

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

چکیده

**زمینه و هدف:** کاندیدا آلبیکنس یک قارچ فرصت طلب انسانی است که عامل عفونتهای مخاطی و سیتیک در افراد با نقص سیستم ایمنی است و در سالیان اخیر افزایش مقاومت به عوامل ضد قارچی در آن 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 ضد میکروبی 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 مهارى 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 ای 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 کدورت در محیط ساپورو دکستروز آگار حداقل غلظت کشنده (MFC) اسانس و داروی فلوکونازول تعیین شد.

**یافته ها:** حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس کارواکرول در سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس به ترتیب 5/3 و 6/18 میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن ها 10/61 و 12/3 میکروگرم بر میلی لیتر بود. بالاترین قطر هاله مهارى 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، کاندیدا آلبیکنس، فلوکونازول

سیده صدیقه حسینی

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

شهلا رودبارمحمدی

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

حمیدرضا جوشقانی

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

نویسنده مسئول: سیده صدیقه حسینی

تلفن 0171-3324002

پست الکترونیک: [hoseini\\_se@yahoo.com](mailto: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

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، 1390 دوره پنجم (شماره 2): 28-33

#### مقدمه

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

عفونت‌های سیستمیک ناشی از گونه‌های کاندیدا طی چهار دهه اخیر به علت افزایش بیماری‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی نظیر ایدز و انواع بدخیمی‌های خونی و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و کورتیکواستروئیدها به عنوان عامل مهم مرگ و میر به خصوص برای بیماران بستری در بیمارستانها مطرح است (2-4).

امروزه شکست‌های زیادی در درمان مبتلایان به اشکال بالینی کاندیدایزیس گزارش شده است. داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون‌های متفاوت برای درمان در دسترس است اما در بسیاری از موارد به دلیل بی‌پاسخی نسبت به درمان، بیماری به اشکال مزمن یا حاد تبدیل شده و گاهی عودهای مکرر دیده می‌شود. همچنین نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضدقارچی که خود منجر به بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آن‌ها می‌شود، محدودیت‌هایی را در استفاده از این قبیل ترکیبات ضدقارچی به وجود آورده است (5و6). از آنجایی که عفونتهای قارچی و سیستمیک عمدتاً به وسیله مخمرهای مقاوم به داروهای ضدقارچی نظیر فلوکونازول و ایتراکونازول ایجاد می‌شود، لذا بررسی و مطالعه در زمینه یافتن عصاره‌های گیاهی با خواص ضد میکروبی بالا و حداقل اثرات جانبی روی میزبان و خالص سازی مواد موثره آنها، می‌تواند راهگشای درمان بسیاری از عفونتهای قارچی مقاوم به داروهای ضدقارچی سنتتیک گردد (7-8). از این رو امروزه محققین به سمت داروهای گیاهی رو آورده‌اند که ضمن دارا بودن اثرات مفید، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی هستند. خاصیت دارویی

گیاهان و عصاره‌های به دست آمده از آن‌ها در درمان بیماری‌های قارچی شناخته شده است و ترجیح استفاده از آن‌ها به دلیل میزان مصرف کمتر و کسب نتیجه مطلوب تر از آن‌هاست.

کارواکرول ترکیب اصلی اسانس روغنی حاصل از آویشن، دارای خاصیت ضد میکروبی است. مکانیسم اثر ضد میکروبی اسانس‌های روغنی در اثر واکنش آنها با غشاء سلول میکروارگانیس‌م و تغییر در نفوذپذیری ترکیباتی چون پتاسیم و هیدروژن می‌باشد. 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 می‌شود. این ماده در ساختار روغن‌های خوراکی گیاهی مثل روغن *Origanum* و برخی روغن‌های گیاهی که به عنوان چاشنی غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند، 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 می‌شود و نه تنها خود باعث مهار جمعیت میکروبی می‌شود بلکه با افزایش نفوذپذیری غشاء قارچ‌ها، آنها را نسبت به سایر مواد ضدقارچی حساس و آسیب‌پذیر می‌نماید (11)، Gill در مطالعه خود چنین اثری را بر غشا سلولی باکتریها مشاهده نمود، در مطالعه وی مشخص شد که اسانس کارواکرول باعث افزایش نفوذپذیری و تخریب غشا سلولی باکتری و مهار فعالیت *ATPase* آن می‌شود (12). *Nostro* و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که کارواکرول بر روی استافیلوکوک‌های حساس به متی‌سیلین و استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین 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 پروستاگلندین  $F_2$ ,  $F_1$ ,  $E_2$  را داشته و بدین ترتیب علاوه بر خواص ضد میکروبی قابلیت مهار التهاب و تخفیف پروسه‌های تخریبی ناشی از آن را دارد (14). هدف از

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 دایلوژن:

در این آزمایش از میکروپلیت 96 خانه ایی استفاده شد. ابتدا درون چاهکها 200 میکرولیتر محیط کشت ساپرو دکستروز براث ریخته شد. غلظت های متوالی از اسانس کارواکرول در محلول 10% دی متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه شد و مقدار 10 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  $10^6 \times 1$  سلول 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 از الیزا 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 آلیکس روی محیط کشت SDA بود به عنوان MFC اسانس و فلوکونازول در نظر گرفته شد. تمام آزمایش ها سه بار تکرار گردید.

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

### روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال 1389 به منظور تعیین حساسیت کاندیدا آلیکس 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 آلیکس استاندارد سویه حساس ATCC10231 از بخش قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و سویه مقاوم به فلوکونازول ATCC76615 از مرکز دارویی دانشگاه ارتش شانگهای چین تهیه شده را بر روی محیط ساپرو دکستروز آگار (SDA) حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه 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)  $\text{PH} = 7/2$  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  $10^6 \times 1$  سلول در هر میلی لیتر تهیه شد (15)

2- تعیین حساسیت کاندیدا آلیکس 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 آلیکس 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  $10^6 \times 1$  سلول در هر میلی لیتر به پلیت های مذکور تلقیح شد. بعد از گذشت 20 دقیقه، دیسک

**یافته ها**

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).

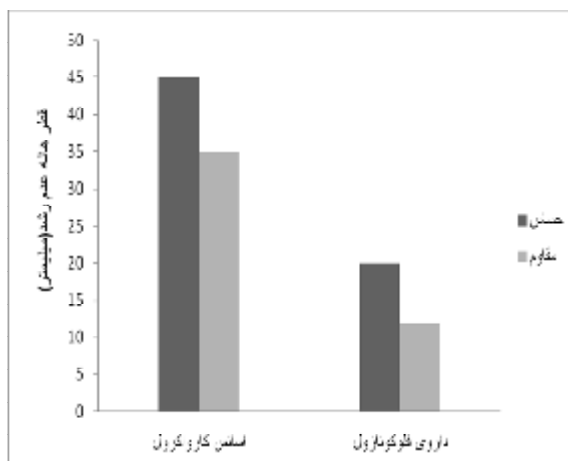
نتایج به دست آمده از بررسی MIC اسانس کارواکرول نشان داد که MIC اسانس کارواکرول برای کاندیدا آلیبکنس

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

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

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).

نتایج اندازه گیری قطر هاله مهارتی نیز نشان داد که قطر هاله مهارتی فلوکونازول و اسانس کارواکرول در سویه حساس به ترتیب 20 و 45 میلی متر و برای سویه مقاوم 12 و 35 میلی متر است. (نمودار 1).



نمودار 1- قطر هاله عدم رشد سویه ها حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلیبکنس در حضور غلظت 30 میکروگرم اسانس کارواکرول و 25 میکروگرم فلوکونازول

## بحث

در تحقیق حاضر تعداد کلنی های شمارش شده در محیط آگار در حضور اسانس کارواکروول 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 کارواکروول دارای اثرات ضد کاندیدایی قوی تری می باشد.

در مطالعه Kamedem و همکاران اثر کارواکروول 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 کارواکروول و تتراسیکلین بر روی کاندیدا آلیکس و پنج سوش باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که دیسکهای حاوی 40  $\mu\text{g}$  کارواکروول تاثیر بسیار خوبی بر روی کاندیدا آلیکس دارد در حالیکه در همین غلظت هیچ تاثیری بر روی سودوموناس اثرورژینوزا نداشت. همچنین با وجود اینکه تتراسیکلین به تنهایی اثری بر روی سودوموناس اثرورژینوزا نداشت اما مصرف هم زمان کارواکروول و تتراسیکلین تاثیر بسیار زیادی بر روی سودوموناس اثرورژینوزا داشت که بیانگر اثر هم افزایی این دو ماده می باشد (17). در گزارش Wu و Lu که اثر کارواکروول 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 کارواکروول را بر روی کاندیدا آلیکس 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 کارواکروول و تیمول بر کاندیدا آلیکس 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 کارواکروول بر روی سویه حساس کاندیدا آلیکس قدرت بازدارندگی بالاتری در مقایسه با سویه مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلیکس نشان داد. استفاده گسترده از داروهای ضد قارچی به ویژه ترکیبات آزول در درمان کاندیدایزیس 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 آلیکس این اسانس می تواند به عنوان منبع ضد قارچی در کنترل کاندیدایزیس 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 میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی گلستان که در انجام مطالعه همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد.

## References

- Ajello L, Hay JR. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Vol.4, Medical Microbiology, 9<sup>th</sup> edition, Oxford University Press, Inc. 1998: 275-69.
- 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.
- Patterson T. *Treatment and prevention of fungal infections. Focus on Candidemia*. New York: Applied Clinical Education. 2007; 23: 7-80.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med. 2003; 348(16): 1546-54
- Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranyake YH, Samaranyake LP. *Molecular heterogeneity of fluconazole resistant and susceptible oral Candida albicans isolates within a single geographic locale*. APMIS. 2002; 110: 315-24.
- Morshhauser J. *The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans*. Biochemica, Biophysica Acta. 2002; 1587: 240-8.
- 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
- 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.
- 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
- 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
- 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
- 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.
- Amanlou M, Dadkhah F, Salehnia M, Dephpour A. *Anti inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of saturja khouzistanica Jamzad extract*. J pharm pharm Sci. 2005;8:102-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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