Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 20(128): 22-33

Antibiofilm Activity of *Fluconazole/Terbinafine* Combination in *Candida albicans HWP1* Gene Expression

Alireza Khodavandi[1], Fahimeh Alizadeh[2*], Nedasadat Marashi[3]

1. Assistant Professor, Department of Biology, Gachsaran Branch, Islamic Azad University, Gachsaran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.
3. MSc, Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.

Received: 26 Jul 2017, Accepted: 27 Dec 2017

Abstract

Background: Biofilm formation represents one of the major virulence factors of *Candida albicans*. However, the number of antifungal drugs is limited for the treatment of candidiasis. Combination therapy is one of the most frequently used techniques to alleviate this problem. In this study, we aimed to evaluate the antifungal activity of fluconazole and terbinafine alone and in combination on *C. albicans* biofilm inhibition.

Materials and Methods: In this cross- sectional study, 10 clinical isolates of *C. albicans* were identified from the immunocompromised patients. Antifungal susceptibilities were performed using the CLSI standard reference method. The crystal violet colorimetric method, direct microscopic observation and expression of *HWP1* gene at different concentrations based on MICs were carried out to investigate inhibition of biofilm formation in *C. albicans* treated alone and in combination with fluconazole and terbinafine.

Results: The data indicated that combination of fluconazole with terbinafine exerted synergistic effects with fractional inhibitory concentration index ranged from 0.375 to 1.5. The combination of fluconazole with terbinafine reduced the number of yeast form and inhibited the biofilm formation. Finally, the expression level of *HWP1* was down regulated ($p< 0.05$).

Conclusion: These results suggest the possibility of fluconazole/ terbinafine to treat candidiasis with a higher efficiency. In addition, *HWP1* gene could be probable target in synergistic interaction of fluconazole/ terbinafine against *C. albicans* biofilm.

Keywords: *Candida albicans*, Fluconazole/ terbinafine, *HWP1*

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.
Email: mnalizadeh@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۲۸)، بهمن ۱۳۹۶، ۳۳-۲۲

تأثیر ضد بیوفیلمی ترکیب دارویی فلوکونازول/تربینافین در بیان ژن *HWP1* *کاندیدا آلبیکانس*

علیرضا خداوندی[۱]، فهیمه علیزاده[۲*]، نداالسادات مرعشی[۳]

۱. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد گچساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گچساران، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران
۳. کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۴، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۶

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوامل بیماری‌زای ضروری *کاندیدا آلبیکانس* تشکیل بیوفیلم می‌باشد. علاوه بر این، تعداد عوامل ضد قارچی برای درمان کاندیدیازیس محدود است. افزایش میزان مقاومت دارویی باعث شده است که استفاده از ترکیب عوامل ضد قارچی مورد توجه بیشتری قرار گیرد. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تأثیر ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در مهار تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۱۰ جدایه *کاندیدا آلبیکانس* از بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی جدا و شناسایی گردید. آزمون حساسیت سنجی ضد قارچی با استفاده از روش میکرودایلوشن موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی تعیین شد. سنجش رنگ سنجی کریستال ویولت، مشاهده میکروسکوپی و ارزیابی میزان بیان ژن *HWP1* در غلظت‌های مختلف بر اساس MIC با هدف بررسی تأثیر ممانعت از تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* تحت تیمار با عوامل ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین انجام شده است.

یافته‌ها: نتایج بیان‌گر تأثیر هم افزایی در ترکیب فلوکونازول/ تربینافین با طیف شاخص غلظت مهاری نسبی ۰/۳۷۵- ۱/۵ بود. ترکیب فلوکونازول/ تربینافین موجب کاهش سلول های مخمری و ممانعت از تشکیل بیوفیلم شد. در نهایت، بیان ژن *HWP1* به طور معناداری کاهش پیدا کرد ($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که فلوکونازول/ تربینافین می‌تواند برای درمان عفونت‌های کاندیدیازیس موثرتر باشد. هم‌چنین، ژن *HWP1* را می‌توان به عنوان ژن هدف در تعامل هم افزایی فلوکونازول/ تربینافین علیه بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* معرفی نمود.

واژگان کلیدی: *کاندیدا آلبیکانس*، فلوکونازول/ تربینافین، *HWP1*

نویسنده مسئول: ایران، یاسوج ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
Email: mnalizadeh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

مقدمه

یکی از حالت های رشد غالب بسیاری از میکروارگانیسم ها، بیوفیلم می باشد. به طور کلی، بیوفیلم مجموعه ای از سلول‌های چسبنده است که از سلول های آزاد شناور متمایز هستند. اگرچه اغلب بیوفیلم به سطوح جامد متصل می‌گردد، ولی در محیط‌های دیگر مانند سطح تماس مایع- هوا ایجاد می شود. یکی از ویژگی های عمومی بیوفیلم مقاومت بیشتر سلول های آن به عوامل شیمیایی و فیزیکی است. *کاندیدا آلبیکانس* نیز توانایی تبدیل سلول های مخمری به ریسه حقیقی، ریسه کاذب و هم‌چنین تولید بیوفیلم را دارا می باشد. شروع تشکیل بیوفیلم با چسبندگی سلول ها به سطوح می باشد. چسبندگی منجر به استقرار، تولید لوله زایا و گسترش شبکه های ریسه ای همراه با شکل گیری ماده زمینه ای می گردد(۴-۱).

مطالعات نشان داده که صدها ژن در تشکیل بیوفیلم دخالت دارند که شامل ژن های تنظیمی و غیر تنظیمی می باشند. ژن تنظیمی اصلی دخیل در تشکیل و توسعه بیوفیلم شامل *Brg1* می باشد. علاوه بر این، پروتئین-های دیواره سلولی Als1، Als3 و Hwp1 در چسبندگی و در تنظیم بیوفیلم نقش دارند(۷-۴).

مقاومت *کاندیدا آلبیکانس* به عوامل ضد قارچی و شکست در درمان عفونت های ناشی از بیوفیلم، به عنوان یک مشکل بالینی مهم شناخته شده است(۱، ۶). استراتژی های مختلفی برای توسعه درمان به کار گرفته شده است که عبارت‌اند از: درمان کلاسیک ضد قارچی قفل کاتتر، درمان ترکیبی و استفاده از ترکیبات طبیعی و ایمنی درمانی (۳).

از عوامل ضد قارچی رایج مورد استفاده در درمان عفونت های ناشی از مخمر بیماری‌زای *کاندیدا آلبیکانس*، فلوکونازول می باشد که از بیوسنتز ارگوسترول جلوگیری می کند و به طور کلی توانایی توقف رشد قارچ را دارد(۸). هم‌چنین، عوامل ضد قارچی آلیلامینی تربینافین از آنزیم اسکوالن اپوکسیداز ممانعت می نماید(۹). مطالعات نشان داده است که درمان ترکیبی فلوکونازول/ تربینافین در ممانعت از رشد کاندیدا موثر بوده است(۱۱-۹). در مطالعه خداوندی و همکاران(۹)، یکی از اهداف مولکولی احتمالی تاثیر ترکیب فلوکونازول/ تربینافین علیه *کاندیدا آلبیکانس* ژن های دخیل در بیوسنتز ارگوسترول معرفی گردید. با توجه به تاثیر هم افزایی فلوکونازول/ تربینافین علیه *کاندیدا آلبیکانس*، در مطالعه حاضر، هدف مولکولی احتمالی تاثیر فلوکونازول/ تربینافین علیه بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* از طریق آنالیز میزان بیان ژن *HWP1* مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جدایه های *کاندیدا آلبیکانس*

در این مطالعه مقطعی، ۱۰ جدایه بالینی *کاندیدا آلبیکانس* از افراد دچار ضعف سیستم ایمنی بدن شامل افراد مبتلا به سرطان خون و لنف، دریافت کننده پیوند و دیابت با استفاده از روش های مورفولوژی و بیوشیمیایی استاندارد از قبیل مورفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی، تولید لوله زایا، هیدرولیز اوره و کشت بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Company, France) شناسایی گردید. علاوه بر این، سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 به عنوان کنترل کیفیت مورد استفاده قرار گرفت. همه جدایه ها در سابورو دکستروز مایع (SDB, Merck, Germany) حاوی ۳۰۰ میکروگرم/میلی لیتر کلرامفنیکل در دمای منهای ۸۰ درجه سلسیوس ذخیره شدند. برای هر مطالعه دو کلنی از *کاندیدا آلبیکانس* بر روی محیط کشت تازه سابورو دکستروز آگار (SDA, Merck, Germany) حاوی کلرامفنیکل دو بار کشت مجدد داده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری نموده تا از رشد در فاز لگاریتمی مخمر اطمینان حاصل شود. سپس سوسپانسیون قارچی با انتقال ۵ کلنی به قطر تقریبی یک میلی متر به سرم فیزیولوژی استریل اضافه نموده و با استفاده از اسپکتروفتومتر (Chroma, Iran) در طول موج ۵۳۰ نانومتر تراکم سلول ها در حدود ۵×۱۰^{۶}-۱ سلول مخمری در میلی لیتر برای دستیابی به کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید. سوسپانسیون تهیه شده معادل ۰/۵ مک فارلند

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

به میزان ۱:۱۰۰ با سرم فیزیولوژی و ۱:۲۰ در محیط کشت استریل RPMI-1640 حاوی ۲ درصد گلوکز و اسید آمینه ال-گلوتامین و حاوی فنل رد، فاقد بی کربنات سدیم (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) رقیق گردید و در نهایت سوسپانسیون حاصل دارای $۰/۵-۲/۵\times۱۰^{۳}$ سلول مخمر در میلی لیتر بود که با استفاده از روش ویبل کانت تایید گردید.

عوامل ضد قارچی

پودر عوامل ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین از شرکت سیگما (St. Louis, MO, Germany) خریداری و در دی‌متیل سولفواکسید حل شد. طیف رقت فلوکونازول مطابق دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI; M27-A3)، ۰/۰۳۱۲۵ - ۶۴ تهیه گردید.

طیف رقت تربینافین نیز ۰/۰۳۱۳ -۱۶ تهیه شد. در تیمارهای ترکیبی از فلوکونازول/ تربینافین به نسبت ۱: ۱ استفاده شد. برای استریل نمودن عوامل ضد قارچی از میلی پور فیلتر (۰/۲۲µm durapore, Millipore) استفاده گردید.

حساسیت سنجی ضد قارچی

مطابق دستورالعمل CLSI برای مخمرها(۱۲) با اندکی تغییر از روش میکرودایلوشن براث استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر عوامل ضد قارچی در محیط کشت RPMI-1640 به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی در چاهک میکروپلیت های ۹۶ چاهکی اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس درب پلیت ها بسته و به مدت ۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد. از محیط کشت بدون عوامل ضد قارچی و سوسپانسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و برای کنترل منفی فقط عوامل ضد قارچی و محیط کشت استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، محتویات هر چاهک توسط میکروپیپت به خوبی مخلوط گردید و میزان جذب نوری چاهک ها توسط الیزا ریدر در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه گیری گردید. نقطه پایانی برای تاثیر عوامل ضد قارچی بر مخمر به عنوان کمترین رقت هر ترکیب ضد قارچی که از ۵۰ و ۹۰ درصد رشد در مقایسه با کنترل ممانعت نماید، تعریف شد(۴، ۷).

تعیین میزان شاخص غلظت مهاری نسبی

میزان شاخص غلظت مهاری نسبی (FIC) عوامل ضد قارچی طبق فرمول زیر مورد بررسی قرار گرفت:

$$\text{FIC index} = \text{FICx} + \text{FICy}$$

$$\text{FIC index} = \frac{\text{MIC of drug x, in combination}}{\text{MIC of drug x, tested alone}} + \frac{\text{MIC of drug y, in combination}}{\text{MIC of drug y, tested alone}}$$

اگر FIC کمتر یا مساوی نیم باشد، ترکیب عوامل ضد قارچی مورد مطالعه تاثیر هم افزایی داشته است. اگر FIC بیشتر از نیم و کمتر از یک باشد، هم افزایی جزئی و اگر FIC مساوی یک باشد، ترکیب عوامل ضد قارچی اثر افزایشی داشته است. اگر FIC بیشتر از یک باشد، ترکیب عوامل ضد قارچی بی تاثیر بوده و اگر FIC بیشتر از یک و کمتر از چهار باشد، ترکیب عوامل ضد قارچی مورد نظر تاثیر آنتاگونیسمی داشته است(۱۳).

سنجش تاثیر عوامل ضد قارچی بر تشکیل بیوفیلم

سنجش کریستال ویولت: ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی $۱-۵\times۱۰^{۶}$ سلول مخمری در میلی لیتر در محیط کشت RPMI-1640 به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در رقت های مختلف بر اساس نتیجه MIC، از رقت های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC در چاهک های میکروپلیت ۹۶ چاهکی مخلوط شد. در میکروپلیت ها بسته و به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور بدون شیک در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

گرمخانه گذاری شد. سپس در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در نهایت، برای سنجش تاثیر فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین بر بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* با روش سنجش کریستال ویولت، چاهک های میکروپلیت با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و ۱۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد به هر چاهک اضافه گردید. پس از فیکس کردن به مدت ۱۵ دقیقه، محلول رویی دور ریخته و چاهک های میکروپلیت در مجاورت هوا خشک شد. ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویولت به میزان ۱:۵۰ استوک اولیه (Sigma) به هر چاهک اضافه، ۲۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری و با آب مقطر شستشو داده شد. ۱۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد (Sigma) به چاهک ها اضافه شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری گردید. برای کنترل مثبت از محیط کشت و سوسپانسیون میکروب استفاده گردید(۴). مشاهده میکروسکوپی: تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* تحت تیمار فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در پلیت ۶ چاهکی که در کف پلیت کاور اسلیپ استریل قرار داده شد، انجام گرفت. از محلول رویی برای استخراج RNA استفاده شد. پس از شستشوی کاور اسلیپ با سرم فیزیولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده گردید(۴).

آنالیز بیان ژن *HWP1*

محلول رویی حاوی سوسپانسیون مخمری جمع آوری شده از مرحله تشکیل بیوفیلم به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ و پلیت حاصل سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. RNA کل با استفاده از کیت RNeasy Mini مخصوص سلول های مخمری (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. برای از بین بردن احتمال آلودگی DNA، از تیمار با آنزیم RNase free DNase set (Qiagen) استفاده شد. پس از تایید کیفیت و کمیت RNA کل استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز با استفاده از کیت رونویسی معکوس (شرکت فرمنتاس) USA به cDNA تبدیل شد. بیان ژن *HWP1 کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از پرایمر طراحی شده توسط خداوندی و همکاران(۴) از cDNA سنتز شده تکثیر شد. برای نرمال کردن نمونه هایmRNA از ژن اکتین استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهای اولیگونوکلئوتید ژن های مورد مطالعه

ژن	سکونس پرایمر	اندازه محصول (pb)	منبع
HWP1	F: 5′ GGTAGACGGTCAAGGTGAAACA 3′ R: 5′ AGGTGGATTGTCGCAAGGTT 3′	۲۸۳	(۴)
ACT	F: 5′ ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC 3′ R: 5′ GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA 3′	۵۱۶	(۴)

برنامه دمایی- زمانی تکثیر برای ۲۶ سیکل شامل: چرخه ۱ (1X)؛ مرحله ۱، دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ چرخه ۲(26X)؛ مرحله ۱، دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه؛ مرحله ۲، دمای ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه؛ مرحله ۳، دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و چرخه ۳ (1X)؛ مرحله ۱، دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. برای هر نمونه کنترل منفی داخلی بدون آنزیم ترانس کریپتاز معکوس تهیه شد. میزان بیان ژن با استفاده از نرم افزار Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad, USA, version 4.6) بر اساس حجم باند های ایجاد شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید:

تغییر در بیان ژن=میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه های تیمار شده/میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه کنترل

پس از محاسبات آماری ژن هایی که میزان تغییر در بیان آن ها ≤۲ و یا ≥۰/۵ بود، به ترتیب به عنوان افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

بیان ژن و کاهش بیان ژن در نظر گرفته شدند. هویت محصولات PCR با روش توالی یابی DNA با استفاده از سرویس توالی یابی 1st BASE, Malaysia انجام شد. تشابه توالی با استفاده از نرم افزار BLAST نوکلئوتید در پایگاه داده بانک ژنی NCBI مورد تحلیل قرار گرفت(۴، ۱۴).

تحلیل آماری

این مطالعه مقطعی به صورت طرح کاملا تصادفی و آزمایش ها به صورت ۲ تکرار ۳ تایی انجام گرفت. تحلیل آماری پس از نرمال نمودن داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و به کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳(SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. اختلاف درون گروه ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی انجام گرفت. مقدار pکمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همه جدایه های بالینی *کاندیدا آلبیکانس* دارای مشخصات تولید کلنی ماهواره ای شکل کرم رنگ بر روی محیط کشت SDA، تولید لوله زایا و منفی بودن آزمایش هیدرولیز اوره، تولید کلنی سبز رنگ بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا بودند.

ارزیابی تأثیر ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین با توجه به دستورالعمل CLSI در برابر مخمرها نشان داد که ترکیب فلوکونازول/ تربینافین اثرات هم افزایی جزئی و هم افزایی داشتند. نتایج نشان داد که فلوکونازول به تنهایی در برابر ۸۰ درصد جدایه های *کاندیدا آلبیکانس* با MIC ۶۴ میکروگرم/میلی لیتر مقاوم و ۲۰ درصد با MIC ۳۲ میکروگرم/ میلی لیتر حساس وابسته به دوز بود. علاوه بر این، طیف MIC تاثیر تربینافین علیه جدایه های *کاندیدا آلبیکانس* ۴ تا ۸ میکروگرم بر میلی لیتر بود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که فلوکونازول/ تربینافین علیه جدایه های *کاندیدا آلبیکانس* به ترتیب ۱۰، ۶۰، ۱۰ و ۲۰ درصد تاثیر هم افزایی، هم افزایی جزیی، افزایشی و بی تاثیر بوده است. هم‌چنین ۷ جدایه از ۸ جدایه مقاوم به فلوکونازول، در تیمار با فلوکونازول/ تربینافین تاثیر هم افزایی جزئی و هم افزایی نشان دادند. در یک مورد دیگر جدایه مقاوم به فلوکونازول *کاندیدا آلبیکانس* کاهش MIC در تیمار فلوکونازول/ تربینافین مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲. میزان MIC نسبی و FIC فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین علیه *کاندیدا آلبیکانس*

جدایه های *کاندیدا آلبیکانس*	MIC فلوکونازول (میکرو گرم/ میلی لیتر)		MIC تربینافین (میکرو گرم/ میلی لیتر)		MIC فلوکونازول/ تربینافین (میکرو گرم/ میلی لیتر)		FIC فلوکونازول/ تربینافین
	$MIC_{۹۰}$	$MIC_{۵۰}$	$MIC_{۹۰}$	$MIC_{۵۰}$	$MIC_{۹۰}$	$MIC_{۵۰}$	
کاندیدا آلبیکانس ATCC	۱۶	۰/۰۳۱۲	۴	۰/۰۳۱۳	۲/۸	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۱
جدایه ۱	۳۲	۰/۰۳۱۲	۴	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۱/۵
جدایه ۲	۶۴	۰/۰۳۱۲	۸	۰/۰۳۱۳	۸/۳۲	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۱/۵
جدایه ۳	۶۴	۰/۰۳۱۲	۸	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۰/۷۵
جدایه ۴	۶۴	۰/۰۳۱۲	۸	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۰/۷۵
جدایه ۵	۳۲	۰/۰۳۱۲	۸	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۱
جدایه ۶	۶۴	۰/۰۳۱۲	۸	۰/۰۳۱۳	۲/۸	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۰/۳۷۵
جدایه ۷	۶۴	۰/۰۳۱۳	۸	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۰/۷۵
جدایه ۸	۶۴	۰/۰۳۱۳	۸	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۰/۷۵
جدایه ۹	۶۴	۰/۰۳۱۳	۸	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۰/۷۵
جدایه ۱۰	۶۴	۰/۰۳۱۳	۸	۰/۰۳۱۳	۴/۱۶	۰/۰۳۱۳/۰/۰۳۱۲	۰/۷۵

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

نتایج حاصل از تاثیر فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین بر تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* به روش سنجش کریستال ویولت نشان دهنده تاثیر قابل ملاحظه ($p\leq$ ۰/۰۰۵) کاهش تعداد سلول های تشکیل دهنده بیوفیلم بوده است (جدول ۳).

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر (میکروگرم/ میلی‌لیتر) حاصل از تاثیر فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین بر تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* با روش سنجش کریستال ویولت در رقت های مختلف بر اساس MIC

جدایه های *کاندیدا آلبیکانس*/ غلظت عوامل ضد قارچی	*کاندیدا آلبیکانس ATCC*	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴	جدایه ۵	جدایه ۶	جدایه ۷	جدایه ۸	جدایه ۹	جدایه ۱۰
فلوکونازول											
دو برابر MIC	۰/۳۲± ۰/۰۰۴	۰/۲۱± ۰/۰۰۱	۰/۲۲± ۰/۰۰۲	۰/۲۲± ۰/۰۰۳	۰/۲۱± ۰/۰۰۳	۰/۲۱± ۰/۰۰۲	۰/۲۳± ۰/۰۰۱	۰/۲۴± ۰/۰۰۲	۰/۲۳± ۰/۰۰۳	۰/۲۱± ۰/۰۰۱	۰/۲۱± ۰/۰۰۲
MIC	۰/۳۹± ۰/۰۰۳	۰/۳۸± ۰/۰۰۳	۰/۳۹± ۰/۰۰۲	۰/۳۷± ۰/۰۰۲	۰/۳۸± ۰/۰۰۵	۰/۳۹± ۰/۰۰۳	۰/۳۹± ۰/۰۰۱	۰/۳۸± ۰/۰۰۳	۰/۳۸± ۰/۰۰۳	۰/۳۹± ۰/۰۰۲	۰/۴۰± ۰/۰۰۵
نصف MIC	۰/۵۲± ۰/۰۰۲	۰/۵۴± ۰/۰۰۲	۰/۵۲± ۰/۰۰۵	۰/۵۲± ۰/۰۰۱	۰/۵۳± ۰/۰۰۲	۰/۵۴± ۰/۰۰۴	۰/۵۴± ۰/۰۰۱	۰/۵۵± ۰/۰۰۵	۰/۵۶± ۰/۰۰۳	۰/۵۴± ۰/۰۰۱	۰/۵۵± ۰/۰۰۴
یک چهارم MIC	۰/۶۲± ۰/۰۰۲	۰/۶۳± ۰/۰۰۱	۰/۶۶± ۰/۰۰۳	۰/۶۴± ۰/۰۰۱	۰/۶۴± ۰/۰۰۴	۰/۶۷± ۰/۰۰۴	۰/۶۶± ۰/۰۰۴	۰/۶۶± ۰/۰۰۳	۰/۶۴± ۰/۰۰۳	۰/۶۶± ۰/۰۰۳	۰/۶۷± ۰/۰۰۲
بدون تیمار	۲/۱۴± ۰/۰۰۲	۱/۹۸± ۰/۰۰۱	۲/۱۴± ۰/۰۰۱	۱/۹۷± ۰/۰۰۱	۱/۸۶± ۰/۰۰۲	۱/۹۷± ۰/۰۰۱	۱/۸۹± ۰/۰۰۳	۲/۱۵± ۰/۰۰۳	۱/۹۳± ۰/۰۰۲	۱/۹۲± ۰/۰۰۳	۱/۹۹± ۰/۰۰۳
تربینافین											
دو برابر MIC	۰/۲۰± ۰/۰۰۳	۰/۲۰± ۰/۰۰۴	۰/۱۸± ۰/۰۰۲	۰/۱۸± ۰/۰۰۵	۰/۲۰± ۰/۰۰۱	۰/۱۹± ۰/۰۰۳	۰/۱۸± ۰/۰۰۲	۰/۱۸± ۰/۰۰۱	۰/۱۹± ۰/۰۰۴	۰/۱۹± ۰/۰۰۳	۰/۱۸± ۰/۰۰۱
MIC	۰/۳۱± ۰/۰۰۱	۰/۳۲± ۰/۰۰۳	۰/۳۲± ۰/۰۰۲	۰/۳۲± ۰/۰۰۴	۰/۳۲± ۰/۰۰۱	۰/۳۳± ۰/۰۰۵	۰/۳۴± ۰/۰۰۳	۰/۳۲± ۰/۰۰۲	۰/۳۲± ۰/۰۰۳	۰/۳۳± ۰/۰۰۱	۰/۳۳± ۰/۰۰۴
نصف MIC	۰/۵۰± ۰/۰۰۱	۰/۴۸± ۰/۰۰۲	۰/۵۰± ۰/۰۰۲	۰/۴۷± ۰/۰۰۱	۰/۴۷± ۰/۰۰۳	۰/۴۸± ۰/۰۰۱	۰/۴۷± ۰/۰۰۳	۰/۴۸± ۰/۰۰۴	۰/۴۴± ۰/۰۰۱	۰/۴۶± ۰/۰۰۳	۰/۴۸± ۰/۰۰۴
یک چهارم MIC	۰/۵۲± ۰/۰۰۱	۰/۵۳± ۰/۰۰۲	۰/۵۳± ۰/۰۰۴	۰/۵۴± ۰/۰۰۳	۰/۵۴± ۰/۰۰۱	۰/۵۵± ۰/۰۰۳	۰/۵۴± ۰/۰۰۲	۰/۵۳± ۰/۰۰۱	۰/۵۵± ۰/۰۰۳	۰/۵۳± ۰/۰۰۵	۰/۵۴± ۰/۰۰۳
بدون تیمار	۲/۱۳± ۰/۰۰۴	۱/۹۹± ۰/۰۰۳	۲/۱۲± ۰/۰۰۲	۱/۹۸± ۰/۰۰۲	۱/۸۷± ۰/۰۰۳	۱/۹۶± ۰/۰۰۳	۱/۸۸± ۰/۰۰۵	۲/۱۲± ۰/۰۰۱	۱/۹۴± ۰/۰۰۴	۱/۹۲± ۰/۰۰۲	۱/۹۸± ۰/۰۰۱
فلوکونازول/ تربینافین											
دو برابر MIC	۰/۱۳± ۰/۰۰۴	۰/۱۴± ۰/۰۰۴	۰/۱۴± ۰/۰۰۳	۰/۱۴± ۰/۰۰۴	۰/۱۵± ۰/۰۰۳	۰/۱۳± ۰/۰۰۲	۰/۱۳± ۰/۰۰۴	۰/۱۳± ۰/۰۰۲	۰/۱۳± ۰/۰۰۱	۰/۱۳± ۰/۰۰۵	۰/۱۳± ۰/۰۰۲
MIC	۰/۲۸± ۰/۰۰۵	۰/۲۸± ۰/۰۰۱	۰/۳۰± ۰/۰۰۱	۰/۲۹± ۰/۰۰۳	۰/۲۷± ۰/۰۰۱	۰/۲۹± ۰/۰۰۴	۰/۳۰± ۰/۰۰۲	۰/۲۸± ۰/۰۰۳	۰/۲۷± ۰/۰۰۲	۰/۳۰± ۰/۰۰۲	۰/۲۹± ۰/۰۰۳
نصف MIC	۰/۴۱± ۰/۰۰۱	۰/۴۲± ۰/۰۰۴	۰/۴۲± ۰/۰۰۳	۰/۴۳± ۰/۰۰۱	۰/۴۲± ۰/۰۰۲	۰/۴۱± ۰/۰۰۱	۰/۴۱± ۰/۰۰۴	۰/۴۱± ۰/۰۰۱	۰/۴۳± ۰/۰۰۴	۰/۴۴± ۰/۰۰۱	۰/۴۱± ۰/۰۰۴
یک چهارم MIC	۰/۴۸± ۰/۰۰۴	۰/۴۸± ۰/۰۰۲	۰/۴۹± ۰/۰۰۳	۰/۵۰± ۰/۰۰۲	۰/۴۸± ۰/۰۰۴	۰/۴۷± ۰/۰۰۱	۰/۵۰± ۰/۰۰۳	۰/۴۸± ۰/۰۰۳	۰/۴۸± ۰/۰۰۴	۰/۴۹± ۰/۰۰۱	۰/۴۷± ۰/۰۰۲
بدون تیمار	۲/۱۳± ۰/۰۰۱	۱/۹۹± ۰/۰۰۳	۲/۱۳± ۰/۰۰۴	۱/۹۸± ۰/۰۰۵	۱/۸۷± ۰/۰۰۳	۱/۹۷± ۰/۰۰۳	۱/۸۹± ۰/۰۰۳	۱/۹۴± ۰/۰۰۲	۱/۹۴± ۰/۰۰۴	۱/۹۲± ۰/۰۰۳	۱/۹۸± ۰/۰۰۴

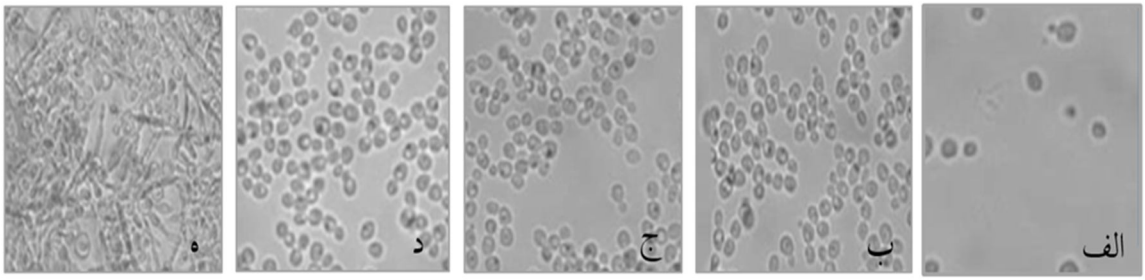
نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی نشان دهنده کاهش قابل ملاحظه تعداد سلول های مخمری، کاهش تبدیل سلول های مخمری به ریسه و تولید بیوفیلم در جدایه های *کاندیدا آلبیکانس* با عوامل ضد قارچی

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در رقت های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC بوده است. هر چه رقت عوامل ضد قارچی بیشتر شود تعداد سلول ها کمتر شده، در حالی که در نمونه های کنترل بدون تیمار تغییری مشاهده نشده و بیوفیلم رشد کرده متشکل از چندین لایه فشرده از سلول های مخمری و ریسه است. شکل ۱ نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکپی تاثیر تربینافین در رقت های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC علیه بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* ATCC نمایش داده است.



شکل ۱. نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکپی تاثیر تربینافین علیه بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* ATCC در رقت های مختلف بر اساس MIC. الف: دو برابرMIC، ب: MIC، ج: نصف MIC، د: یک چهارم MIC، ه: کنترل بدون تیمار. بزرگنمایی X٤٠، Bar = 50 µm.

هویت محصولات PCR با روش توالی یابی DNA تایید شد. تشابه توالی با استفاده از نرم افزار BLAST نوکلئوتید در پایگاه داده بانک ژنی NCBI تایید شد.

میزان بیان نسبی ژن HWP1 سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* در رقت های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC و در حالت تیمار با عوامل ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است.

بیان نسبی ژن با روش نیمه کمی RT-PCR بیان‌گر تغییرات معنی داری $p\leq$ ۰/۰۰۵ در بیان ژن HWP1 بوده است. تغییرات بیان ژن HWP1 نسبت به نمونه کنترل بدون تیمار برای رقت های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC در تیمار با فلوکونازول به ترتیب ۰/۰۰۲±۰/۱۴، ۰/۰۰۳±۰/۱۵، ۰/۰۰۲±۰/۱۶ و ۰/۰۰۲±۰/۱۹ بوده است.

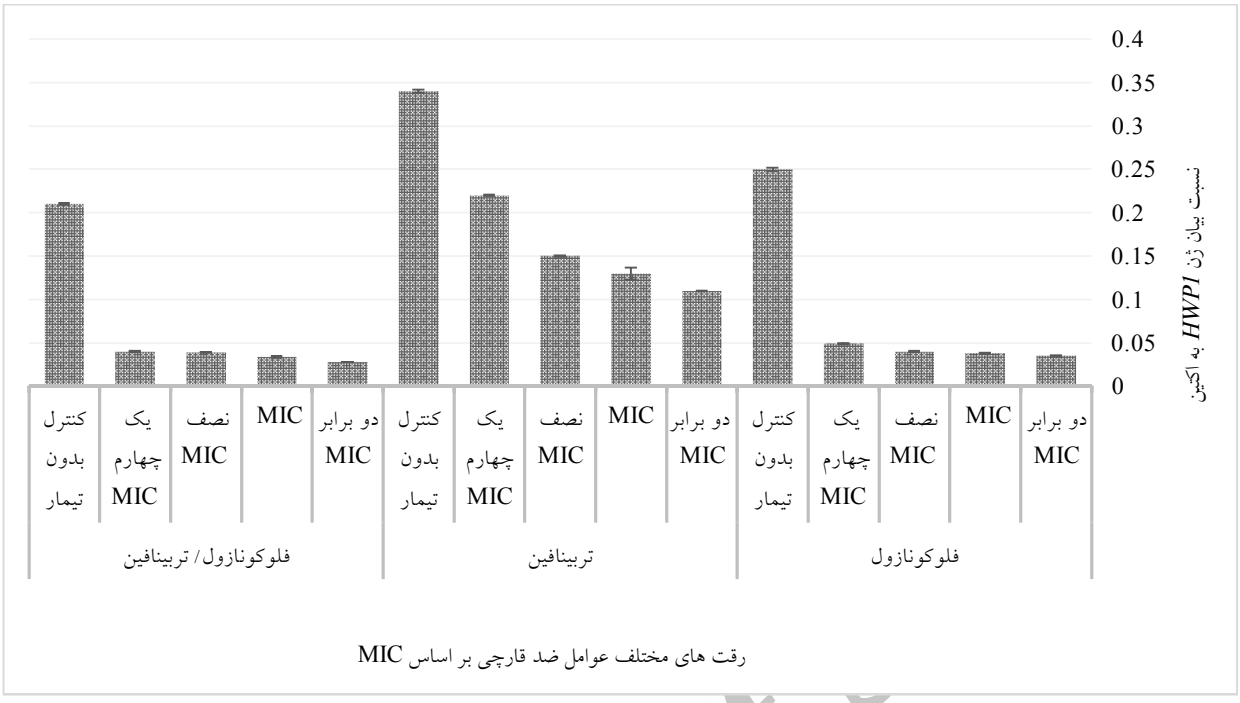
هم‌چنین نتایج تغییرات بیان ژن HWP1 نسبت به نمونه کنترل بدون تیمار برای رقت‌های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC در تیمار با تربینافین به ترتیب ۰/۰۰۲±۰/۳۲، ۰/۰۱۴±۰/۳۸، ۰/۰۰۵±۰/۴۳، ۰/۰۰۱±۰/۶۴ نشان داد.

در نهایت *کاندیدا آلبیکانس* تحت تیمار با فلوکونازول/ تربینافین، تغییرات بیان ژن HWP1 نسبت به نمونه کنترل بدون تیمار را برای رقت‌های معادل دو برابر MIC، MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC به ترتیب ۰/۰۰۲±۰/۱۴، ۰/۰۰۴±۰/۱۶، ۱۸/۰۰۱±۰/۰ و ۰/۰۰۴±۰/۱۹ نشان داد.

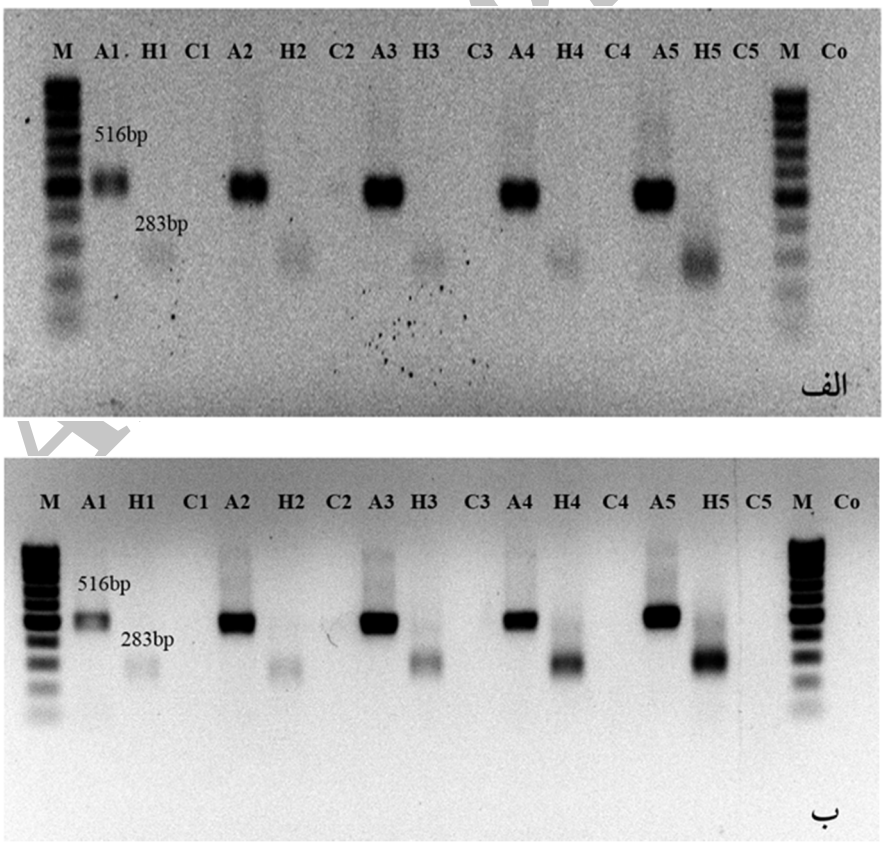
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

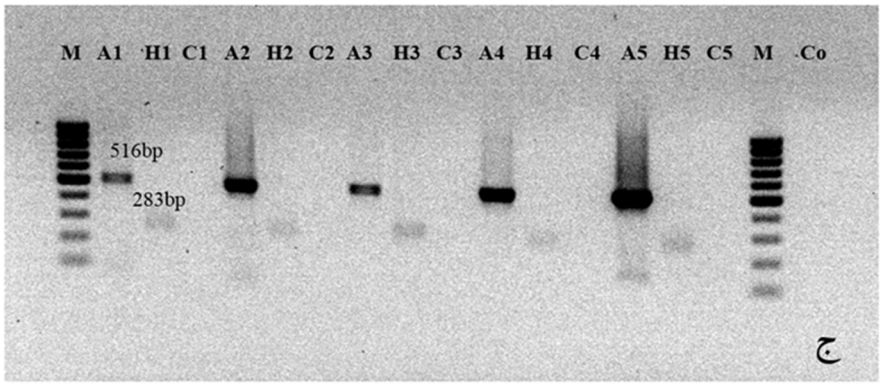


شکل ۲. نسبت بیان ژن *HWP1* به اکتین در بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* ATCC تحت تیمار با عوامل ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در رقت های مختلف بر اساس MIC.



www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018



شکل ۳. نتایج حاصل از الکتروفورز ژن *HWP1* در بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* ATCC تحت تیمار با عوامل ضد قارچی فلوکونازول (الف)، تربینافین (ب) و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین (ج). M: مارکر، A1: اکتین در عوامل ضد قارچی دو برابر MIC، H1: *HWP1* در عوامل ضد قارچی دو برابر MIC، C1: کنترل داخلی واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس، A2: اکتین در عوامل ضد قارچی برابر MIC، H2: *HWP1* در عوامل ضد قارچی برابر MIC ، C2: کنترل داخلی واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس، A3: اکتین در عوامل ضد قارچی نصف MIC، H3: *HWP1* در عوامل ضد قارچی نصف MIC، C3: کنترل داخلی واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس، A4: اکتین در عوامل ضد قارچی یک چهارم MIC، H4: *HWP1* در عوامل ضد قارچی یک چهارم MIC، C4: کنترل داخلی واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس، A5: اکتین در کنترل بدون تیمار، H5: *HWP1* در کنترل بدون تیمار، C5: کنترل داخلی واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس، M: مارکر، Co: کنترل واکنش زنجیره ای پلیمراز.

بحث

کاندیدا آلبیکانس شایع ترین عامل بیماری‌زایی عفونت های کاندیدیازیس است که طیف وسیعی از عفونت های مخاطی سطحی تا بیماری های تهدید کننده حیات را به خصوص در افراد مبتلا ضعف سیستم ایمنی ایجاد می نماید. دارا بودن فاکتورهای بیماری‌زایی متعدد و قوی برای ایجاد بیماری‌زایی ضروری است. *کاندیدا آلبیکانس* دارای فاکتورهای بیماری‌زایی متعدد و متنوعی بوده که موجب شده میکروارگانیسم را از زندگی همزیستی به بیماری‌زای فرصت طلب و کشنده تبدیل نماید. از فاکتورهایی که نقش مهمی در بیماری‌زایی و ایجاد مقاومت در برابر درمان دارد، توانایی تولید بیوفیلم می باشد(۴-۱). پروتئین Hwp1 نقش اساسی در تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* دارد(۱۵).

مکانیسم اثر فلوکونازول ممانعت از آنزیم لانسترول ۱۴-α دمتیلاز وابسته به سیتوکروم P۴۵۰ است که موجب ایجاد اختلال در نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی سلول قارچ و کاهش ارگوسترول و در نتیجه توقف رشد سلول ها می شود. تربینافین اثرات ضد قارچی خود را از طریق ممانعت از آنزیم اسکوالن اپوکسیداز اعمال می نماید. در نتیجه موجب کاهش ارگوسترول غشاء سلولی قارچ و نمایش تاثیر توقف رشد و تجمع سمی اسکوالن در داخل سلول قارچ و در نهایت باعث مرگ سلول قارچی می گردد. مطالعات نشان داده که مقاومت به فلوکونازول در عفونت های مخمری به وفور گزارش شده است. علاوه بر این، ترکیب فلوکونازول/ تربینافین اثر هم افزایی علیه قارچ ها دارد(۱۶). از این رو، درمان ترکیبی به عنوان بهترین گزینه برای به حداقل رساندن خطر مقاومت و کاهش عوارض جانبی عوامل ضد قارچی قوی موجود برای ریشه کن کردن عفونت کاندیدیازیس می باشد.

در مطالعه حاضر، اثر ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* مورد بررسی قرار گرفت. داده های حاصل از آزمایش نشان داد که ۸۰ درصد جدایه ها به فلوکونازول مقاوم بودند، در حالی که همه جدایه ها به تربینافین به تنهایی حساسیت نشان دادند. جالب توجه است که ترکیب فلوکونازول/ تربینافین در ۹۰ درصد جدایه های مقاوم به فلوکونازول تاثیر هم افزایی جزئی و هم افزایی نشان دادند. در مطالعه خداوندی و همکاران(۹)، تاثیر هم افزایی ترکیب فلوکونازول/ تربینافین علیه *کاندیدا آلبیکانس* گزارش شده که با نتایج حاضر همخوانی دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

یافته های حاصل از مطالعه حاضر بر اساس تاثیر عوامل ضد قارچی بر مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* به روش سنجش کریستال ویولت و مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین موجب مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* در رقت های مختلف بر اساس MIC شد.

نتایج نشان داد که با افزایش رقت عوامل ضد قارچی مهار بیوفیلم افزایش یافته است که با مشاهدات میکروسکوپی تایید گردید. از طرفی، ترکیب فلوکونازول/ تربینافین تاثیر قابل ملاحظه تری در مقایسه با تیمار تکی عوامل ضد قارچی در مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* نشان داده است که با نتایج مطالعات قبلی همخوانی داشته است(۷، ۹، ۱۴، ۱۷).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیان‌گر کاهش بیان ژن HWP1 در *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب فلوکونازول/ تربینافین بوده است. ترکیب فلوکونازول/ تربینافین تاثیر قابل ملاحظه تری در مقایسه با تیمار تکی عوامل ضد قارچی در مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* نشان داده است.

ژن HWP1 در مراحل ابتدای تشکیل بیوفیلم بیان می شود و معمولاً از شکل گیری بیوفیلم توسط لوله زایا پدیدار شده و با کمک پروتئین‌ها و فاکتورهای دیگر نقش مهمی در شکل گیری و توسعه بیوفیلم دارد(۷-۴).

در مطالعه انجام شده توسط خداوندی و همکاران(۴)، بیان ژن HWP1 در بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* تحت تیمار با آلیسین و فلوکونازول مورد ارزیابی گرفت. نتایج نشان دهنده کاهش بیان ژن HWP1 بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* تحت تیمار با آلیسین و فلوکونازول بوده است.

هم‌چنین در مطالعه ای مشابه، کاهش بیان ژن HWP1 در بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* تحت تیمار با عصاره هگزانی موسیر(۱۴) و عصاره آبی ریشه آویشن باغی(۱۸) نشان داده شد.

نتیجه‌گیری

مطالعه مولکولی حاضر به همراه مطالعات قبلی انجام شده(۴، ۱۴، ۱۸) بر روی آنالیز بیان ژن HWP1 می تواند تایید کننده هدف مولکولی احتمالی ژن HWP1 برای تاثیر عوامل ضد کاندیدیایی در بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* باشد. این که آیا دقیقا ژن HWP1 هدف موثر برای تاثیر عوامل ضد قارچی علیه بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* است، نیاز به بررسی بیشتر دارد. دانش گسترده از مکانیسم های مولکولی تاثیر عوامل ضد قارچی و شناسایی اهداف مولکولی مناسب می تواند به عنوان راهکار مفیدی در توسعه درمان جدید مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد زیست شناسی-میکروبیولوژی با عنوان «ارزیابی اثرات ضد قارچی ترکیب دارویی فلوکونازول/ تربینافین در مهار تولید بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* در شرایط آزمایشگاهی»، کمال امتنان را دارند.

منابع

1. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. Annu Rev Microbiol 2015; 69: 71–92.
2. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. Pathog Dis 2016; 74(4): ftw018.
3. Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. Curr Genet. 2013; 59(4): 251–64.
4.Khodavandi A, Harmal NS, Alizadeh F, Scully OJ, Sidik SHM, Othman F, et al. Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of *HWP1* gene expression. Phytomedicine 2011; 19: 56–63.
5.Inci M, Atalay MA, Ozer B, Evirgen O, Duran N, Koksaldi Motor V, et al. Investigations of *ALS1* and *HWP1* genes in clinical isolates of *Candida albicans*. Turkish J Med Sci 2013; 43: 125–30.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:17 +0430 on Sunday April 8th 2018

6. Finke JS, Mitchel AP. Genetic control of Candida albicans biofilm development. Nat Rev Microbiol 2011; 9: 109–18.
7. Sadri A, Khodavandi A, Alizadeh F. Quorum-sensing quenching compounds *Allium sativum*, *Allium hirtifolium* and *Allium cepa*: the probable quorum- sensing quenching compounds against *Candida albicans*. Biosci Biotechnol Res Asia 2016; 13(3): 1457-68.
8. Lass-Flörl C.Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: A comparative review. Drugs 2011; 71(18): 2405-19.
9.Khodavandi A, Alizadeh F, Vanda NA, Karimi G, Chong PP. Possible mechanisms of the antifungal activity of fluconazole in combination with terbinafine against *Candida albicans*. Pharm Biol 2014; 52(12): 1505-9.
10. Barchiesi F, Falconi Di Francesco L, Scalise G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(8): 1812-4.
11. Dolton MJ, Perera V, Pont LG, McLachlan AJ. Terbinafine in combination with other antifungal agents for treatment of resistant or refractory mycoses: investigating optimal dosing regimens using a physiologically based pharmacokinetic model. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(1): 48–54.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition, CLSI M27-A3.
13.Khodavandi A, Alizadeh F, Aala F, Sekawi Z, Chong PP. *In vitro* investigation of antifungal activity of allicin alone and in combination with azoles against *Candida albicans* species. Mycopathologia 2010; 169(4): 287-95.
14.Khodavandi A, Alizadeh F, Namvar F, Rosfarizan M, Chong, PP. Anti-*Candida* potential of *Allium ascalonicum* Linn: antibiofilm activity and biomolecular mechanism of action. J Pure Appl Microbiol 2014; 8(2): 349–56.
15. Fan Y, He H, Dang Y, Pan H. Hyphae-specific genes *HGC1*, *ALS3*, *HWP1*, and *ECE1* and relevant signaling pathways in *Candida albicans*. Mycopathologia 2013; 176: 329–35.
16. Khodavandi A, Alizadeh F. Antifungal agents and their mechanism of action. 1th ed. Islamic Azad University Publishers. 2017.
17.Rahimi G, Khodavandi A, Jannesar R, Alizadeh F, Yaghobi R, Sadri A. Evaluation of antifungal effects of ethanolic and aqueous extracts of *Zataria multiflora* herb in the pathogenic yeast *Candida albicans* biofilm inhibition. J Pure Appl Microbiol 2014; 8(6): 4559–64.
18.Khodavandi A, Alizadeh F, Shahinipor M. Relative quantitation of hyphae-specific gene *HWP1* expression in inhibition of *Candida albicans* biofilm. J MicrobWorld 2016; 9(1): 22–33.

Archive of SID

www.SID.ir