-Second ed. CLSI M_{44}–A_2.

(19) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third ed. CLSI M_{27}–A_3.

(20) Giordani R., Regli P., Kaloustian J.,

Mikaïl C., Abou L., Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research* 2004; 18(12): 990-995.

(21) Duarte MCT., Figueira G., Sartoratto A., Delarmelina G. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 97(2): 305-311.

(22) Ghasemi Pirbalouti A., Bahmani M., Avijgan M. Anti-*Candida* activity of some of the Iranian medicinal plants. *Electronic Journal of Biology* 2009; 5(4): 85-88.

(23) Sharanappa R., Vidyasagar GM. Anti-*Candida* activity of medicinal plants. a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013; 5(4): 9-16.

(24) Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Goncalves MJ. Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55(Pt 10): 1367-1373.

(25) Sanglard D., Ischer F., Parkinson T., Falconer D., Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47(8): 2404-2412.

(26) Pam VK., Akpan JU., Oduyebo OO., Nwaokorie FO., Fowora MA., Oladele RO., et al. Fluconazole susceptibility and *ERG11* gene expression in vaginal *Candida* species isolated from lagos Nigeria. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* 2012; 3(1): 84-90.

(27) He X., Zhao M., Chen J., Wu R., Zhang J., Cui R., et al. Overexpression of both *ERG11* and *ABC2* genes might be responsible for itraconazole resistance in clinical isolates of *Candida krusei*. *Public Library of Science One* 2015; 10(8): e0136185.

(28) Teymuri M., Mamishi S., Pourakbari B., Mahmoudi S., Ashtiani MT., Sadeghi RH., et al. Investigation of *ERG11* gene expression among fluconazole-resistant *Candida albicans*: first report from an Iranian referral paediatric hospital. *British Journal of Biomedical Science* 2015; 72(1): 28-31.

(29) Xu Y., Sheng F., Zhao J., Chen L., Li C. *ERG11* mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Archives of Microbiology* 2015; 197(9): 1087-1093.

(30) Aslani P., Yadegari MH., Rajabi Bazl M. Investigation the effect of *Echinophora platyloba* and *Satureja bachtiarica* on *MDR1* and *ERG11* gene expression in fluconazole resistance clinical isolates *Candida albicans* using real time PCR. *European Journal of Experimental Biology* 2014; 4(1): 375-379.

(31) Mosavinejad SR. Investigation the effect *of Zataria multiflora* and *Dorma ammoniacum* on *MDR1* and *ERG11* gene expression in fluconazole resistance clinical isolates *Candida albicans.* [Dissertation]. Tehran: Aja University of Medical Sciences; 2014.

---

[1]- *Candida albicans*
[2]- Candidiasis
[3]- *Candida albicans*
[4]- *Lamiaceae*
[5]- *Thymus vulgaris*
[6]- *Mentha spicata*
[7]- Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
[8]- Sabouraud Dextrose Broth (SDB)
[9]- Viable count
[10]- Broth microdilution
[11]- Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[12]- Khodavandi
[13]- Aslani
[14]- *Echinophora platyloba*
[15]- *Satureja bachtiarica*
[16]- Mosavinejad
[17]- *Zataria multiflora*
[18]- *Dorma ammoniacum*