

Comparison of *ERG11* gene expression profiles of *Candida albicans* treated with *Thymus vulgaris* extracts alone and in combination with *Mentha spicata*

Alireza Khodavandi

Assistant professor of Microbiology, Department of Biology, Gachsaran Branch, Islamic Azad University, Gachsaran, Iran,
alireza_khodavandi@yahoo.com

Fahimeh Alizadeh*

Assistant professor of Microbiology, Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran, mnalizadeh@yahoo.com

Zeinab Abraheh

MS.c. of Microbiology, Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran, iauyasouj@gmail.com

Abstract

Introduction: Diseases caused by opportunistic pathogen *Candida albicans* are usually treated with antifungal drugs, but treatment failure is not uncommon especially in profoundly immunocompromised hosts. The aim of this study was to compare *erg* gene expression profiles of *Candida albicans* treated with *Thymus vulgaris* extracts alone and in combination with *Mentha spicata*.

Materials and methods: In this cross- sectional study, using volume based analyses we have conducted a gene expression profiling of *ERG11* gene in *C. albicans* treated with *Thymus vulgaris* extracts alone and in combination with *Mentha spicata*.

Results: Analysis of gene expression profiles revealed the decrease of *ERG11* in *C. albicans* treated with *Thymus vulgaris* extracts in combination with *Mentha spicata*. Incubation with *Thymus vulgaris* and *Mentha spicata* extracts alone, however, resulted in a decrease in *ERG11* RNA levels less than combination.

Discussion and conclusion: These data suggest a common mechanism to find the probable targets e.g., in response to ergosterol depletion in *C. albicans* treated with *Thymus vulgaris* extracts alone and in combination with *Mentha spicata*.

Key words: *Candida albicans*, *ERG11*, Gene expression

* Corresponding author

Received: December 10, 2016 / **Accepted:** May 20, 2017

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 *ERG11* کاندیدا آللیکانس تیمارشده با تیموس ولگاریس به تنهایی و در ترکیب با متا اسپیکاتا

علیرضا خداوندی: استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد گچساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گچساران، ایران، alireza_khodavandi@yahoo.com
فهیمة 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 آللیکانس* 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 آللیکانس تیمارشده با تیموس ولگاریس به تنهایی و در ترکیب با متا اسپیکاتا انجام شده است.

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

نتایج: نتایج تحلیل پروفیل بیان ژن *ERG11* در کاندیدا آللیکانس نشان دادند که تیموس ولگاریس در ترکیب با متا اسپیکاتا موجب کاهش بیان ژن شده است و تیمار کاندیدا آللیکانس با تیموس ولگاریس و متا اسپیکاتا به تنهایی 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 آللیکانس تیمارشده با تیموس ولگاریس به تنهایی و در ترکیب با متا اسپیکاتا هستند.

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

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

مخمر *کاندیدا آلیکانس*^۱ عفونت دوره‌ای کاندیدیازیس^۲ 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 آلیکانس^۳ عوامل بیماری‌زای بسیاری دارد؛ از جمله چسبندگی به سلول‌های اندوتلیال و اپی‌تلیال انسان، توانایی ترشح آنزیم‌های هیدرولیزکننده که بیشتر پروتئینازها و فسفولیپازها هستند، تغییر فنوتیپی و همچنین فرار از فاگوسیتوز شدن توسط سلول‌های ایمنی میزبان. علاوه بر این، از عوامل مهم بیماری‌زایی *کاندیدا آلیکانس* چندشکلی بودن با توانایی تغییر برگشت پذیر شکل‌های مخمری، ریشه حقیقی، ریشه کاذب و تشکیل بیوفیلم هستند. شکل ریشه‌ای و بیوفیلم *کاندیدا آلیکانس* 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؛ از جمله ژن‌های دخیل در سنتز ارگوسترول *کاندیدا آلیکانس*، *ERG1* 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 طولانی مدت، عوارض جانبی ندارند. خانواده نعنایان^۴ یکی از معروف‌ترین گیاهان طبیعی هستند که برای چای گیاهی، تونیک، ضد نفخ، ضد

سرفه، ضد عفونی‌کننده، ضد التهاب و درمان سرماخوردگی استفاده می‌شود. تیموس و لگاریس^۵ حاوی ترکیبات تیمول و دارای ویژگی‌های ضد میکروبی است. *منتا اسپیکاتا*^۶ دارای ترکیبات پلی‌فنی است و از این رو، ویژگی‌های 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 آلیکانس* تأثیر درخور توجهی دارد (۱۵).

در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن *ERG11* در *کاندیدا آلیکانس* تیمار شده با رقت‌های مختلف عصاره‌های آبی و متانولی تیموس و لگاریس و *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهان: گیاهان تیموس و لگاریس (آویشن باغی) و *منتا اسپیکاتا* (نعناع) در فصل بهار از فروشگاه‌های 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 گرمخانه‌گذاری شد. پس از سوکسیله کردن عصاره‌ها، از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شدند. برای استریل کردن عصاره‌ها از

موج ۵۳۰ نانومتر حدود 1×10^6 CFU/ml -۵ 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 به شکل کشت چمنی، ۳ بار به طور کامل با زاویه ۶۰ درجه و یکنواخت در سطح پلیت ۹ سانتی متری حاوی محیط کشت SDA تلقیح شد. سپس پلیت ها ۱۵ دقیقه زیر هود میکروبیولوژی قرار داده شدند تا مایع اضافی آنها جذب شود و به درون آگار نفوذ کند. سپس دیسک های خالی با حجم های مختلف (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) عصاره های استریل گیاهان تیموس ولگاریس و متا اسپیکاتا و نسبت مساوی از هر دو گیاه آغشته و پس از خشک شدن در فاصله ۲/۵ تا ۳ سانتی متر قرار داده شدند. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شدند و سپس، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک با خط کش میلی متری بررسی شد. در این آزمایش، از دیسک های حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمفوتریسین بی (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) برای شاهد مثبت و دیسک های خالی استریل برای شاهد منفی استفاده شد. آزمایش ها در دو تکرار سه تایی انجام شدند (۱۸).

آزمون حساسیت سنجی ضد کاندیدیایی به روش میکرودا یلوشن براث^{۱۰}: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا مطابق دستور عمل CLSI، سوسپانسیون تهیه شده 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 $10^3 \times 10^5 - 2/5$ سلول مخمر در میلی لیتر داشت که با روش ویبل کانت تأیید شد (۱۹).

میلی پور فیلتر (0.22 μ m durapore, Millipore) استفاده شد (۱۶).

ریز موجودات: ریز موجودات استفاده شده 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) جمع آوری شده بودند. نمونه ها با سواب از ترشحات مخاطی دهان و واژن ۴۰ بیمار جمع آوری و بی درنگ روی محیط کشت سابوراد دکستروز آگار^۷ حاوی کلرامفنیکل (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) کشت داده شدند. جدایه ها با توجه به شکل ظاهری کلنی (ماهواره ای کرم رنگ) روی محیط کشت SDA، مشاهده های 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 آللیکانس ATCC 10231 به عنوان منبعی برای کنترل کیفیت استفاده شد (۱۷).

آزمون حساسیت سنجی ضد کاندیدیایی به روش دیسک دیفیوژن: برای اطمینان از فاز لگاریتمی رشد، از جدایه های کاندیدا آللیکانس و سویه استاندارد دو بار کشت مجدد تهیه و سوسپانسیونی به کدورت معادل نیم مک فارلند $(1-5 \text{ CFU/ml}) \times 10^6$ در سرم فیزیولوژی تهیه شد. به طور خلاصه، تعداد ۵ کلنی به قطر تقریبی ۱ میلی متر به ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه، ورتکس و یک بار شسته شدند. تراکم سلول ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (UNICO 2150-UV, USA) در طول

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 سه تایی انجام شدند (۳ و ۱۴).

سنجش بیان ژن *ERG11* کاندیدا آلیکانس: برای سنجش میزان بیان ژن *ERG11* در کاندیدا آلیکانس، رقت‌های مختلف بر اساس نتیجه MIC از رقت‌های معادل دو برابر MIC، MIC و نصف MIC با $10^6 \times 1$ سلول در میلی‌لیتر کاندیدا آلیکانس مخلوط و ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سوسپانسیون تهیه‌شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و پلت سه بار با سرم فیزیولوژی شسته شد. استخراج RNA کل با کیت RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق دستورعمل شرکت سازنده و با اندکی تغییر انجام شد. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیّت آن با اسپکتروفتومتری و ژل آگارز بررسی و سپس کیفیت RNA استخراجی پس از سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده 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. آزمایش‌ها

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: کمترین رقت ممانعت‌کنندگی عصاره‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی (Brand 781660, Wertheim, Germany) تعیین شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت عصاره در محیط کشت 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 سوسپانسیون میکروبی و عصاره‌ها بسته و با پارافیلیم پوشانده شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در یخچال (برای یکسان‌سازی وضعیت چاهک‌ها)، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت 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 محیط کشت به ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت، 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

تصویر ژل آگارز کالیبره ثبت و میزان بیان ژن با نرم افزار Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad, USA, version 4.6) ارزیابی شد.

طرح مطالعه و تحلیل آماری: مطالعه حاضر به شکل طرح کاملاً تصادفی و آزمایش‌ها در دو تکرار سه تایی انجام شدند. نتایج مطالعه پس از نرمال کردن داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، با نرم افزار 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 حساسیت سنجی ضد کاندیدایی انتشار دیسک نشان دادند که در مقایسه با داروی ضد قارچی آمفوتریسین بی، عصاره‌های گیاهان تیموس و لگاریس و منتا/اسپیکاتا روی جدایه‌های بالینی و سویه استاندارد ATCC کاندیدا/آلیکانس مؤثر بوده‌اند. عصاره‌های مطالعه شده هاله ممانعت از رشدی ایجاد کردند که نشان داد حجم ۱۰۰ میکرولیتر دارای پتانسیل ضد قارچی بیشتری بوده است. در همه تیمارهای مطالعه شده، عصاره‌های آبی و متانولی تفاوت در خور توجهی نشان ندادند. نتایج، تأثیر بیشتر عصاره تیموس و لگاریس در ترکیب با منتا/اسپیکاتا علیه کاندیدا/آلیکانس را در مقایسه با عصاره‌های دیگر نشان دادند. همچنین، گیاه تیموس و لگاریس به تنهایی تأثیر ضد کاندیدایی بیشتری در مقایسه با منتا/اسپیکاتا داشت (جدول ۱). نتایج آزمون حساسیت سنجی ضد کاندیدایی میکروداپلوشن براث، نتایج آزمون انتشار دیسک را تأیید کردند؛ کمترین میزان رقت ممانعت از رشد (MIC) به عصاره تیموس و لگاریس در ترکیب با منتا/اسپیکاتا تعلق داشت (جدول ۲).

در دو تکرار سه تایی انجام شدند (۲ و ۶).

ژن ERG11 کاندیدا/آلیکانس با استفاده از پرایمر (F: 5'TTGGTGGTGGTAGACATA3' و R: 5'TCTGCTGGTTCAGTAGGT3') که خداوندی^{۱۲} و همکاران (۶) طراحی کرده‌اند از cDNA سنتز شده تکثیر شد. علاوه بر این، از ژن اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد. برای اطمینان از اینکه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ناشی از DNA ژنومی نباشند، برای هر نمونه شاهد منفی داخلی بدون آنزیم ترانس کریپتاز معکوس تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X Taq (Fermentas)، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار (Fermentas)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای بالادست و پایین دست (Bioneer, Korea)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمرز (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 ۹۴.۱ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ چرخه ۲ (۲۶X): مرحله ۹۴.۱ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله ۵۶.۲ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله ۷۲.۳ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه؛ چرخه ۳ (۱X): مرحله ۷۲.۱ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Techno, Germany) انجام شد. آزمایش‌ها در دو تکرار سه تایی انجام شدند (۲ و ۶).

مطابق روش خداوندی و همکاران (۱۷)، سنجش نسبی میزان بیان ژن مطالعه شده بر اساس حجم باندهای ایجاد شده در الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. با استفاده از تصویرساز ژل داک (Bio-Rad, USA)،

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 آلیکانس

عصاره‌های آزمایش شده/جدایه‌ها		حجم عصاره (میکرولیتر)	کاندیدا آلیکانس ATCC 10231	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴	جدایه ۵	جدایه ۶	جدایه ۷	جدایه ۸	جدایه ۹
ولگاریس تیموس	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±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 ...

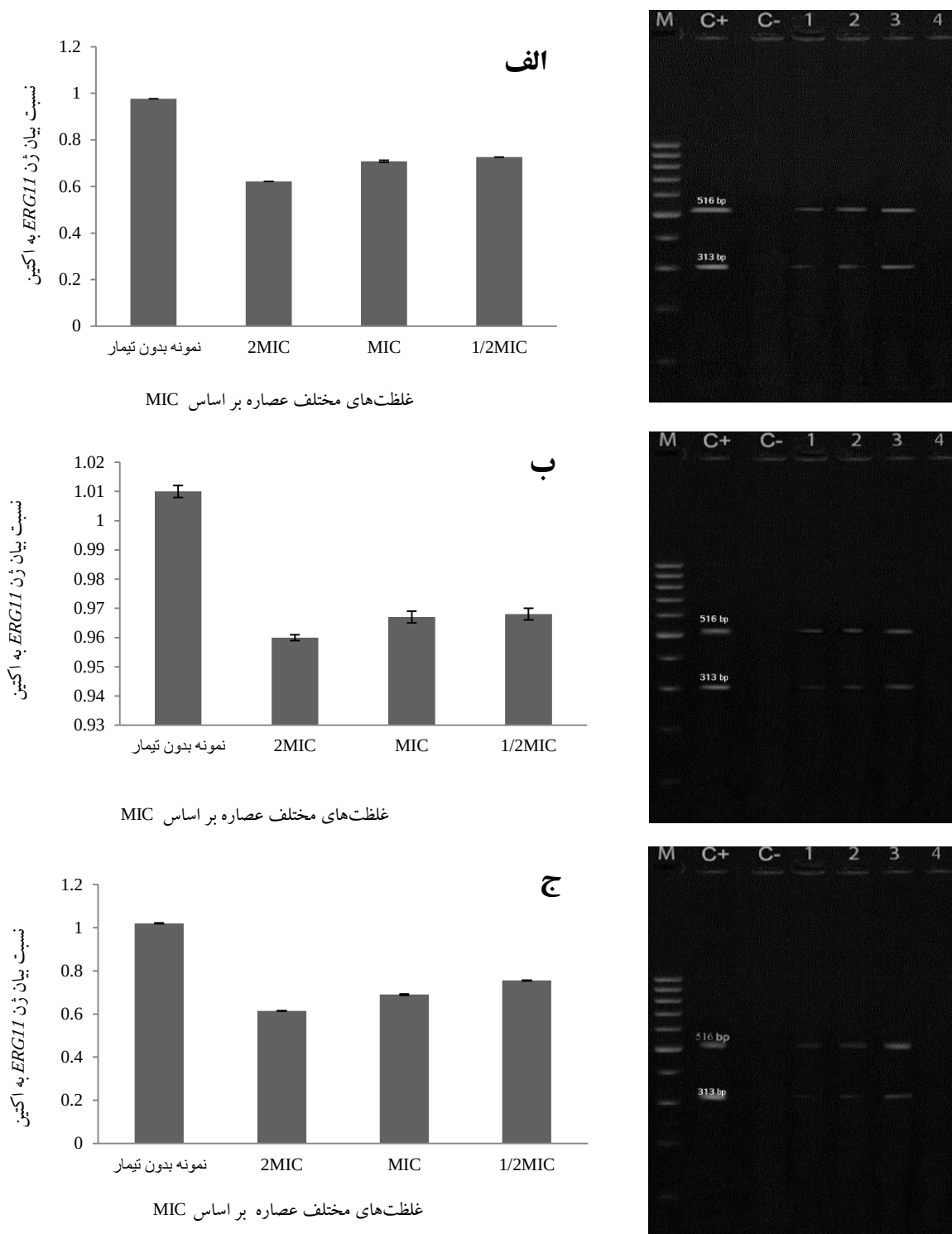
عصاره‌های آزمایش شده/جدایه‌ها																
	عصاره متاتولی				عصاره آبی				تیموس و لگاریس				+مشتا اسپیکاتا			
حجم عصاره (میکرولیتر)	۱۰۰	۵۰	۲۰	۱۰۰	۵۰	۲۰	۱۰۰	۵۰	۲۰	۱۰۰	۵۰	۲۰	۱۰۰	۵۰	۲۰	۱۰۰
کاندیدا آلیکانس ATCC 10231	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
جدایه ۱	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
جدایه ۲	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
جدایه ۳	۶/۷۰±۰/۳۶	۶/۷۰±۰/۳۴	۶/۷۰±۰/۲۶	۷/۸۰±۰/۳۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۶/۹۰±۰/۲۶	۶/۵۰±۰/۰۰	۶/۹۰±۰/۲۶	۶/۸۰±۰/۱۷	۶/۵۰±۰/۰۰	۶/۸۰±۰/۱۷	۶/۸۰±۰/۲۶	۶/۵۰±۰/۰۰	۶/۸۰±۰/۱۷	۶/۵۰±۰/۰۰
جدایه ۴	۷±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۱۰±۰/۴۳	۹/۲۰±۱/۰۴	۸/۵۰±۰/۴۵	۹/۲۰±۰/۳۶	۸/۹۰±۰/۳۶	۹/۲۰±۰/۳۶	۸±۰/۳۶	۸/۹۰±۰/۳۶	۸±۰/۳۶	۸±۰/۳۶	۸/۹۰±۰/۳۶	۸±۰/۳۶	۸±۰/۳۶
جدایه ۵	۷/۵۰±۰/۳۶	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۴۰	۷/۳۰±۰/۳۶	۷±۰/۰۰	۹/۵۰±۰/۰۰	۹/۵۰±۰/۰۰	۹/۵۰±۰/۰۰	۸/۲۰±۰/۳۰	۹±۰/۳۰	۹±۰/۳۰	۸/۲۰±۰/۳۰	۹±۰/۳۰	۸/۲۰±۰/۳۰	۸/۲۰±۰/۳۰
جدایه ۶	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۸±۰/۳۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷±۰/۰۰
جدایه ۷	۸/۱۰±۰/۱۷	۷/۳۰±۰/۳۴	۶/۶۰±۰/۵۲	۶/۵۰±۰/۰۰	۶/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۱۰/۶۰±۰/۳۴	۹/۶۰±۰/۱۷	۹/۶۰±۰/۱۷	۷/۸۰±۰/۲۶	۹/۶۰±۰/۱۷	۹/۶۰±۰/۱۷	۷/۸۰±۰/۲۶	۹/۶۰±۰/۱۷	۷/۸۰±۰/۲۶	۷/۸۰±۰/۲۶
جدایه ۸	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۶/۸۰±۰/۲۶	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰
جدایه ۹	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۹±۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۴۳	۹±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۴۳	۸/۵۰±۰/۴۳	۷/۵۰±۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۴۳	۷/۵۰±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰

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

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	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
متا اسپیکاتا	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 + متا اسپیکاتا	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 آلبیکانسن شاهد و تیمار شده 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 آلبیکانسن تیمار شده با عصاره تیموس ولگاریس، متا اسپیکاتا به‌تنهایی و در ترکیب با هم کاهش نشان داده است.



شکل ۱- مقدار نسبی بیان ژن *ERG11* در کاندیدا/آلیکانس تیمار شده با رقت‌های مختلف بر اساس MIC. عصاره: الف. تیموس ولگاریس، ب. متنا اسپیکاتا، ج. ترکیب تیموس ولگاریس با متنا اسپیکاتا پس از ۲۴ ساعت همراه با نتایج بیان ژن *ERG11* کاندیدا/آلیکانس تیمار شده با رقت‌های مختلف عصاره‌های مطالعه شده 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 ژن‌های دخیل در بیوسنتز ارگوسترول غشای سلولی قارچ، ارزیابی شد.

نتایج مطالعه حاضر، تأثیر عصاره‌های اندام‌های هوایی گیاهان تیموس ولگاریس و *منتا اسپیکاتا* را علیه *کاندیدا آلبیکانس* نشان دادند و با مطالعه‌های پیشین هم‌خوانی داشتند (۱۷ و 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 فرآورده‌های غشایی سلول مخمر و همچنین مسئول حفظ عملکرد و یکپارچگی سلول است. مکانیسم اولیه عملکرد برخی داروهای ضد قارچی از جمله 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* تیمار شده با عصاره تیموس ولگاریس، *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم کاهش یافت. *ERG11* تولید لانوسترول ۱۴- α دمیلاز را کدگذاری می‌کند و بیان بیشتر *ERG11* موجب تولید مقدار زیادی آنزیم لانوسترول ۱۴- α دمیلاز 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

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 بیوستتر ارگوسترول غشای سلولی کاندیدا/آلبیکانوس 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 متا/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.

سلولی شده است (۲۷-۲۹).

اصلانی^۳ و همکاران (۳۰)، تأثیر ضد میکروبی *اکینوفورا پلتنی‌لویا*^۴ (خوشاریزه) و *ساتورجا بختیاریکا*^۵ (مرزه بختیاری) را در مهار رشد جدایه‌های بالینی مقاوم به فلوکونازول کاندیدا/آلبیکانوس با ارزیابی میزان بیان ژن‌های *ERG11* و *MDR1* سنجیدند. نتایج نشان دادند که *اکینوفورا پلتنی‌لویا* موجب کاهش بیان *ERG11* شد در حالی که گیاه *ساتورجا بختیاریکا* روی بیان ژن *ERG11* تأثیری نداشت.

نتایج مطالعه‌های خداوندی و همکاران (۱۶)، کاهش بیان ژن‌های *ERG1, 3, 11* کاندیدا/آلبیکانوس تیمار شده با ترکیب فلوکونازول و ترینافین 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^۶، تأثیر ضد کاندیدیایی گیاهان آویشن شیرازی^۷ و وشا^۸ 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/آلبیکانوس به ترتیب ۲۵۶ و ۶۴ میلی گرم در میلی لیتر و MFC عصاره الکلی آویشن شیرازی و وشا در جدایه‌های بالینی کاندیدا/آلبیکانوس به ترتیب ۵۱۲ و ۱۲۸ میلی گرم در میلی لیتر 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،

- (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 Mycology* 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., Bhattacharjee 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 M₄₄-A₂.
- (19) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third ed. CLSI M₂₇-A₃.
- (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*