تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

ارزیابی فعالیت ضد قارچی اسانس کارواکرول بر سویه های استاندارد کاندیدا آلبیکنس حساس و مقاوم به فلوکونازول

سیده صدیقه حسینی
کارشناس ارشد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

شهلارودبارمحمدی
استادیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

حمیدرضاجوشقانی
دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان ،دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: سیده صدیقه حسینی

تلفن 3324002: -0171

پست الکترونیک: hoseini_se@yahoo.com

آدرس : : تهران ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس گروه قارچ شناسی پزشکی

وصول مقاله: 90/5/16
اصلاح نهایی: 90/11/17
پذیرش مقاله:90/11/30

چکیده

زمینه و هدف *: کاندیدا آلبیکنس یک قارچ فرصت طلب انسانی است که عامل عفونتهای مخاطی و سیتمیک در افراد با نقص سیستم ایمنی است و در سالیان اخیر افزایش مقاومت به عوامل ضد قارچی درآن دیده شده است ، لذا تحقیق برای یافتن داروهای ضد قارچی با ترکیب جدید ضروری می باشد. برخی از گیاهان به دلیل دارا بودن پلی فنلها دارای خواص ضدمیکروبی هستند. در این تحقیق اثر ضد قارچی اسانس کارواکرول که ترکیب اصلی اسانس روغنی حاصل از آویشن می باشد، بر روی دو سویه های حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس بررسی شد.*

روش بررسی: *اثر مهاری اسانس کارواکرول بر روی سویه های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش بررسی قطر هاله مهارکنندگی و حداقل غلظت مهارکنندگی با روش رقت سازی در محیط کشت مایع انجام شد. برای این منظور رقت های متوالی از اسانس کارواکرول در میکروپلیت های 96 خانه ایی تهیه و 10 میکرولیتر از سوسپانسون قارچی به آن اضافه شد. کدورت ایجاد شده در چاهک ها بعد از اتوگذاری با الیزا ریدر بررسی و کمترین غلظتی که از رشد ممانعت می نمود ثبت گردید. با کشت 10 میکرولیتر از چاهک های فاقد کدروت در محیط سابورو دکستروز آگار حداقل غلظت کشنده(MFC) اسانس و داروی فلوکونازول تعیین شد.*

یافته‌ها*: حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس کارواکرول در سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس به ترتیب 5/3 و6/18 میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن ها 10/61و12/3 میکروگرم بر میلی لیتر بود. بالاترین قطر هاله مهاری در این دو سویه در حضور اسانس کارواکرول به ترتیب 45 و 35 میلی متر برای سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول تعیین شد.*

نتیجه گیری *: در این بررسی اسانس کارواکرول اثر ضد قارچی مناسبی علیه سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس از خود نشان داد. بررسی احتمال کاربرد این اسانس در درمان عفونت کاندیدائی نیاز به انجام مطالعات تکمیلی دارد.*

واژه های کلیدی *:اثر ضد قارچی ، کارواکرول، کاندیداآلبیکنس، فلوکونازول*

آدرس مقاله:
حسینی س ص، رودبارمحمدی ش، جوشقانی ح ر." ارزیابی فعالیت ضد قارچی اسانس کارواکرول بر سویه های استاندارد کاندیدا آلبیکنس حساس و مقاوم به فلوکونازول ". مجله علوم آزمایشگاهی پاییز و زمستان ، 1390دوره پنجم(شماره2) :33-28

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

جنس کاندیدا شامل یک گروه هتروژن از ارگانیسم ها است که به صورت مخمری رشد کرده و اکثر اعضای این جنس در طول مدت رشد خود رشته کاذب تولید می کنند، اما کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینسیس فرم حقیقی هیف و دیواره و سلولهایی با دیواره ضخیم به نام کلامیدوسپور تولید می نمایند که هر دوی این حالات از نظر آزمایشگاهی قابل تشخیص است(1).

عفونت های سیستمیک ناشی از گونه های کاندیدا طی چهار دهه اخیر به علت افزایش بیماری های سرکوب کننده سیستم ایمنی نظیر ایدز و انواع بدخیمی های خونی و مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها و کورتیکواستروئیدها به عنوان عامل مهم مرگ و میر به خصوص برای بیماران بستری در بیمارستانها مطرح است(4-2).

امروزه شکست های زیادی در درمان مبتلایان به اشکال بالینی کاندیدیازیس گزارش شده است. داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون های متفاوت برای درمان در دسترس است اما در بسیاری از موارد به دلیل بی پاسخی نسبت به درمان، بیماری به اشکال مزمن یا حاد تبدیل شده و گاهی عودهای مکرر دیده می شود. همچنین نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضد قارچی که خود منجر به بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آن ها می شود، محدودیت هایی را در استفاده از این قبیل ترکیبات ضد قارچی به وجود آورده است(6و5). از آنجایی که عفونتهای قارچی و سیستمیک عمدتا به وسیله مخمرهای مقاوم به داروهای ضد قارچی نظیر فلوکونازول و ایتراکونازول ایجاد می شود، لذا بررسی و مطالعه در زمینه یافتن عصاره های گیاهی با خواص ضد میکروبی بالا و حداقل اثرات جانبی روی میزبان و خالص سازی مواد موثره آنها ، می تواند راهگشای درمان بسیاری از عفونتهای قارچی مقاوم به داروهای ضد قارچی سنتتیک گردد (8-7). از این رو امروزه محققین به سمت داروهای گیاهی رو آورده اند که ضمن دارا بودن اثرات مفید، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی هستند. خاصیت دارویی گیاهان و عصاره های به دست آمده از آن ها در درمان بیماری های قارچی شناخته شده است و ترجیح استفاده از آن ها به دلیل میزان مصرف کمتر و کسب نتیجه مطلوب تر آز آن هاست.

کارواکرول ترکیب اصلی اسانس روغنی حاصل از آویشن، دارای خاصیت ضد میکروبی است. مکانیسم اثر ضد میکروبی اسانس های روغنی در اثر واکنش آنها با غشاء سلول میکروارگانیسم و تغییر در نفوذپذیری ترکیباتی چون پتاسیم و هیدروژن می باشد. کارواکرول ایزومر تیمول بوده و بویی شبیه به تیمول دارد. این ماده یک عصاره گیاهی خوراکی است که در آب نامحلول بوده ولی در الکل و اتر حل می شود. این ماده در ساختار روغن های خوراکی گیاهی مثل روغن Origanum و برخی روغن های گیاهی که به عنوان چاشنی غذا مورد استفاده قرار می گیرند، وجود دارد(9و10) کارواکرول دارای طیف وسیعی از اثرات ضد میکروبی است. این ماده باعث مهار فعالیت ATPase و افزایش نفوذپذیری غیر اختصاصی غشای سلول قارچی می شود و نه تنها خود باعث مهار جمعیت میکروبی می شود بلکه با افزایش نفوذپذیری غشاء قارچ ها، آنها را نسبت به سایر مواد ضد قارچی حساس و آسیب پذیر می نماید(11) ، Gill در مطالعه خود چنین اثری را بر غشا سلولی باکتریها مشاهده نمود، در مطالعه وی مشخص شد که اسانس کارواکرول باعث افزایش نفوذ پذیری و تخریب غشا سلولی باکتری و مهار فعالیت ATPase آن می شود (12). Nostro و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که کارواکرول بر روی استافیلوکوک های حساس به متی سیلین و استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین اثر مهارکنندگی دارد(10).

کارواکرول همچنین دارای اثرات ضد التهابی و ضد دردی است(13)، کارواکرول قابلیت مهار آنزیم الاستاز نوتروفیلی و همچنین مهار تولید پروستا گلندین E_2, F_1, F_2 را داشته و بدین ترتیب علاوه بر خواص ضد میکروبی قابلیت مهار التهاب و تخفیف پروسه های تخریبی ناشی از آن را دارد(14). هدف از

www.SID.ir

انجام این مطالعه *In vitro* بررسی اثر کارواکرول بر سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول قارچ کاندیدا آلبیکنس می باشد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال 1389 به منظور تعیین حساسیت کاندیداآلبیکنس حساس و مقاوم به فلوکونازول نسبت به اسانس کارواکرول (sigma- 282197) و داروی فلوکونازول (sigma-F8929) به منظور اثبات خاصیت ضد قارچی اسانس کارواکرول انجام شد.

1- تهیه سوسپانسیون سلولهای مخمری

ابتدا قارچ کاندیدا آلبیکنس استاندارد سویه حساسATCC10231 از بخش قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و سویه مقاوم به فلوکونازول ATCC76615 ازمرکز دارویی دانشگاه ارتش شانگهای چین تهیه شده را بر روی محیط سابرودکستروز آگار (SDA)حاوی کلرامفیکل کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 37درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون و رشد مخمرهای کاندیدا، از آن دو سویه سوسپانسیون سلولی تهیه شد.

بدین ترتیب که ابتدا در یک میکروتیوب یک و نیم میلی لیتری مقدار 1000 میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) PH= 7/2 استریل ریخته شد، سپس با آنس استریل شده مقدار کمی از کلنی های رشد یافته روی محیط SDA در PBS مخلوط شد. پس از مخلوط شدن مخمرها در بافر، با استفاده از لام نئوبار سوسپانسیونی معادل 1×10^6سلول در هر میلی لیتر تهیه شد(15)

2- تعیین حساسیت کاندیدا آلبیکنس نسبت به اسانس گیاهی و فلوکونازول به روش دیسک گذاری در آگار

برای بررسی حساسیت قارچ نسبت به فلوکونازول و اسانس کارواکرول ، ابتدا سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس در محیط کشت SDA به روش پورپلیت کشت داده شد. در این روش پس از آماده سازی پلیت های محتوی محیط کشت با دمای 45 درجه سانتی گراد، مقدار 500 میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده با تراکم 1×10^6سلول در هر میلی لیتر به پلیت های مذکور تلقیح شد. بعد از گذشت 20 دقیقه، دیسک های آغشته به غلظت های مختلف اسانس کارواکرول (رقیق سازی سریال، از غلظت 100 تا 125 میکرولیتر) به همراه دیسک های فلوکونازول 25 میکروگرمی روی پلیت های محتوی SDA قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان 24 ساعت انکوباسیون قطر هاله عدم رشد در مقایسه با شاهد (دیسک فاقد اسانس) اندازه گیری شد.

3- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) با استفاده از روش میکروبراث دایلوشن:

در این آزمایش از میکروپلیت 96 خانه ایی استفاده شد. ابتدا درون چاهکها 200 میکرولیتر محیط کشت سابرو دکستروز براث ریخته شد. غلظت های متوالی از اسانس کارواکرول در محلول 10% دی متیل سولفوکساید(DMSO) تهیه شد و مقدار10 میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد ، بطوریکه غلظت نهائی عصاره در چاهک ها از 256 تا 0/03 میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. سپس 10 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی از هر کدام از سویه های کاندیدا با تراکم 1×10^6سلول در هر میلی لیتر به آن اضافه گردید. این آزمون به صورت سه بار تکرار انجام شد. پلیت 96 خانه ای در انکوباتور شیکردار 37 درجه سانتیگراد با سرعت 150 دور در دقیقه به مدت 24 ساعت گذاشته شد. پس از طی زمان انکوباسیون میزان رشد کاندیدا بر اساس تعیین کدورت چاهک ها با استفاده ازالایزا ریدر ارزیابی شد. پائین ترین غلظت جلوگیری کننده از رشد مخمر به عنوان MIC اسانس و فلوکونازول در نظر گرفته شد.

4- تعیین کمترین غلظت کشندگی قارچ (MFC):

از محتویات چاهک های مختلف که حاوی غلظت های کمتر اسانس بوده و رشد کاندیدا در آن مشاهده نشده بود، به میزان 10 میکروگرم به محیط SDA حاوی کلرامفنیکل برده شد و کمترین غلظتی از اسانس که فاقد رشد کاندیدا آلبیکنس روی محیط کشت SDA بود به عنوان MFC اسانس و فلوکونازول در نظر گرفته شد.تمام آزمایش ها سه بار تکرار گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها

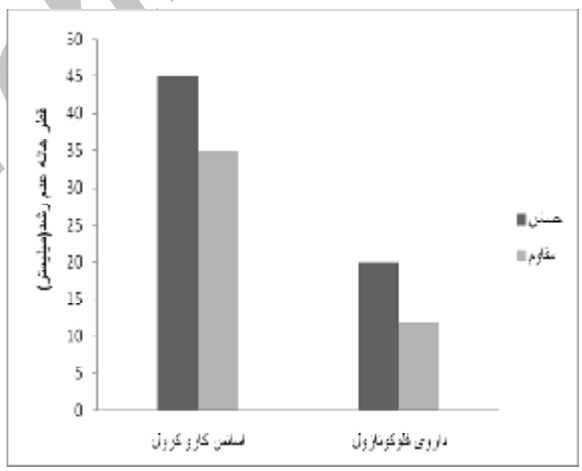
نتایج به دست آمده از بررسی MIC اسانس کارواکرول نشان داد که MIC اسانس کارواکرول برای کاندیدا آلبیکنس حساس 5/3 و برای سویه مقاوم 6/18 میکروگرم در میلی لیتر بوده است. میزان MFC سویه حساس 10/61 و سویه مقاوم 12/3 میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید(جدول 1).

جدول 1: حداقل غلظت مهار کننده و کشنده اسانس کارواکرول و فلوکونازول بر سویه های حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس

مقاومت سویه به فلوکونازول	ماده مهار کننده	محدوده MIC مورد آزمون	میزان MIC	میزان MFC
حساس	اسانس کارواکرول	0.03-292	5.3	10.61
	فلوکونازول	0.06-256	0.5	1
مقاوم	اسانس کارواکرول	0.03-292	6.18	12.3
	فلوکونازول	0.06-256	64	128

نتایج اندازه گیری قطر هاله مهاری نیز نشان داد که قطر هاله مهاری فلوکونازول و اسانس کارواکرول در سویه حساس به ترتیب 20و45 میلی مترو برای سویه مقاوم 12 و 35 میلی متر است. (نمودار1).

تجزیه و تحلیل داده ها به روش T test نشان داد که اثر اسانس کارواکرول بر سویه حساس به فلوکونازول به طور معنی داری بیش از اثر آن بر سویه مقاوم به فلوکونازول می باشد (P<0/05).



نمودار1- قطر هاله عدم رشد سویه ها حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس در حضور غلظت 30 میکروگرم اسانس کاراکرول و 25 میکروگرم فلوکونازول

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در تحقیق حاضر تعداد کلنی های شمارش شده در محیط آگار در حضور اسانس کارواکرول به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق اثرات ضد کاندیدایی این اسانس مثبت ارزیابی شد. در طی مقایسه کیفی بین اثرات ضد کاندیدایی این اسانس با داروی فلوکونازول مشخص شد که اسانس کارواکرول دارای اثرات ضدکاندیدایی قوی تری می باشد.

در مطالعه Kamedem و همکاران اثر کاواکرول بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت. این محققین مشاهده کردند که این ماده در دمای 37 درجه سانتی گراد تاثیری بر روی این باکتری نداشت در حالی که در دمای 55 درجه سانتی گراد نسبت به گروه کنترل تاثیرگذار بود(16).

در مطالعه Obaidat و همکاران اثر کارواکرول و تتراسیکلین بر روی کاندیدا آلبیکنس و پنج سوش باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که دیسکهای حاوی µg 40 کارواکرول تاثیر بسیار خوبی بر روی کاندیدا آلبیکنس دارد در حالیکه در همین غلظت هیچ تاثیری بر روی *سودوموناس ائروژینوزا* نداشت. همچنین با وجود اینکه تتراسیکلین به تنهایی اثری بر روی *سودوموناس ائروژینوزا* نداشت اما مصرف هم زمان کارواکرول و تتراسیکلین تاثیر بسیار زیادی بر روی *سودوموناس ائروژینوزا* داشت که بیانگر اثر هم افزایی این دو ماده می باشد (17). در گزارش Lu و Wu که اثر کارواکرول را با تیمول بر روی *سالمونلا انتریکا* مقایسه کرده بودند مشخص شد که تیمول تاثیر بیشتری بر روی *سالمونلا* دارد (18).

در مطالعه Vardar-Unlu و همکاران که اثر *in vitro* کارواکرول را بروی کاندیدا آلبیکنس بررسی کرده بودند، MIC 50 و 90 به ترتیب 0/064 و 0/125 میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد که البته با نتایج حاصل از این تحقیق تفاوت داشتند (19).

در مطالعه احمد و همکاران اثر کارواکرول و تیمول بر کاندیدا آلبیکنس با یکدیگر مقایسه شد. این محققین گزارش کرده اند که هر دو ماده بر روی تمام نمونه ها اثر داشته اند (20).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، اسانس کارواکرول بر روی سویه حساس کاندیداآلبیکنس قدرت بازدارندگی بالاتری در مقایسه با سویه مقاوم به فلوکونازول کاندیداآلبیکنس نشان داد.استفاده گسترده از داروهای ضد قارچی به ویژه ترکیبات آزول در درمان کاندیدیازیس حاد منجر به مقاومت در سویه های کاندیدا شده است. با توجه به همخوانی نتایج دیسک گذاری و MIC مبنی بر اثر ضد قارچی اسانس فوق بر روی رشد سویه های کاندیدا آلبیکنس این اسانس می تواند به عنوان منبع ضد قارچی در کنترل کاندیدیازیس مورد مطالعه و بررسی بیشتر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. از آقایان محمد رضا کیایی و مسعود بازوری کارشناسان محترم گروه علوم آزمایشگاهی و میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی گلستان که در انجام مطالعه همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Ajello L, Hay JR. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Vol.4, Medical Micrpbiology, 9th edition, Oxford University Press, Inc. 1998: 275-69.

2. Al-Fattani MA, Douglas LJ. *Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: chemical composition and role in drug resistance*. J Med Microbiol. 2006; 55(Pt 8): 999-1008.

3. Patterson T. *Treatment and prevention of fungal* infections. *Focus on Candidemia*. New York: Applied Clinical Education. 2007; 23: 7-80.

4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. T*he epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med. 2003; 348(16): 1546-54

5. Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Molecular heterogenesity of fluconazole resistant and susceptible oral Candida albicans isolates within a single geographic locale.* APMIS. 2002; 110: 315-24.

6. Morshhauser J. *The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans*. Biochemica, Biophisica Acta. 2002; 1587: 240-8.

7. Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. *New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage.* Clin Infect Dis. 2006; 43(8):1060-8

8. Pyun MS, Shin S. *Antifungal effects of the volatile oils from Allium plants against Trichophyton species and synergism of the oils with ketoconazole*. Phytomedicine. 2006; 13(6):394-400.

9. Braga PC, Alfieri M, Culici M, Dal Sasso M. *Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of Candida albicans hyphae*. Mycoses.2007; 50:502–506

10. Nostro A, Balanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morellia I, et al. *Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, Carvacrol and Thymol*. FEMS Microbiol lett 2004; 230:191-5

11. Helander I, Alokomi H, Latvakal K, Sandholm M. *Characterization of the action of essential oil components on Gram negative bacteria*. J agriculture and Food Chemistry. 1998; 46: 3590-95

12. Gill A ,Holley RA. *Distruption of Echerichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membrane by plant oil aromatics*. Int Food Microbial. 2006; 108(1):1-9.

13. Amanlou M, Dadkhah F, Salehnia M, Dephpour A. *Anti inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcholic extract of saturja khouzistanica Jamzad extract*. J pharm pharm SCi. 2005;8:102-6.

14. Wanger H, Weiver M, Bauer R. *In vitro inhibition of prostaglandin biosynthesis by essential oils and phenolic compounds*. Planta Medica. 1986; 52(3): 184-187.

15. Furletti V, Teixeira I, Obando-Pereda G, Mardegan R. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 17(8): 903-909.

16. Kamdem SS, Belletti N, Magnani R, Lanciotti R, Gardini F. *Effects of Carvacrol, (E)-2-hexenal, and Citral on the Thermal Death Kinetics of Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 2011 ;74(12):2070-8.

17. Obaidat RM, Bader A, Al-Rajab W, Abu Sheikha G, Obaidat AA. *Preparation of mucoadhesive oral patches containing tetracycline hydrochloride and carvacrol for treatment of local mouth bacterial infections and candidiasis*. Sci Pharm. 2011 ;79(1):197-212.

18. Lu Y, Wu C. *Reduction of Salmonella enterica contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment*. J Food Prot. 2010; 73(12):2270-5.

19. Vardar-Unlu G, Yağmuroğlu A, Unlu M. *Evaluation of in vitro activity of carvacrol against Candida albicans strains*. Nat Prod Res. 2010; 24(12):1189-93.

20. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. *Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30(1):41-50

Archive of SID

www.SID.ir