

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 تیمار شده با تیموس و لگاریس به تنهایی و در ترکیب با منتا 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، هر چند شکست درمان به‌ویژه در میزبان دچار نقص ایمنی شدید محتمل است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه میزان بیان ژن *ERG11* کاندیدا آللیکانس تیمار شده با تیموس و لگاریس به تنهایی و در ترکیب با منتا اسپیکاتا انجام شده است.

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

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

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

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

سرفه، ضد عفونی کننده، 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 پلی‌فنلی است و از این رو، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی 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 الک شده (الک شماره ۸۰) اندام‌های مختلف گیاهان مطالعه شده 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

مخمر *کاندیدا آلیکانس*^۱ عفونت دوره‌ای *کاندیدایزیس*^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 بیوفلم هستند. شکل ریشه‌ای و بیوفلم *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 *ERG1* در سنتز ارگوسترول *کاندیدا آلیکانس*، *ERG11* و *ERG25-27* هستند و ژن‌های دیگری مانند *CYB5* و *NCPI* آنزیم‌های سیتوکروم را سنتز می‌کنند (۸).

ثابت شده است که مواد مشتق شده از گیاهان دارویی حتی پس از استفاده طولانی مدت، عوارض جانبی ندارند. خانواده نعناعیان^۴ یکی از معروف‌ترین گیاهان طبیعی هستند که برای چای گیاهی، تونیک، ضد نفخ، ضد

موج ۵۳۰ نانومتر حدود $10^6 \times 10^1 \text{ CFU/ml}$ 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 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 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 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. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و سپس، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک با خط کش میلی متری بررسی شد. در این آزمایش، از دیسک‌های حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمفوتریسین بی (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) برای شاهد مثبت و دیسک‌های خالی استریل برای شاهد منفی استفاده شد. آزمایش‌ها 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 $10^3 \times 2/5 - 0/5$ سلول مخمر در میلی لیتر داشت که با روش ویبل کانت تأیید شد (۱۹).

میلی پور فیلتر (0.22 μm 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. نمونه‌ها 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. جدایه‌ها با توجه به شکل ظاهری کلنی (ماهواره‌ای کرم رنگ) 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 آلبيکانس 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 جدایه‌های کاندیدا آلبيکانس و سویه استاندارد دو بار کشت مجدد تهیه و سوسپانسیونی به کدورت معادل نیم مک فارلند $10^6 \times (1-5 \text{ CFU/ml})$ 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 سلول‌ها 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 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 $10^6 \times 1$ سلول در میلی‌لیتر کاندیدا آلبیکانس مخلوط و ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سوسپانسیون تهیه شده 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 کمی 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 مطالعه شده 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 پارافilm 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 کاندیدیایی 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 آللیکانس 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 آللیکانس را در مقایسه با عصاره‌های دیگر نشان دادند. همچنین، گیاه تیموس و لگاریس به تنهایی تأثیر ضد کاندیدیایی بیشتری در مقایسه با منتا اسپیکاتا داشت (جدول ۱). نتایج آزمون حساسیت سنجی ضد کاندیدیایی میکرودا بلوشن 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 آللیکانس با استفاده از پرایمر (F: 5'TTGGTGGTGGTAGACATA3' 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 زئومی نباشند، برای هر نمونه شاهد منفی داخلی بدون آنزیم ترانس کریپتاز معکوس تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۵ میکرولیتر بافر 10X 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 (1X): مرحله ۹۴.۱ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ چرخه ۲ (۲۶X): مرحله ۹۴.۱ 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 (1X): 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 کاندیدایابی به روش دیسک دیفیوژن (میلی‌متر) عصاره‌های آبی و متانولی اندام هوایی گیاهان تیموس ولگاریس و منتا اسپیکاتا به تنهایی و در ترکیب با هم علیه کاندیدا آلیکانس

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

ادامه جدول ۱- نتایج آزمون حساسیت سنجی ضد کاندیدیایی به روش دیسک دیفیوژن (میلی متر) عصاره های آبی و متانولی اندام هوایی ...

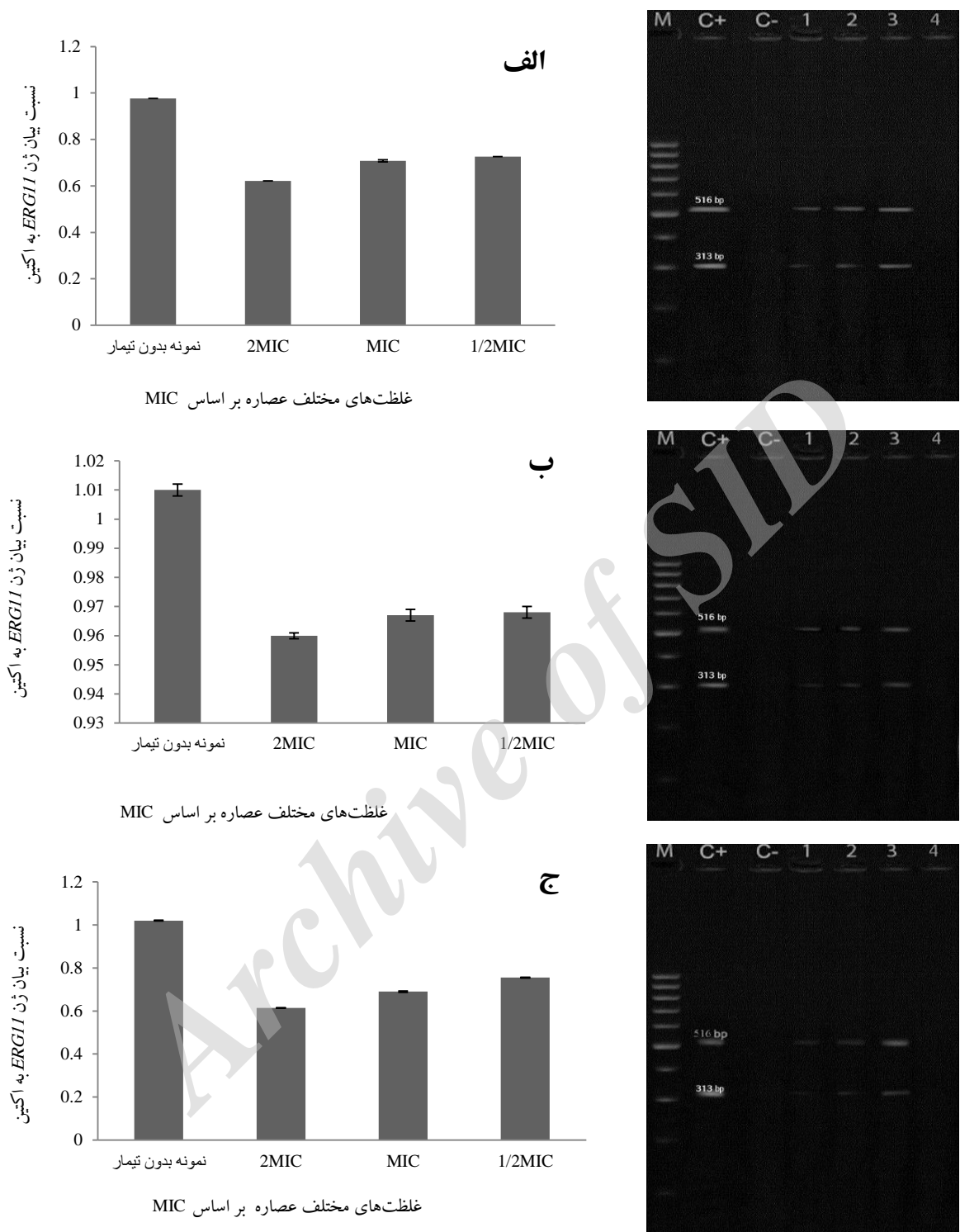
جدایه ۹	جدایه ۸	جدایه ۷	جدایه ۶	جدایه ۵	جدایه ۴	جدایه ۳	جدایه ۲	جدایه ۱	کاندیدا آلیکانس ATCC 10231	حجم عصاره (میکرو لیتر)	عصاره های آزمایش شده/جدایه ها	
											عصاره متانولی	عصاره آبی
۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۸۱±۰/۱۷	۶±۰/۰۰	۷۱۵±۰/۳۶	۷±۰/۰۰	۶۱۷±۰/۳۶	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۱۰۰	عصاره آبی	تیموس و لگاریس
۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷۳±۰/۳۴	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۶۱۷±۰/۳۴	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۵۰	متا اسپیکاتا + متا اسپیکاتا	متا اسپیکاتا
۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶۱۶±۰/۵۲	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶۱۲±۰/۲۶	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۲۰	عصاره آبی	تیموس و لگاریس
۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۶/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۴۰	۱۰±۰/۴۳	۷/۸۰±۰/۳۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۱۰۰	عصاره متانولی	تیموس و لگاریس
۶±۰/۰۰	۶/۸۰±۰/۲۶	۶/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷/۳۰±۰/۳۶	۹/۲۰±۰/۰۴	۷/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۵۰	عصاره متانولی	تیموس و لگاریس
۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۴۵	۷/۵۰±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۲۰	عصاره متانولی	تیموس و لگاریس
۹±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۱۰/۶۰±۰/۳۴	۸±۰/۳۰	۹/۵۰±۰/۰۰	۹/۲۰±۰/۳۶	۶/۹۰±۰/۲۶	۸±۰/۲۰	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۱۰۰	عصاره متانولی	تیموس و لگاریس
۸/۵۰±۰/۴۳	۶±۰/۰۰	۹/۶۰±۰/۱۷	۷/۵۰±۰/۰۰	۹±۰/۳۰	۸/۹۰±۰/۳۶	۶/۵۰±۰/۴۳	۷/۷۰±۰/۲۶	۶±۰/۰۰	۷/۵۰±۰/۰۰	۵۰	عصاره متانولی	تیموس و لگاریس
۷/۵۰±۰/۴۰	۶±۰/۰۰	۷/۸۰±۰/۲۶	۷±۰/۰۰	۸/۲۰±۰/۳۰	۸±۰/۳۶	۶/۱۰±۰/۱۷	۷±۰/۰۰	۶±۰/۰۰	۷±۰/۰۰	۲۰	عصاره متانولی	تیموس و لگاریس
۲۳/۳۱±۰/۱۱	۲۳/۸۱±۰/۴۱	۲۳/۶۱±۰/۰۰	۲۲/۱۱±۰/۰۰	۲۲/۱۱±۰/۰۰	۲۲/۱۱±۰/۱۱	۲۳/۱۰±۰/۵۵	۲۲/۰۲±۰/۵۹	۲۲/۱۱±۰/۱۶	۲۲/۰۱±۰/۰۱		آمفوتریستین	متا اسپیکاتا

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 آلیکانس

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

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

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 آلیکانس شاهد و تیمار شده با عصاره یکسان بود و میزان بیان ژن *ERG11* در رقت‌های معادل دو



شکل ۱- مقدار نسبی بیان ژن *ERG11* در کاندید آلیکانس تیمار شده با رقت های مختلف بر اساس MIC. عصاره: الف. تیموس ولگاریس، ب. متا اسپیکاتا، ج. ترکیب تیموس ولگاریس با متا اسپیکاتا پس از ۲۴ ساعت همراه با نتایج بیان ژن *ERG11* کاندید آلیکانس تیمار شده با رقت های مختلف عصاره های 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 زنجیره ای پلیمرز 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 و لگاریس 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 و لگاریس و *منتا اسپیکاتا* فعالیت ضد قارچی قوی علیه *کاندیدا آلیکانس* دارند (۱۷ و ۲۰-۲۳). در مطالعه حاضر، عصاره‌های تیموس و لگاریس و *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم علیه *کاندیدا آلیکانس* 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 و لگاریس و *منتا اسپیکاتا* را علیه *کاندیدا آلیکانس* نشان دادند و با مطالعه‌های پیشین هم‌خوانی داشتند (۱۷ و ۲۰-۲۳). در مطالعه حاضر، ترکیب عصاره تیموس و لگاریس با *منتا اسپیکاتا* بیشترین تأثیر ضد قارچی را علیه *کاندیدا آلیکانس* نشان داد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تیموس و لگاریس 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 و لگاریس 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 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 آلیکانس 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 آلیکانس* تیمار شده با عصاره تیموس و لگاریس، *منتا اسپیکاتا* به‌تنهایی و در ترکیب با هم کاهش یافت. *ERG11* تولید لانوسترول ۱۴- α دمی‌تلاز را کدگذاری می‌کند 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

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 کاندید/آلبیکانوس است، هدف مؤثری برای تأثیر عوامل ضد کاندیدایی 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^{۱۳} و همکاران (۳۰)، تأثیر ضد میکروبی اکینوفورا پلنتی لوبا^{۱۴} (خوشاریزه) و ساتورجا بختیاریکا^{۱۵} (مرزه بختیاری) را در مهار رشد جدایه‌های بالینی مقاوم به فلوکونازول کاندید/آلبیکانوس با ارزیابی میزان بیان ژن‌های *ERG11* و *MDR1* سنجیدند. نتایج نشان دادند که اکینوفورا پلنتی لوبا 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* کاندید/آلبیکانوس تیمار شده با ترکیب فلوکونازول و ترینافین را نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر، خداوندی و همکاران (۱۷) تأثیر ضد بیوفیلم کاندیدایی عصاره آبی ریشه تیموس ولگاریس را با ارزیابی تغییرات نسبی میزان بیان ژن *HWPI* سنجیدند. نتایج نشان دادند که گیاه یادشده موجب کاهش بیان ژن *HWPI* در رقت‌های مختلف MIC شده است.

موسوی‌نژاد^{۱۶}، تأثیر ضد کاندیدایی 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 کاندید/آلبیکانوس به ترتیب ۲۵۶ و ۶۴ میلی گرم در میلی لیتر و MFC عصاره الکلی آویشن شیرازی و وشا در جدایه‌های بالینی کاندید/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*