مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶

مقاله پژوهشی

تاثیرعصاره های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل بر مهار آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی *کاندیدا آلبیکانس*

علیرضا خداوندی [۱]، فهیمه علیزاده [۲*]، سعیده حکیمی زاده [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] کارشناسی ارشد، گروه میکروبشناسی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** فهیمه علیزاده، استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران،
ایمیل: mnalizadeh@yahoo.com, f.alizadeh@iauyasooj.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-090413

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۰

واژگان کلیدی:
SAP1
چویل
کاندیدا آلبیکانس
ریسه

چکیده

مقدمه: چویل گیاهی دارویی از خانواده چتریان است و از زمان‌های قدیم در پزشکی کاربرد وسیعی داشته است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تأثیر مهاری عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل بر آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی *کاندیدا آلبیکانس* انجام شد.

روش کار: در این مطالعه مقطعی، ۱۰ جدایه *کاندیدا آلبیکانس* از بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی در یاسوج جدا و شناسایی گردید. تأثیر ضدکاندیدیایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل درزمان تیمار ۲۴ ساعت با استفاده از روش میکرودایلوشن براث مطابق دستورالعمل CLSI انجام گرفت. علاوه بر این، برای ارزیابی تأثیر ضدکاندیدیایی عصاره‌های گیاه مورد مطالعه، سنجش زمان مرگ سلول انجام شد. همچنین تأثیر مهاری تشکیل ریسه، فعالیت آنزیم آسپارتیل پروتئیناز و آنالیز میزان بیان ژن *SAP1* موثرترین عصاره انجام شد.

یافته‌ها: داده‌های بدست آمده نشان داد که از میان عصاره‌های مورد مطالعه عصاره اتانولی برگ چویل تأثیر قابل ملاحظه‌ای ($P < ۰/۰۵$) علیه *کاندیدا آلبیکانس* داشت. تأثیر ضد قارچی عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC با کاهش سلول‌ها، کاهش تبدیل سلول‌های مخمری به فرم ریسه و کاهش فعالیت آنزیم آسپارتیل پروتئیناز بوده است. در نهایت عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت برابر MIC موجب کاهش معنا دار (۱/۶۸ بار) بیان ژن *SAP1* شد. تأثیر دوز در همه پارامترهای آزمایش شده مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که عصاره اتانولی برگ چویل می‌تواند مهار کننده آنزیم آسپارتیل پروتیئناز *کاندیدا آلبیکانس* باشد. علاوه بر این، عصاره اتانولی برگ چویل می‌تواند به‌طور چشمگیری در کاهش بیان ژن‌های بیماری زایی *کاندیدا آلبیکانس* از جمله *SAP1* تأثیر داشته باشد.

مقدمه

قارچ پلی مورف *کاندیدا‌آلبیکانس* به عنوان فلور طبیعی میکروبیوم بدن انسان می‌باشد ولی درشرایطی که سیستم ایمنی میزبان کاهش یابد، قادربه ایجاد بیماری درهر ناحیه از بدن خواهد بود [۱]. عوامل و فعالیت‌های متعددی در پتانسیل بیماریزایی *کاندیدا‌آلبیکانس* دخیل هستند. از مهمترین فاکتورهای بیماریزایی مولکول‌هایی هستند که در اتصال و تهاجم قارچ به سلول‌های بدن انسان نقش دارند. همچنین ترشح آنزیم‌های هیدرولیز کننده، تبدیل فرم مخمری به ریسه‌ای، احساس تماسی و تیگموتروپیسم، تشکیل بیوفیلم، تعویض فنوتیپی و طیف وسیعی از ویژگی‌های متناسب دیگر نیز در پتانسیل بیماریزای *کاندیدا‌آلبیکانس* نقش دارند [۱, ۲]. پس از اتصال *کاندیدا آلبیکانس* به سطوح سلول‌های بدن، فرم مخمری به ریسه‌ای تبدیل می‌گردد، سپس برای کسب مواد غذایی خارج سلولی، فرم ریسه *کاندیدا‌آلبیکانس* آنزیم‌های هیدرولیز کننده ترشح می‌نمایند [۳]. فعالیت پروتئولیتیک خارج سلولی نقش بسزایی در بیماریزایی *کاندیدا‌آلبیکانس* دارد که توسط ۱۰ آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی انجام می‌گردد و توسط خانواده ۱۰ ژنی *SAP* کد می‌شوند. از میان ۱۰ خانواده آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی، آنزیم‌های ۸-۱ به طور کامل از سلول *کاندیدا آلبیکانس* به محیط خارج سلول ترشح می‌گردد ولی آنزیم‌های ۹ و ۱۰ به غشاء سلولی متصل می‌مانند. همچنین نشان داده شده که آنزیم‌های آسپارتیل پروتئیناز ترشحی ۳-۱ موجب اتصال *کاندیدا آلبیکانس*به سطوح و ایجاد آسیب بافتی در محل عفونت می گرددر حالی که آنزیم‌های ۶-۴ در عفونت‌های منتشره دخالت دارند [۴, ۵]. اطلاعات کمی از نقش آنزیم‌های آسپارتیل پروتئیناز ترشحی ۸-۷ در بیماریزایی در دسترس هست. همچنین آنزیم‌های آسپارتیل پروتئیناز ترشحی ۱۰-۹ آنزیم‌های مرتبط با سطح سلولی *کاندیدا آلبیکانس*، در یکنواختی دیواره سلولی، جدا سازی سلول و اتصال

غیرمستقیم نقش دارند. علاوه براین، با سلول‌های پوششی و نوتروفیل ها تعامل دارند [۶, ۷]. وجود محدودیتهایی از قبیل تعداد کم داروهای ضدقارچی، سمی بودن برای سلولهای انسانی، گرانی وکاهش حساسیت و یا مقاومت سویه‌هایی از *کاندیدا*به داروهای رایج، همواره به عنوان معضلات عدیده دردرمان بیماری‌های ایجاد شده توسط *کاندیدا* مطرح می‌باشند. مطالعات نشان داده که مصرف طولانی مدت گیاهان دارویی در دوز های معمول عوارض جانبی نخواهند داشت، لذا توجه به گیاهان دارویی معطوف شده است. گیاه چویل یکی از گیاهان دارویی طبیعی است که به صورت سنتی به عنوان داروی آرام بخش، تونیک، ضد انگل و داروی گوارشی از آنها استفاده می‌شده است. خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی گونه‌های مختلف گیاه چویل به اثبات رسیده است [۸, ۹]. علاوه بر این، مطالعات نشان داده که گیاه چویل دارای اثر مهاری علیه گونه‌های *کاندیدا* داشته است [۱۰, ۱۱]. عصاره گیاه چویل حاوی ترکیبات فنلی است به همین دلیل دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشد [۱۲]. در مطالعه حاضر تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل سنجیده شد. علاوه بر این، برای ارزیابی تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های گیاه مورد مطالعه، سنجش زمان مرگ سلول انجام شد. همچنین تأثیر مهاری تشکیل ریسه، سنجش فعالیت آنزیم آسپارتیل پروتئیناز و آنالیز میزان بیان ژن *SAP1* در *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل مورد سنجش قرارگرفت.

روش کار

تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل: (Ferulago carduchorum Boiss) باکسب اطلاعات از اداره کل جهادکشاورزی استان کهگیلویه و بویر احمددرموردمحل رویش طبیعی گیاه چویل در فصل بهار از ارتفاعات استان کهگیلویه و بویر احمد جمع آوری گردید، سپس توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج تایید علمی شد. نمونه‌های گیاهی بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی انتقال یافت. پس از تمیزکردن وشستوشو با آب مقطر استریل، اندام‌های برگ و ساقه گیاه را قطعه قطعه نموده و درشرایط سایه خشک گردید. یک گرم پودر الک شده (الک شماره ۸۰) برگ و ساقه گیاه چویل با ۵ میلی لیتر آب مقطر و یا اتانول (۹۶ درصد) به روش خیساندن عصاره گیری شد. پس از سوکسیله کردن عصاره‌ها، از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد. برای استریل نمودن عصاره‌ها از میلی پور فیلتر ۰/۲۲ میکرون (Durapore, Millipore)) استفاده شد [۱۳]. تهیه رقت از عصاره‌ها: دامنه رقت عصاره های آبی و اتانولی اندام های برگ و ساقه گیاه چویل ۱۰۰-۰/۰۴۹ میلی گرم/میلی لیتر بود. عصاره‌های گیاهان مورد مطالعه در یخچال و در دمای منهای ۴ درجه سلیسیوس در ظروف تیره رنگ شیشه‌ای نگه داری گردید. اسیدیته عصارهای آبی و اتانولی اندامهای برگ و ساقه گیاه چویل ۷ در نظرگرفته شد. شایان ذکر است که از عصاره‌ها به صورت تازه استفاده شد. علاوه بر این، از فلوکونازول (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) با دامنه رقت ۶۴-۰/۰۳۱ میکرو گرم/میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. نمونه گیری، جداسازی، شناسایی و نگه داری *کاندیدا آلبیکانس*: در مطالعه مقطعی حاضر، نمونه‌ها به طور تصادفی از نقاط مختلف بدن بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی (افراد مبتلا به سرطان و ایدز) بستری در بیمارستان‌های یاسوج توسط سواب آغشته به سرم فیزیولوژی جمع آوری و بلافاصله بر روی محیط کشت سابوراد دکستروز آگار (SDA: Sabouraud Dextrose Agar) حاوی کلرامفنیکل (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) کشت داده شد. با توجه به روش‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* شناسایی گردید [۱۴]. با استفاده از مرفولوژی میکروسکپی و ماکروسکپی، تولید لوله زایا، هیدرولیز اوره و کشت بر روی محیط کشت کروم آگار *کاندیدا* (CHROMagar Company, France) *کاندیدا آلبیکانس* شناسایی گردید. جدایه های *کاندیدا آلبیکانس*در محیط کشت سابوراد دکستروز مایع (SDB, Difco) حاوی کلرامفنیکل و ۲۰ درصد گلیسرول در دمای منهای ۲۰ درجه سلسیوس نگه داری شدند. علاوه بر این، از سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 به عنوان کنترل کیفیت استفاده گردید. ارزیابی تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل: مطابق دستورالعمل استاندارد تست حساسیت سنجی دایلوشن براث برای مخمرها (CLSI, M_{27}–A_3)، از فاز لگاریتمی جدایه های *کاندیدا آلبیکانس* و سویه استاندارد سوسپانسیون میکروبی به کدورت معادل نیم مک فارلند (1×10^6-5×10^6 CFU/ml) درسرم فیزیولوژی تهیه گردید. سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با روش ویبل کانت حدود 1×10^6-5×10^6 سلول مخمری در میلی لیتر مورد تأیید قرار گرفت. سپس به میزان ۱:۱۰۰ با سرم فیزیولوژی رقیق نموده و در مرحله بعد به میزان ۱:۲۰ در محیط کشت استریل SDB رقیق گردید و در نهایت سوسپانسیون حاصل دارای $0/5$-$2/5\times10^3$ سلول مخمر در میلی لیتر بود که با روش ویبل کانت تأیید گردید. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره ها (MIC) در میکروپلیت های ۹۶ چاهکی (Brand 781660, Wertheim, Germany) بعد از ۲۴ ساعت تعیین شد [۱۵].

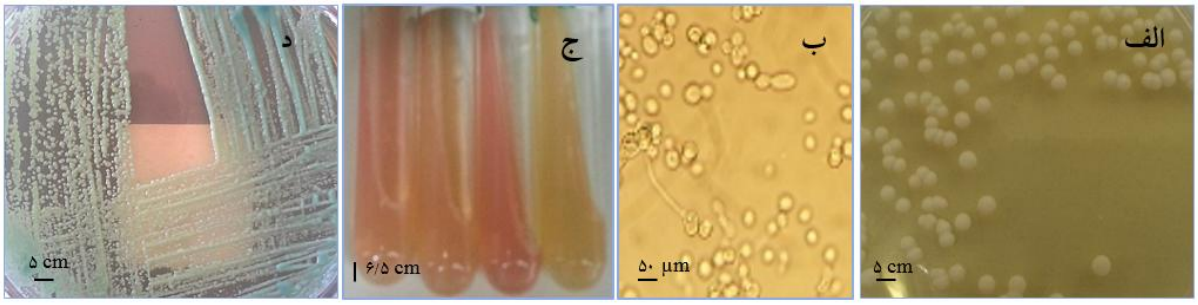
سنجش زمان مرگ سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس*: برای سنجش زمان مرگ سلول، ۵ میلی لیتر ماده تلقیحی *کاندیدا آلبیکانس*، 1×10^6-5×10^6 سلول/ میلی لیتر در لوله فالکون تهیه گردید. ۵ میلی لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC استفاده شد. سپس در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و در فواصل زمانی متوالی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت SDA کشت چمنی داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تعداد کلنی‌ها شمارش شدند. تعداد کلنی‌های ۳۰۰-۳۰ عدد قابل شمارش می‌باشند. تعداد سلول‌های مخمری در میلی لیتر برابر تعداد کلنی ضربدر عکس رقت می‌باشد [۱۳]. تأثیر قارچ کشی یا توقف رشد قارچ به ترتیب ≥ ۹۹/۹ و > CFU۹۹/۹/میلی لیتر از ماده تلقیحی اولیه در نظر گرفته شد.

تشکیل ریسه *کاندیدا آلبیکانس*: ارزیابی تشکیل ریسه *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل (موثرترین عصاره بر اساس MIC) از روش خداوندی و همکارن [۱۶] استفاده شد. ۴ میلی لیتر *کاندیدا آلبیکانس* باتراکم سلولی 1×10^6-5×10^6 سلول/ میلی لیتر به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC به میکروپلیت ۶ چاهکی کشت سلولی که در کف پلیت کاور اسلیپ استریل قرار داده شده، اضافه گردید. سپس در ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد. مرحله بعد مخلوط را به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس همراه با تکان دادن گرمخانه گذاری شد. محلول رویی برای انجام استخراج RNA استفاده شد. در نهایت ریسه‌های تشکیل شده روی کاور اسلیپ شستشو داده شده با سرم فیزیولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. سنجش فعالیت آنزیم آسپارتیل پروتئیناز *کاندیدا آلبیکانس*: فعالیت آنزیم آسپارتیل

پروتئیناز *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC مطابق روش مک دونالد و اودز [۱۷] انجام شد. ماده تلقیحی تازه *کاندیدا آلبیکانس* در ۵ میلی لیتر محیط کشت پایه پپیست کربن (YCB,Difco) و BSA (۱۱/۷ گرم/لیتر YCB، ۱۰ گرم/لیتر گلوکز، ۵ گرم/لیتر آلبومین سرم گاوی فراکشن V (Sigma–Aldrich) کشت داده و در ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت همراه با تکان ملایم ۲۰۰rpm گرمخانه گذاری شد. فعالیت پروتئولیز نیز با اندازه گیری افزایش محصولات محلول‌تری کلرواستیک اسید جذب شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر در سه بار تکرار بعد از انکوباسیون محلـــول رویـــی کشت با سوبسترا آلبومین سرم گاوی در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس تعیین شد. فعالیت پروتئولیز اختصاصی به عنوان نسبت جذب ۲۸۰ نانومتر به ۶۰۰ نانومتر میزان کشت بیان شد. میزان جذب نوری کمتر از ۰/۰۲ به عنوان منفی تلقی گردید. آنالیز نیمه کمی بیان ژن *SAP1* *کاندیدا آلبیکانس*: سوسپانسیون مخمری تیمار شده جمع آوری شده از مرحله تشکیل ریسه در میکروپلیت ۶ چاهکی به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس پلت ایجاد شده با سرم فیزیولوژی سه بار شستشو داده شد. با استفاده از کیت RNeasyMini مخصوص سلول‌های مخمری (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با اندکی تغییرات استخراج RNA کل انجام گرفت. جهت حذف DNA ژنومی، آنزیم RNase free DNase set (Qiagen) استفاده شد. کیفیت RNA با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد (حجم در وزن) دناتوره شونده با فرمالدهید با ولتاژ ۷۰ به مدت ۴۵ دقیقه بررسی شد و غلظتها و نسبت جذب نوری RNA جهت سنجش خلوص RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر (NanoDrop TechnologiesInc., Wilmington, DE) مورد سنجش قرار گرفت. نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۳۰ RNA استخراج شده درآب عاری از نوکلئاز بالاتر از ۲ گزارش شد. برای سنتز cDNA مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنتز cDNA (Fermentas, USA) ۰/۵ میکروگرم از RNA کل با آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و پرایمرهای هگزامر تصادفی واکنش داده شد و از cDNA سنتز شده به عنوان الگو برای تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز استفاده گردید [۱۸]. واکنش زنجیره‌ای پلی مرازشامل ۵ میکرولیتر بافر Taq ۱۰X (Fermentas)، ۱ میکرولیتر dNTP 10 میلی‌مولار (Fermentas)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای بالادست و پایین دست *SAP1* (Bioneer, Korea) (F: 5'GCATTCTTGGCAATAACTCC3' و اکتین (F: 5'ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC3' R: 5'GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA3') طراحی شده توسط خداوندی و همکاران [۱۶]، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (Fermentas)، ۱ میکرولیتر cDNA و مقدار مناسب آب دیونیزه (سیناژن، ایران) تا حجم ۲۵ میکرولیتر آماده گردید. شرایط تکثیر مطابق دستور: چرخه ۱ (1x)؛ مرحله ۱، ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ چرخه ۲ (۲۶x)؛ مرحله ۱، ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه؛ مرحله ۲، ۵۶/۸ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه؛ مرحله ۳، ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه؛ چرخه ۳ (1x)؛ مرحله ۱، ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Techno, Germany) انجام گرفت. برای اطمینان از اینکه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ناشی از DNA ژنومی نباشد، برای هر نمونه کنترل منفی داخلی بدون آنزیم ترانس کریپتاز معکوس تهیه شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل آگارز کالیبره ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و با استفاده از تصویرساز ژل داک (Bio-Rad,USA) مشاهده گردید. آنالیز میزان بیان ژن با استفاده از نرم افزار Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad, USA, version 4.6) بر اساس حجم باندهای ایجاد شده و با استفاده از فرمول: تغییر در بیان ژن = میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس (اکتین) در نمونه‌های تیمار شده/میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه کنترل بدون تیمار، انجام شد. پس از محاسبات آماری ژن‌هایی که تغییر در بیان به میزان ۲≤ و یا ۰/۵≥ داشتند به ترتیب به عنوان افزایش بیان ژن و کاهش بیان ژن در نظر گرفته شد [۱۱]. طرح مطالعه و آنالیز آماری: مطالعه مقطعی حاضر به صورت طرح کاملاً تصادفی و آزمایش‌ها به صورت ۲ تکرار ۳ تایی انجام گرفت. تحلیل آماری با بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه با استفاده نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ (SPSSInc., Chicago, IL) انجام شد. اختلاف درون گروه‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی انجام گرفت. میزان اختلاف معنی دار بودن در سطح ($P < ۰/۰۵$) در *نظر گرفته* شد.

یافته‌ها

از نمونه‌های بالینی جمع آوری شده از بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی ۱۰ جدایه *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از مرفولوژی تولید کلنی کرم رنگ ماهواره‌ای شکل بر روی محیط کشت SDA، تولید لوله زایا، عدم هیدرولیز اوره و تولید کلنی سبز رنگ بر روی محیط کشت کـــروم آگـــار *کاندیـــدا*شناسایی گردید (تصویر ۱).



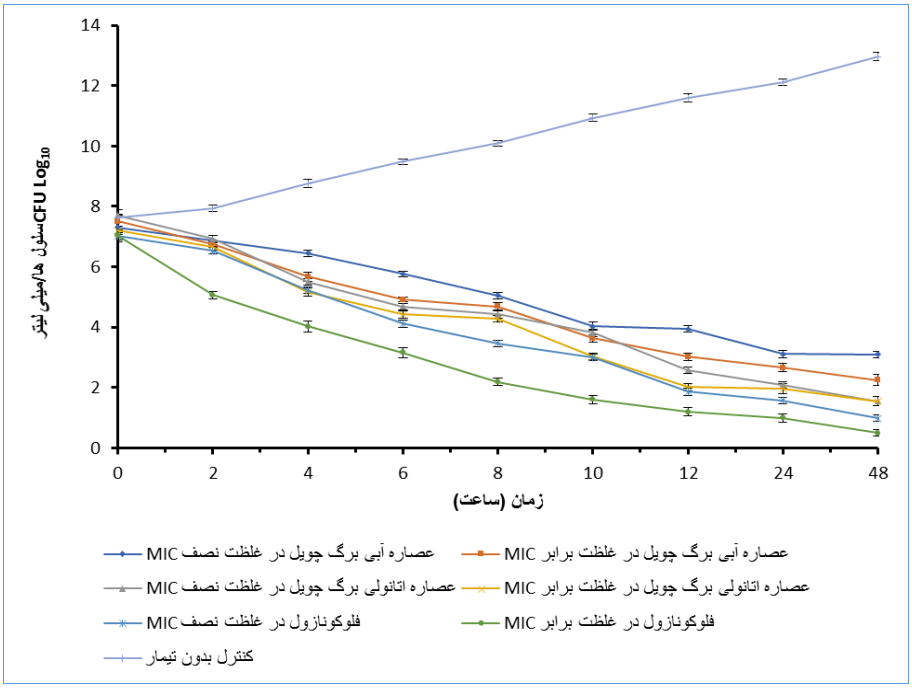
تصویر ۱: شناسایی *کاندیدا آلبیکانس*. الف: تشکیل کلنی ماهواره‌ای کرم رنگ بر روی محیط کشت SDA، ب: تولید لوله زایا در سرم، ج: عدم هیدرولیز اوره توسط *کاندیدا آلبیکانس*، د: تشکیل کلنی سبز رنگ بر روی محیط کشت کـــروم آگـــار *کاندیـــد*

جدول ۱: نتایج حاصل از ارزیابی تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل در زمان تیمار ۲۴ ساعت به روش میکرودایلوشن براث علیه *کاندیدا آلبیکانس*

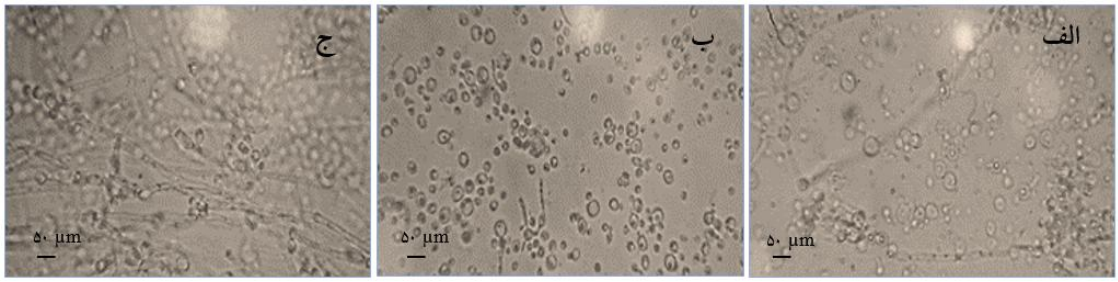
جدایه ها/ عصاره‌های مورد آزمایش	MIC				
	برگ چویل*		ساقه چویل*		فلوکونازول**
	عصاره آبی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	عصاره اتانولی	
کاندیدا آلبیکانس ATCC 14053	۱۲/۵۰	۶/۲۵	۲۵/۰۰	۱۲/۵۰	۱۶/۰۰
جدایه ۱	۵۰/۰۰	۱۲/۵	۵۰/۰۰	۲۵/۰۰	۱۶/۰۰
جدایه ۲	۵۰/۰۰	۶/۲۵	۵۰/۰۰	۱۲/۵۰	۳۲/۰۰
جدایه ۳	۱۲/۵۰	۶/۲۵	۲۵/۰۰	۶/۲۵	۸/۰۰
جدایه ۴	۲۵/۰۰	۱۲/۵۰	۵۰/۰۰	۲۵/۰۰	۱۶/۰۰
جدایه ۵	۵۰/۰۰	۲۵/۰۰	۵۰/۰۰	۵۰/۰۰	۱۶/۰۰
جدایه ۶	۲۵/۰۰	۱۲/۵۰	۲۵/۰۰	۲۵/۰۰	۱۶/۰۰
جدایه ۷	۵۰/۰۰	۲۵/۰۰	۵۰/۰۰	۵۰/۰۰	۳۲/۰۰
جدایه ۸	۲۵/۰۰	۱۲/۵۰	۲۵/۰۰	۶/۲۵	۳۲/۰۰
جدایه ۹	۲۵/۰۰	۲۵/۰۰	۵۰/۰۰	۵۰/۰۰	۱۶/۰۰
جدایه ۱۰	۲۵/۰۰	۱۲/۵۰	۵۰/۰۰	۲۵/۰۰	۸/۰۰

*(میلی گرم/میلی لیتر)

**(میکروگرم/میلی لیتر)



تصویر ۲: نتایج حاصل از سنجش زمان مرگ سلول های *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 تیمار شده با عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC



تصویر ۳: تشکیل ریسه در *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC. الف: غلظت نصف MIC، ب: غلظت برابر MIC و ج: نمونه بدون تیمار. مشاهده شده توسط میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۴۰ X

نتایج حاصل از آزمون تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های گیاه چویل نشان داد که در مقایسه با داروی استاندارد فلوکونازول عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل بر روی جدایه های بالینی و سویه استاندارد ATCC *کاندیدا آلبیکانس* مؤثر بوده است. نتایج حاصل از آزمون حساسیت سنجی ضد کاندیدیایی میکرودایلوشن براث نشان داد که عصاره آبی برگ گیاه چویل دارای MIC ۵۰-۱۲/۵۰ میلی گرم/ میلی لیتر، همچنین عصاره اتانولی برگ گیاه چویل دارای ۲۵-۶/۲۵ میلی گرم/ میلی لیتر بود. علاوه بر این، MIC عصاره آبی ساقه گیاه چویل ۵۰-۲۵ میلی گرم/ میلی لیتر و MIC عصاره اتانولی ساقه گیاه چویل ۵۰-۶/۲۵ میلی گرم/ میلی لیتر، بوده است. علاوه بر این، نتایج MIC نشان داد که مؤثرترین عصاره علیه *کاندیدا آلبیکانس*، عصاره اتانولی برگ چویل بوده است (جدول ۱).

تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه چویل علیه*کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 با استفاده از مطالعه زمان مرگ سلول‌ها با شمارش CFU/میلی لیتر در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC سنجیده شد. نتایج نشان داد که فلوکونازول در غلظت برابر MIC و نصف MIC به ترتیب دارای تأثیر قارچ کشی (≥ ۹۹/۹ کاهش در تعداد CFU/میلی لیتر از ماده تلقیحی اولیه) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بوده است. در حالی که در بازه زمانی مورد مطالعه عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه چویل دارای اثر توقف رشد (< ۹۹/۹ کاهش در تعداد CFU/میلی لیتر از ماده تلقیحی اولیه) علیه *کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 بودند (تصویر ۲). مطالعه زمان مرگ سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 تیمار شده با عصاره‌های آبی و اتانولی ساقه گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC نشان دهنده توقف رشد بوده است (داده‌ها نشان داده نشده است).

با استفاده از میکرسکوپ نوری تولید ریسه در سلول های*کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC مورد مطالعه قرار گرفت. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون کاهش تولید ریسه به وضوح مشاهده گردید (تصویر ۳).

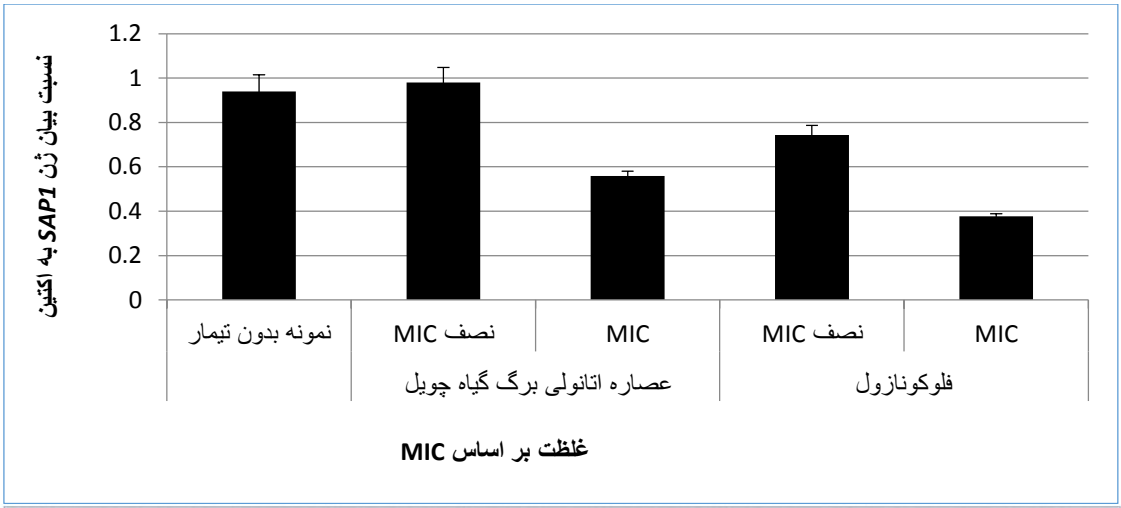
جدول ۲ مقاسیه تولید آنزیم آسپارتیل پروتئیناز در *کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل و داروی استاندارد فلوکونازول در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC را نمایش داده است. همان گونه که مشاهده می‌گردد در مقایسه با کنترل بدون تیمار*کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده باعصاره اتانولی برگ گیاه چویل موجب کاهش تولید آنزیم آنزیم آسپارتیل پروتئیناز شده که با افزایش غلظت عصاره کاهش بیشتری مشاهده گردید.

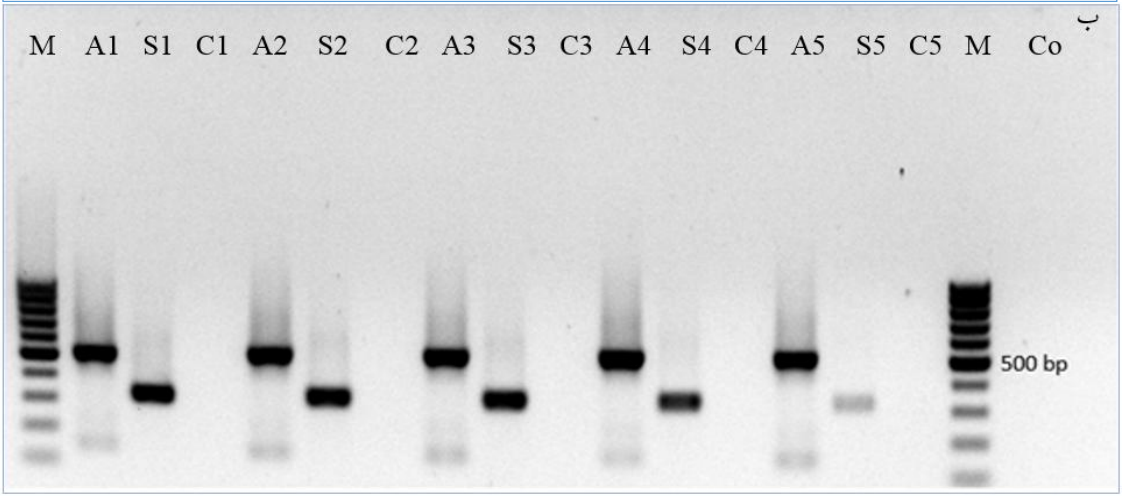
تصویر ۴ نتایج حاصل از تکثیر قطعه ۳۲۵ جفت بازی ژن *SAP1* و قطعه ۵۱۶ جفت بازی را برای ژن مرجع اکتیندر *کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل و داروی استاندارد فلوکونازول نشان داده است. آنالیز نیمه کمی بیان ژن *SAP1* نشان داد که داروی استاندارد فلوکونازول در هر دو غلظت مورد آزمایش که برابر MIC و نصف MIC بوده است، به ترتیب در سطوح معنی دار $P \leq ۰/۰۰۱$ و $P \leq ۰/۰۵$ با کنترل بدون تیمار اختلاف داشته است و به عبارت دقیقتر در این دو غلظت بکار رفته بیان ژن مولد آنزیم آسپارتیل پروتئیناز به طور محسوس و معنی داری تغییر یافته است. با محاسبات دقیق‌تر مشخص گردید که در رقت بالاتر، داروی فلوکونازول توانسته است بیان ژن مولد آنزیم آسپارتیل پروتئیناز را به میزان ۲/۵۱ برابر نسبت به کنترل بدون تیمار کاهش دهد، در صورتی که غلظت رقیق‌تر دارو (معادل نصف MIC) بیان ژن ذکر شده را در *کاندیدا* به میزان ۱/۲۰ برابر کاهش داده است. در خصوص اثر عصاره اتانولی برگ چویل نیز تا حدودی کاهش بیان ژن مشاهده شده است ولی این عصاره نتوانسته است در حد داروی استاندارد فلوکونازول از بیان ژن مولد آنزیم آسپارتیل پروتئیناز در *کاندیدا آلبیکانس* ممانعت کند با توجه به نتایج حاصل مشاهده شده است که عصاره مذکور در غلظت بیشتر (برابر MIC) توانسته است میزان بیان ژن ذکر شده را به میزان ۱/۶۸ برابر نسبت به کنترل بدون تیمار کاهش دهد و این روال کاهشی در سطح $P \leq ۰/۰۵$ معنی دار بوده است، اما در غلظت کمتر (نصف MIC) قادر به کاهش بیان ژن نبوده است ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۲: نتایج حاصل از سنجش آنزیم آسپارتیل پروتئیناز در *کاندیدا آلبیکانس* *ATCC* 14053 تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC

غلظت عوامل ضد قارچی	میانگین ± انحراف معیار جذب ۲۸۰ نانومتر به ۶۰۰ نانومتر	
	عصاره اتانولی برگ گیاه چویل	فلوکونازول
نصف MIC	^{a}۰/۰۵ ± ۰/۰۸	^{a} ۰/۰۳ ± ۰/۰۳
برابر MIC	^{b}۰/۰۴ ± ۰/۰۴	^{a}۰/۰۳ ± ۰/۰۱
کنترل بدون تیمار	^{c}۰/۰۶ ± ۰/۰۶	^{b}۰/۰۶ ± ۰/۰۶

$^{a-c}$ میانگین ± انحراف معیار در هر تیمار، مقادیر با حروف غیرمشابه در هر ستون وجود اختلاف معنی دار در در سطح $P<0.05$ در ۲ تکرار ۳ تایی آزمایش می‌باشد





تصویر ۴: الف: میزان بیان ژن *SAP1* در *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل در غلظت‌های معادل نصف MIC و برابر MIC. ب: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن *SAP1* بر روی ژل آگاروز. M: مارکر، A1: اکتین در کنترل بدون تیمار، S1:*SAP1* در کنترل بدون تیمار، C1: کنترل داخلی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس، A2: اکتین در غلظت عصاره نصف MIC، S2:*SAP1* در غلظت عصاره نصف MIC، C2: کنترل داخلی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس، A3: اکتین در غلظت عصاره برابر MIC، S3:*SAP1* در غلظت عصاره برابر MIC، C3: کنترل داخلی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس، A4: اکتین در غلظت فلوکونازول نصف MIC، S4:*SAP1* در غلظت فلوکونازول نصف MIC، C4: کنترل داخلی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس، A5: اکتین در غلظت فلوکونازول برابر MIC، S5:*SAP1* در غلظت فلوکونازول برابر MIC، C5: کنترل داخلی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس، M: مارکر، Co: کنترل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

بحث

مقاومت روز افزون قارچ‌ها به آنتی بیوتیک ها موجب شده تا پژوهشگران به فکر جایگزین کردن عوامل ضد قارچی با منشاء گیاهی مؤثر و با عوارض جانبی کم‌تر به جای مواد ضد قارچی شیمیایی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بیشتر باشند، عصاره‌های گیاهی حاوی ترکیبات مؤثره‌ای هستند که خواص ضد میکروبی علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها را دارند. این اثرات ضد میکروبی علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و قارچ‌ها در پژوهش‌های مختلفی بررسی شده است. گیاه چویل یکی از گیاهان دارویی طبیعی بومی مناطق کوهستانی است که خواص ضد میکروبی گونه‌های مختلف آن به اثبات رسیده است [۸-۱۱]. مطالعات نشان داده است که گیاه چویل دارای فعالیت ضد قارچی قوی علیه *کاندیدا آلبیکانس* می‌باشد [۸، ۱۱، ۱۹، ۲۰]. در مطالعه حاضر، تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل علیه *کاندیدآلبیکانس* سنجش شد. نتایج سنجش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل علیه *کاندیدآلبیکانس* به روش میکرودایلوشن براث نشان‌دهنده تاثیر ضد کاندیدیایی عصاره‌های مورد مطالعه بوده است که با مطالعات قبلی همخوانی داشته است [۸، ۱۱]. همچنین نتایج حاصل ازمطالعه زمان مرگ سلول، تأثیر توقف رشد سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* توسط عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و ساقه گیاه چویل نشان داده شد. گیاه چویل حاوی ترکیبات فنلی است به همین دلیل دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشد [۱۲]. یکی از فاکتورهای ضروری برای کلونیزاسیون *کاندیدا آلبیکانس* در بدن انسان توانایی تولید ریسه و نفوذ به درون سلول میزبان می‌باشد [۱، ۲]. لذا تأثیر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل (موثرترین عصاره بر *کاندیدا آلبیکانس*) بر تشکیل

ریسه مورد سنجش قرار داده شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره میزان تولید ریسه کاهش یافت. نتایج حاصل با مطالعه انجام شده توسط خداوندی و همکاران [۱۶] همخوانی دارد. پس از اتصال *کاندیدا آلبیکانس* به سطوح سلول‌های بدن و نفوذ به درون سلول آنزیم‌های هیدرولیز کننده از قبیل آسپارتیل پروتئیناز ترشح می‌نمایند [۳, ۴]. سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل موجب کاهش آنزیم آسپارتیل پروتئیناز گردید. لذا با تیمار عصاره مورد مطالعه توانایی بیماریزایی *کاندیداآلبیکانس* نیز کاهش خواهد یافت. ردی و همکاران [۲۱] تأثیر ضد کاندیدیایی عصاره هگزانی دانه سیب فیلی بر مهار تولید آنزیم آسپارتیل پروتئیناز مورد سنجش قرار دادند. نتایج نشان دهنده نقش مهاری غلظت‌های مختلف عصاره مورد مطالعه در آنزیم آسپارتیل پروتئیناز بوده است. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن *SAP1* در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشته است و در مقایسه باکنترل بدون تیمار، بیان نسبی ژن *SAP1* *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل کاهش نشان داده است. در *کاندیدا آلبیکانس*، تولید آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ۱ توسط ژن *SAP1* کد گذاری می‌گردد. لذا کاهش بیان ژن *SAP1* موجب کاهش تولید آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ۱ و در نتیجه مهار توانایی بیماریزایی *کاندیدا* می‌گردد [۳-۵]. خداوندی و همکاران [۱۶]، بیان ژن‌های SAP 1-4 در *کاندیدا آلبیکانس*تیمار شده با آلیسین مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان دهنده نقش مهاری آلیسین در تولید ریسه و تغییر بیان ژن‌های SAP 1-4 بوده است. همچنین بیان نسبی ژن‌های SAP 1-3 در *کاندیدا آلبیکانس*تیمار شده با کارواکرول در جدایه های مقاوم به فلوکونازول مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش بیان این ژن‌های مورد مطالعه بوده است [۲۲]. تأثیر ضد کاندیدیایی اولئوروپین، ترکیب فنلی موجود در گیاه زیتون توسط زوریک و همکاران [۲۳]، ارزیابی شده است، همچنین تأثیر ماده خالص مذکور را بر مهار تولید آنزیم آسپارتیل پروتئینازبررسی نموده است. نتایج نشان داده است که MIC اولئوروپین علیه *کاندیدا آلبیکانس* ۱۲/۵ میلی گرم/ میلی لیتر بوده است. علاوه بر این، نتایج مطالعه مذکور نشان دهنده تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* تیمار شده با اولئوروپین بوده است. همچنین اولئوروپین قادر به مهار تولید آنزیم آسپارتیل پروتئیناز است.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر فعالیت ضد قارچی عصاره اتانولی گیاه چویل در مهار آنزیم آسپارتیل پروتئیناز *کاندیدا آلبیکانس* را تا حدودی تأیید نمود. این که آیا دقیقاً گیاه چویل موجب مهار بیان ژن‌های دخیل در سنتز آنزیم آسپارتیل پروتئیناز می‌گردد، نیاز به بررسی بیشتر دارد. به هر حال، *SAP1* می‌تواند هدف مولکولی احتمالی تأثیر ضد کاندیدیایی گیاه چویل در *کاندیدا آلبیکانس* باشد. آگاهی از مکانیسم‌های مولکولی تأثیر عوامل ضد قارچی می‌تواند به عنوان راهنمای ارزنده‌ای برای توسعه استراتژی‌های درمانی مدرن استفاده گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج و آزمایشگاه پاتوبیولوژی دنای یاسوج به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این طرح و دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج که در شناسایی و تأیید علمی گیاه چویل همکاری نمودند، کمال امتنان را دارند. (تصویب علمی پروپوزال با مجوز شماره ۱۲۱۵۱۶۰ دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج انجام گرفت.)

References

1. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28. DOI: 10.4161/viru.22913 PMID: 23302789
2. Naglik JR, Richardson JP, Moyes DL. *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity. PLoS Pathog. 2014;10(8):e1004257. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004257 PMID: 25121985
3. Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of C. albicans virulence and omics approaches on host–pathogen interaction: a review. Int J Mol Sci. 2016;17(10). DOI: 10.3390/ijms17101643 PMID: 27763544
4. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003;67(3):400-28. PMID: 12966142
5. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses. 2005;48(6):365-77. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x PMID: 16262871
6. Schild L, Heyken A, de Groot PW, Hiller E, Mock M, de Koster C, et al. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans Sap9* and *Sap10*. Eukaryot Cell. 2011;10(1):98-109. DOI: 10.1128/EC.00210-10 PMID: 21097664
7. Staniszewska M, Bondaryk M, Siennicka K, Kurek A, Orlowski J, Schaller M, et al. *In vitro* study of secreted aspartyl proteinases *Sap1* to *Sap3* and *Sap4* to *Sap6* expression in *Candida albicans* pleomorphic forms. Pol J Microbiol. 2012;61(4):247-56. PMID: 23484407
8. Taran M, Ghasempour HR, Shirinpour E. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. carduchorum. Jundishapur J Microbiol. 2010;3:10-4.
9. Shahbazi Y, Shavisi N, Karami N, Kakaei S. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss essential oil. Pharmac Sci. 2015;21(1):6. DOI: 10.15171/PS.2015.10
10. Ghasemi Pirbalouti A, Izadi A, Malek Poor F, Hamedi B. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from *Ferulago angulata*. Pharm Biol. 2016;54(11):2515-20. DOI: 10.3109/13880209.2016.1162816 PMID: 27102982
11. Alizadeh F, Khodavandi A, Faraji FS. *Malva sylvestris* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. J Herbmed Pharmacol. 2017;6(2):62-8.
12. Hosseini N, Akbari M, Ghafarzadegan R, Changizi Ashtiyani S, ShahMohammadi R. Total phenol, antioxidant and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Ferulago angulata* ssp. Angulata. Angulata J Med Plants. 2012;11(43):80-9.
13. Khodavandi A, Nazira A, Poh W, Phelim Y, Alizadeh F, Harmal N, et al. Antifungal activity of *Rhizome coptidis and Alpinia galangal* against *candida* species. J Pure Appl Microbiol. 2013;7(3):1725-30.

14. Evans E, Richardson M. Medical Mycology: A Practical Approach (The Practical Approach Series). New York: Oxford University Press; 1989.
15. Rex JH, Alexander B, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown S, Chaturveli V, et al. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. 3rd ed: CLSI M27 -A3; 2008.
16. Khodavandi A, Alizadeh F, Harmal NS, Sidik SM, Othman F, Sekawi Z, et al. Expression analysis of *SIR2* and SAPs1-4 gene expression in *Candida albicans* treated with allicin compared to fluconazole. Trop Biomed. 2011;28(3):589-98. PMID: 22433888
17. Macdonald F, Odds FC. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. J Med Microbiol. 1980;13(3):423-35. DOI: 10.1099/00222615-13-3-423 PMID: 6997486
18. Khodavandi A, Alizadeh F, Namvar F, Rosfarizan M, Chong P. Anti-*Candida* potential of *Allium ascalonicum* Linn: antibiofilm activity and biomolecular mechanism of action. J Pure Appl Microbiol. 2014;8:349-56.
19. Pinto E, Hrimpeng K, Lopes G, Vaz S, Goncalves MJ, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32(10):1311-20. DOI: 10.1007/s10096-013-1881-1 PMID: 23619574
20. Golfakhrabadi F, Khanavi M, Ostad SN, Saeidnia S, Vatandoost H, Abai MR, et al. Biological activities and composition of *Ferulago carduchorum* essential oil. J Arthropod Borne Dis. 2015;9(1):104-15. PMID: 26114148
21. Reddy KH, Govender P, Reddy O, Sarma P. Effect of hexane extract of *Dillenia indica* seed on the activity of secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* and its kinetic studies. J Med Plants Res. 2012;6(44):5599-603.
22. Hosseini SS, Yadegari MH, Rajabibazl M, Ghaemi EA. Inhibitory effects of carvacrol on the expression of secreted aspartyl proteinases 1-3 in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. Iran J Microbiol. 2016;8(6):401-9. PMID: 28491252
23. Zoric N, Kopjar N, Bobnjaric I, Horvat I, Tomic S, Kosalec I. Antifungal activity of oleuropein against *Candida albicans*—the in vitro study. Molecules. 2016;21(12). DOI: 10.3390/molecules21121631 PMID: 27916806

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Volume 9, Issue 4, Winter 2018

Research Article

Inhibitory Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of Chavill Leaf and Stem on Aspartyl Proteinase Secreted from *Candida albicans*

Alireza Khodavandi [1], Fahimeh Alizadeh [2,*], Saeideh Hakimizadeh [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
*** Corresponding author:** Fahimeh Alizadeh, Assistant Professor, Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran. E-mail: mnalizadeh@yahoo.com, f.alizadeh@iauyasooj.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-090413

How to Cite this Article:
Khodavandi A, Alizadeh F. Inhibitory Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of Chavill Leaf and Stem on Aspartyl Proteinase Secreted from Candida albicans. JNKUMS. 2018; 9 (4) :90-98
URL: http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1318-fa.html

Received: 13 Aug 2017
Accepted: 10 Jan 2018

Keywords:
Candida albicans
Chavill
Hypha
SAP1

Abstract

Introduction: Chavill, *Ferulago carduchorum* Boiss, a member of *Apiaceae* family, has been extensively used from ancient times. The present study aimed at evaluating the inhibitory effect of aqueous and ethanolic extracts of chavill leaf and stem on aspartyl proteinase secreted from *Candida albicans*.

Methods: The current cross sectional study was conducted on 10 *C. albicans species* isolated from immunocompromised patients in Yasooj, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Iran. The anticandidal activities of the aqueous and ethanolic extracts of chevill leaf and stem were evaluated using the 24-hour broth microdilution CLSI (the Clinical and Laboratory Standards Institute) method. In addition, time-kill test was carried out to evaluate anticandidal activities of the extracts. Also, hyphal formation, Sap enzyme activity, and *SAP1*gene expression were investigated on the best plant extract tested.

Results: The current study data indicated that ethanolic extract of chavill leaf represented the highest antifungal activity compared with those of the other extracts ($P < 0.05$). The antifungal activity of chavill leaf ethanolic extract at 1x MIC and ½x MIC was associated with reduced number of yeast form, inhibited yeast-to-hyphal transition, and Sap enzyme activity. Finally, ethanolic extract of chavill leaf at 1x MIC displayed a significant down-regulation of *SAP1* (1.68 fold). The dose-response effect was observed in all laboratory tested parameters.

Conclusions: The results of the current study indicated that ethanolic extract of chavill leaf has an inhibitory effect on aspartyl proteinase secreted from *C. albicans*. In addition, the ethanolic extract of chavill leaf can significantly reduce the expression of virulence genes such as *SAP1* in *C. albicans*.