

Study of Antifungal Synergism Effects of Chitosan with Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate against *Candida Albicans*

Shohreh Fahimirad¹, Ehasn Zarei Mehrvarz², Samira Sadelaji³, Maryam Parhamfar⁴, Mojtaba Didehdar⁵, Hamid Abtahi⁶

1. Assistant Professor, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9991-0869.

2. MSc student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0065-0420.

3. MSc student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6573-8987.

4. MSc, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7085-5712.

5. Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4677-4768.

6. Professor, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. (Corresponding Author), Email: abtahi@arakmu.ac.ir, Tel: 086-34173502, ORCID ID: 0000-0002-3247-3289.

ABSTRACT

Background and Aim: Prevalence of drug resistance in *Candida Albicans* hinders common treatments with conventional antifungal drugs. A stockpile of research is being done to discover novel antifungal drugs. Chitosan has emerged as a promising antimicrobial and biodegradable polymer with various medical applications. The significant antimicrobial potential of some of the secondary metabolites from plants has been confirmed in several studies. Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate are three plant secondary metabolites with strong antifungal properties. In this study, the synergistic effect of Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate with chitosan against *C. Albicans* was tested.

Materials and Methods: The minimum inhibitory concentration and synergistic effects of chitosan with Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate were assessed in checkerboard assay. The minimum fungicidal concentrations against *C. Albicans*, time kill assay and growth curve were tested subsequently.

Results: The results of the checkerboard test confirmed the synergistic effects of chitosan with all three investigated plant metabolites. The Chitosan- Thymol combination represented the most effective antifungal activities against *C. Albicans* based on the time kill and growth curve assay results.

Conclusion: Chitosan- Thymol combination can be a promising compound for control of *C. albicans*. Chitosan- Thymol combination sharply declined the number of viable cells during the first two hours. This ability can be tested in further studies as a biopolymer or nano-capsulated drug.

Keywords: Chitosan, Thymol, Carvacrol, Isothiocyanate, *C. Albicans*

Received: May 18, 2019

Accepted: Jan 12, 2021

How to cite the article: Shohreh Fahimirad, Ehasn Zarei Mehrvarz, Samira Sadelaji, Maryam Parhamfar, Mojtaba Didehdar, Hamid Abtahi. Study of Antifungal Synergism Effects of Chitosan with Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate against *Candida albicans*. SJKU 2021;26(1):40-52.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مطالعه اثرات هم افزایی ضد قارچی کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس

شهره فهیمی راد^۱، احسان زارعی مهرورز^۲، سمیرا سادلجی^۳، مریم پرهام فر^۴، مجتبی دیده دار^۵، حمید ابطحی^۶

۱. استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۹۹۹۱-۰۸۶۹
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۰۰۶۵-۰۴۲۰
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۶۵۷۳-۸۹۸۷
۴. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۷۰۸۵-۵۷۱۲
۵. استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۴۶۷۷-۴۷۶۸
۶. استاد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: abtahi@arakmu.ac.ir ، تلفن: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۲۴۷-۳۲۸۹، کد ارکید: ۰۸۶۳۴۱۷۳۵۰۲

چکیده

زمینه و هدف: شیوع مقاومت دارویی در کاندیدا آلبیکنس، درمان های رایج با داروهای ضدقارچی متعارف را نا کارآمد ساخته است. تحقیقات زیادی برای کشف داروهای ضدقارچی جدید در حال انجام است. کیتوزان یک پلیمر ضد میکروبی و زیست تجزیه پذیر با کاربردهای مختلف درمانی می باشد. توانایی ضد یکروبی برخی از متابولیت های ثانویه گیاهان در مطالعات مختلف ثابت شده است. تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات سه ماده موثره گیاهی با خواص ضد قارچی قوی هستند. لذا این مطالعه، با هدف بررسی اثرات هم افزایی این سه متابولیت گیاهی با کیتوزان علیه کاندیدا آلبیکنس انجام شد.

مواد و روش ها: سنجش حداقل غلظت بازدارندگی و اثرات هم افزایی ترکیبات کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات با روش چکربرد انجام گرفت. در ادامه، حداقل غلظت کشندگی قارچ علیه کاندیدا آلبیکنس، روش کشتن در زمان و منحنی رشد آزمون شدند

یافته ها: نتایج حاصل از آزمون چکربرد اثر هم افزایی کیتوزان با هر سه ترکیب گیاهی مورد استفاده را تایید کرد. بر اساس نتایج حاصل از آزمون کشتن در زمان و منحنی رشد، ترکیب کیتوزان- تیمول موثرترین فعالیت کشتن قارچ کاندیدا آلبیکنس را داشت. **نتیجه گیری:** ترکیب کیتوزان- تیمول، می تواند یک ترکیب امیدبخش در کنترل کاندیدا آلبیکنس باشد. ترکیب کیتوزان- تیمول به طور چشمگیری تعداد سلولهای زنده را در دو ساعت اول آزمون کاهش داد. این توانایی می تواند در مطالعات بعدی به عنوان پلیمرهای زیستی یا نانو کپسوله های دارویی آزمون شود.

واژه های کلیدی: کیتوزان، تیمول، کارواکرول، ایزوتیوسیانات، کاندیدا آلبیکنس

وصول مقاله: ۹۸/۲/۲۸ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۹/۲۵ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۳

مقدمه

عفونت‌های قارچی نرخ بالایی از مرگ و میر را سبب می‌شوند و بیشتر از ۴۰٪ از عفونت‌های خونی به وسیله کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌شوند. محدودیت تعداد داروهای ضد قارچ فعلی، ظهور سیستماتیک عفونت‌های قارچی را تقویت کرده است و گسترش روز افزون مقاومت دارویی در کاندیدا آلبیکناسیاز برای داروهای ضد قارچی جدید با مکانیسم عملکردی نوین را افزایش داده است (۱-۳).

فلوکونازول یکی از انواع آزولهاست که مسیر بیوسنتز ارگوسترول را مورد هدف قرار می‌دهد و رایج‌ترین داروی مورد استفاده در مهار رشد گونه‌های کاندیدا می‌باشد. اما درمان طولانی و تکراری سبب ظهور و پیدایش ایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول در میان گونه‌های کاندیدا شده است. این امر به دلیل اثرات متعدد جانبی و مقاومت دارویی به عوامل پاتوژن پس از استفاده طولانی مدت از دارو می‌باشد (۴).

کیتوزان یک پلیمر زیستی است که از داستیله کردن کیتین حاصل می‌شود و در دیواره خارجی حشرات، پوسته سخت پوستان و دیواره قارچها یافت می‌شود. این پلیمر طبیعی، زیست سازگار و قابل تجزیه در محیط زیست و غیر سمی است و کاربردهای فراوانی در زمینه تحویل دارو و یا حامل آنزیم‌های مختلف دارد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوزان، این پلیمر را گزینه مناسبی برای کپسوله سازی مواد موثره گیاهی ساخته است (۵). کیتوزان در شرایط اسیدی حلالیت مطلوبی دارد اما در pH بالاتر از ۶/۵ حلالیت آن ناچیز است. کیتوزان دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. این فعالیت‌های ضد میکروبی اغلب به شکل بازدارندگی از رشد باکتری و قارچ است و فعالیت کشندگی آن کمتر به اثبات رسیده است. ثابت شده است که کیتوزان با مداخله در ریخت زایی دیواره سلولی قارچ مانع از رشد قارچها می‌شود (۶-۸).

گیاهان گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه با عملکردهای فراوان زیستی مطلوب تولید می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی کارکرد ویژه‌ای در محافظت گیاهان علیه پاتوژنهای بیماری‌زا و محافظت در برابر تنش‌های غیر زیستی دارند (۹-۱۱).

اثرات متقابل بین مواد موثره گیاهی می‌تواند منجر به اثرات آنتی میکروبی آنتاگونیستیک، افزایشی و یا هم‌افزایی شود. معمولاً به کارگیری چند ماده موثره گیاهی با هم می‌تواند سبب اختلال در چند فرآیند بیوشیمیایی مختلف شده و عوامل میکروبی را از بین ببرد. در سالهای اخیر گسترش مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک‌های رایج و افزایش علاقه به استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی، تحقیقات روی اثرات ضد میکروبی مواد موثره گیاهی را افزایش داده است (۱۲).

تیمول (۲-ایزوپروپیل-۵-متیلفنول) مهمترین منوترین فنولی جدا شده از گیاهان خانواده *Lamiaceae* شامل آویشن، پونه، ریحان و جنس نعنا وحشی می‌باشد. این ماده از نظر سازمان غذا و دارو در محدوده مواد ایمن و قابل استفاده به عنوان افزودنی‌های غذایی قرار گرفته است (۱۳-۱۵). مطالعات مختلف نشان داده است که تیمول خواص ضد عفونی کننده، ضد التهابی و آنتی کسیداتی قوی دارد. فیروبولاستها با قرارگیری در غلظتهای مختلف تیمول ($25 \mu\text{g/mL}$ تا 100) بعد از ۴۸، ۷۲ ساعت، تا ۹۶٪ زنده ماندند. فعالیت سیتوتوکسیکی تیمول بر روی سلولهای سلول‌های پرومونسیت در غلظت بیشتر از $400 \mu\text{g/mL}$ گزارش شده است (۱۶).

کارواکرول نیز یک منوترین فنولی است که فعالیت‌های زیستی مختلفی علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مقاوم به آنتی بیوتیک مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) دارد و فعالیت ضد قارچی آن علیه بیوفیل‌های *C. albicans*، *C. glabrata* و *C. parapsilosis* به اثبات رسیده است (۱۷).

ایزوتیوسیانات‌ها ترکیبات طبیعی گرفته شده از خانواده *Cruciferous* هستند که طی تبدیلات آنزیمی از متابولیت‌هایی به نام گلوکوزینولات‌ها به دست می‌آیند. این ترکیبات کاربردهای ضد میکروبی و ضد قارچی ثابت شده‌ای دارند و سالهاست به عنوان افزودنی در صنایع غذایی استفاده می‌شوند (۱۸، ۱۹).

در این مطالعه اثرات هم‌افزایی کیتوزان با سه ماده موثره گیاهی تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلیکنس سنجیده شد. هدف از این مطالعه یافتن بهترین ماده موثره گیاهی با بیشترین میزان هم‌افزایی با کیتوزان به عنوان یک پلیمر زیستی ضد قارچی علیه کاندیدا آلیکنس بود تا در مطالعات بعدی به عنوان فیلم‌ها یا نانو کپسول‌های ضد-میکروبی به شکل متصل با کیتوزان مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی در این پروژه از استیک اسید غلیظ، معرف رزوزارین، تیمول، کارواکرول، ایزوتیوسیانات و کیتوزان که از شرکت سیگما کره جنوبی و محیط کشت RPMI-1640 و سابورد کستروز آگار از شرکت مرک آلمان استفاده گردید. فعالیت‌های ضد قارچی علیه کاندیدا آلیکنس (ATCC 76615) که مقاوم به داروی فلوکونازول است سنجیده شد.

آماده‌سازی کیتوزان:

غلظت ۱/۲ w/v کیتوزان با حل کردن ۰/۰۶ گرم از کیتوزان در ۵ میلی لیتر از اسید استیک ۲٪ به دست آمد. pH محلول بعداً روی ۵/۶ تنظیم شد تا اثرات اسیدی محیط روی خصوصیات قارچ کشی تأثیری نگذارند (۲۰).

آماده‌سازی مواد موثره گیاهی:

بالاترین غلظتی که در بین پژوهش‌های مختلف به عنوان حداقل غلظت بازدارنده تیمول و کارواکرول علیه کاندیدا آلیکنس ذکر شده است، ۶۲۵ µg/mL می باشد. لذا ما اولین غلظت بالاتر حاصل دو به توان ۱۰ یعنی

۱۰۲۴ µg/mL را برای شروع انتخاب کردیم (۲۱). پودر تیمول و ایزوتیوسیانات پس از وزن کردن در دی متیل سولفات ۱٪ حل شد، تا غلظت نهایی ۱۰۲۴ µg/mL حاصل شود. محلول کارواکرول با استفاده از دی متیل سولفات ۱٪ به غلظت ۱۰۲۴ µg/mL رسید (۲۲)

آماده‌سازی قارچ:

سوسپانسیون سلولی کاندیدا آلیکنس بر اساس پروتکل CLSI M27-S4 آماده شد (۲۳). بر این اساس ابتدا کشت ایزوله قارچ کاندیدا آلیکنس بر روی محیط سابوروی دکستروز براث صورت گرفت و پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در ۳۵ °C قرار گرفتند. سپس چند کلونی با قطر حدود ۱ میلی‌متر در ۵ میلی لیتر محیط BHI مایع حل شد تا کدورت محیط در در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۱ برسد که تعداد سلول‌ها در این حالت، ۵×۱۰^۶ سلول در میلی لیتر می‌باشد. این سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد و بعد از ورتکس مجدداً به نسبت ۱:۲۰ رقیق سازی صورت گرفت تا تعداد سلول‌ها به ۵×۱۰^۳ رسید.

آماده‌سازی رزوزارین:

معرف رزوزارین (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) که در حالت محلول در آب به رنگ آبی است، در مطالعات زیستی به عنوان نشانگر زنده بودن سلول‌ها استفاده می‌شود. رزوزارین در اثر فعالیت‌های دهیدروژناز مولکول NADPH که در سلول‌های زنده صورت می‌گیرد و انتقال الکترونیهای H⁺ از NADPH⁺ به رزوروفین به رنگ صورتی تبدیل می‌شود. برای به دست آوردن محلول ۰/۰۲(w/v) رزوزارین، دو میلی گرم از پودر رزوزارین در ۲۰ میلی‌لیتر از آب مقطر اتوکلاو شده و استریل حل و ورتکس گردید (۲۴).

سنجش حداقل میزان بازدارندگی:

سنجش حداقل میزان بازدارندگی با استفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه پلی استری انجام شد. تحت شرایط استریل و با استفاده از سمپلر چند کاناله ۵۰ µL از محیط RPMI

1640 حاوی گلوکز ۲٪ به تمام خانه‌های پلیت از ستون یک تا ده اضافه شد. سپس ۵۰ μL از ترکیب ضد میکروبی مورد آزمون (کیتوزان، تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات) به خانه‌های ستون اول اضافه شد، بعد از یکنواخت نمودن مخلوط درون خانه‌ها، ۵۰ μL از سوسپانسیون یکنواخت درون خانه‌ها برداشته شد و به خانه‌های ستون دوم اضافه شد، بعد از پیپت کردن و ایجاد سوسپانسیون یکنواخت مجدداً ۵۰ μL از سوسپانسیون برداشته شد و به خانه‌های ستون سوم اضافه گشت، این روند رقیق سازی ترکیب ضد میکروبی به نصف غلظت ستون قبلی در هر ستون، تا ستون یازدهم ادامه داشت. در نهایت غلظت ترکیب مورد آزمون در خانه‌های ستون ده به $1 \mu\text{g/ml}$ رسید. سپس ۵۰ μL از سوسپانسیون آماده کاندیدا آلیکنس در شرایط استریل به تمام خانه‌ها از ستون یک تا ده اضافه شد. خانه‌های ستون یازده به عنوان کنترل مثبت آزمایش، تنها دارای ۱۰۰ μL از سوسپانسیون کاندیدا آلیکنس و خانه‌های ستون دوازده به عنوان کنترل منفی آزمایش و سنجش استریل بودن آزمون، فقط دارای ۱۰۰ μL از محیط کشت بودند. میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای 35°C انکوباتور قرار داده شد. سپس به هر یک از خانه‌های میکروپلیت ۲۰ μL از محلول آماده رزوزارین (۰/۰۲٪ w/v) اضافه شد و به مدت دو ساعت در انکوباتور و با دمای 35°C قرار داده شد. حداقل غلظتی از ترکیب که از رشد قارچ ممانعت به عمل آورد، حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration, MIC) در برابر آن کاندیدا آلیکنس ثبت شد (۲۵-۲۷).

تعیین حداقل غلظت قارچ کش:

۱۰۰ μL از سوسپانسیون درون چاهک مربوط به MIC و غلظت بالاتر آن در روی محیط سابورود کستروز آگار کشت شدند و برای ۴۸ ساعت در دمای 35°C قرار گرفتند. حداقل غلظتی که منجر به عدم رشد شد به عنوان حداقل غلظت قارچ کشی (Minimum fungicidal

concentration, MFC) معرفی گردید و از نتایج نسبت MFC/MIC برای تعیین خاصیت قارچ کشی استفاده شد، طوری که اگر نسبت بیشتر از ۴ بود استاتیک و کمتر از ۴ کشنده است (۱۶).
اثر هم‌افزایی:

اثر هم‌افزایی کیتوزان و تیمول، کیتوزان و کارواکرول، کیتوزان و ایزوتیوسیانات با استفاده از آزمون رقت چکربورد علیه کاندیدا آلیکنس تست شد.
چکربورد می‌تواند اثرات هم‌افزایی، افزایشی و آنتاگونیستیک و یا عدم وجود اثر متقابل دو ترکیب ضد میکروبی مورد استفاده را نشان دهد. اثرات متقابل دو ترکیب در شرایط آزمایشگاهی، معمولاً بر اساس شاخص غلظت مهارتی فراکشنال (Fractional inhibitory concentration, FIC) ارزیابی می‌شود. FIC هر ترکیب ضد میکروبی مورد مطالعه به عنوان مثال ماده A برابر است با MIC آن ماده A در آزمون هم‌افزایی و در ترکیب با ماده B، تقسیم بر MIC خود ماده A نظر هنگامی که به تنهایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس شاخص FIC از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$FIC_1 = FIC_A + FIC_B$$

تفسیر میزان هم‌افزایی بر اساس فرمول زیر به دست می‌آید:
۰/۵ < FIC_۱ نشان دهنده اثر هم‌افزایی، FIC_۱ بین ۰/۵ و ۰/۷۵ نشانگر اثر هم‌افزایی نسبی، FIC_۱ بین ۰/۷۶ و ۱ اثر افزایشی، ۱-۴ > FIC_۱ نشان دهنده عدم تاثیر مواد روی هم و ۴ > FIC_۱ نشان دهنده اثر بازدارندگی هم خواهد بود (۲۸).

روش کشتن در زمان:

ابتدا سوسپانسیون سلولی قارچ با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. برای هر آزمون چهار فالكون با ۱۰ میلی‌لیتر از سلولهای قارچ با کدورت گفته شده مورد نیاز است. در این تحقیق، کیتوزان و هریک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه، با غلظت دو برابر MIC علیه کاندیدا آلیکنس به شکل تنها و یا همراه با یکدیگر به کار گرفته شدند. سپس در فواصل

تمام بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین تی تست در نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) انجام گرفت. سطوح معنی داری ۰/۰۵ < p در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سنجش حداقل میزان بازدارندگی:

ترکیب کیتوزان با هر سه ماده تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلیکس اثر هم‌افزایی نشان داد. هر چند تیمول و کارواکرول به ترتیب حداقل و حداکثر میزان MIC علیه کاندیدا آلیکس را در بین سایر ترکیبات نشان دادند (جدول ۱).

تعیین حداقل غلظت قارچ کش:

ترکیب کیتوزان- تیمول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات اثرات هم‌افزایی بالایی علیه کاندیدا آلیکس مقاوم به فلوکونازول نشان دادند. در حالیکه این ترکیبات در زمان استفاده به شکل مجزا، بازدارنده رشد قارچ بودند، استفاده هم‌زمان کیتوزان- تیمول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات منجر به کشتن کامل قارچ شد (جدول ۲).

روش کشتن در زمان:

منحنی کشتن در زمان در آزمون هم‌افزایی کیتوزان- تیمول، کیتوزان کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات با اعمال کیتوزان، تیمول و ترکیب کیتوزان- تیمول، کیتوزان، کارواکرول و ترکیب کیتوزان- کارواکرول، کیتوزان، ایزوتیوسیانات و ترکیب کیتوزان- ایزوتیوسیانات غلظت دو برابر MIC علیه کاندیدا آلیکس انجام شد و نتایج به صورت تغییرات در 10^3 CFU/mL سلول‌های زنده نشان داده شد و سپس منحنی مربوط با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد. بر این اساس ترکیب تیمول کیتوزان و کیتوزان- ایزوتیوسیانات بهترین کارایی و عملکرد را در کشتن کاندیدا آلیکس در زمان کوتاه‌تر نشان دادند. به طوری که طی مدت زمان ۱۰۰ دقیقه کاهش شدیدی در تعداد سلول‌های زنده ایجاد کردند و 10^3 CFU/mL را تا

زمانی ۲۰ دقیقه از لحظه صفر و در دقیقه ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عوامل ضد میکروبی، 10^3 μL از هر چهار فاکتور برداشته شد و در پلیت‌های نیمه بسته آگار کشت شد. بعد از اینکه پلیت‌ها ۲۴ ساعت در 37°C نگهداری شدند، تعداد کلونی‌های هر پلیت با کمک دستگاه کلونی شمار به دست آمد. الگوی کاهش تعداد سلول‌های زنده بر اساس عدد حاصل از \log_{10} آنها و اثرات هم‌افزایی آنها با هم سنجیده شد (۳۰، ۲۹).

منحنی رشد:

برای بررسی نحوه اثر کیتوزان و هریک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه و اثرات متقابل کیتوزان با هر یک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه، بر روی الگوی رشدی کاندیدا آلیکس از روش مقایسات منحنی رشد این مواد علیه کاندیدا آلیکس در مقایسه با شرایط کنترل مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ابتدا از کلونی‌های ایزوله هر یک از باکتری‌ها در ده میلی‌لیتر از محیط مولر هینتون مایع کشت شد و در انکوباتور شیکر در دمای 37°C نگهداری شدند تا میزان کدورت آنها بر اساس OD_{۶۰۰} حدود ۰/۶ شود که نشان دهنده قرارگیری سلول‌ها در اواسط مرحله رشدی لگاریتمی می‌باشد. سپس سلول‌ها با استفاده از محیط مولر هینتون مایع رقیق شدند تا OD آنها برابر با ۰/۲ گردید. سپس $1000 \mu\text{L}$ از سوپانسیون کاندیدا آلیکس در ویال‌های جداگانه ریخته شد. کیتوزان با هر یک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه با غلظتی دو برابر غلظت MIC خود علیه کاندیدا آلیکس به ویال‌های جداگانه حاوی آن اضافه شدند. تیوب‌ها در ترموسایکلر 37°C نگهداری شدند. در فواصل زمانی مشخص، بعد از یک، دو، چهار، شش و هشت ساعت بعد از افزودن مواد ضد میکروبی به سلول‌ها، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر کدورت OD_{۶۰۰} هر ویال خوانده شد. این آزمون دو مرتبه تکرار شد (۳۱).

آنالیز آماری:

شش عدد کاهش دادند. درحالیکه ترکیب کیتوزان- کارواکرول در ۱۲۰ دقیقه موفق به کاهش چشمگیر تعداد سلولهای زنده شد (شکل ۱). منحنی رشد: به منظور مطالعه مکانیسم اثر کیتوزان- تیمول، کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس کدورت محیطهای کشت حاوی کیتوزان، تیمول، کارواکرول، ایزوتیوسیانات و ترکیب آنها با کیتوزان با غلظت دو برابر MIC در زمانهای مختلف به وسیله اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. ترکیب کیتوزان- تیمول کدورت سلولها را در یک ساعت اول به نصف کاهش داد و در مدت دو ساعت به صفر رسانید. در حالیکه ترکیبات کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات در مدت دو ساعت کدورت به نصف و بعد از چهار ساعت به نزدیک صفر رسید و تا بعد از هشت ساعت کدورت محیط را در محدوده صفر نگه داشتند (شکل ۲).

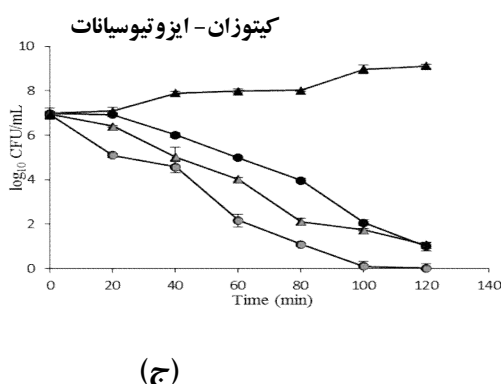
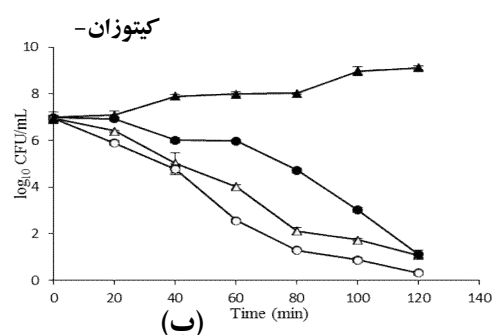
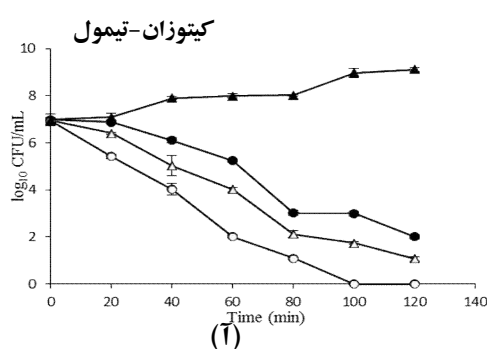
جدول ۱. سنجش حداقل میزان بازدارندگی ترکیب کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس. MIC: حداقل غلظت بازدارندگی، MIC_A: حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده به تنهایی، MIC_B: حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده در آزمون هم افزایی و در ترکیب با ماده دوم، FIC: غلظت مهار فراکشنال، FIC₁: شاخص غلظت مهار فرکشنال که حاصل جمع FIC دو ماده مورد آزمون می باشد.

ترکیبات مورد استفاده	MIC (μg/mL)				تفسیر نتایج
	MIC _A	MIC _B	FIC	FIC ₁	
تیمول	۱۲۸	۸	۰/۰۶۲۵	۰/۵۶۲۵	هم افزایی نسبی
کیتوزان	۳۲	۱۶	۰/۵		
کارواکرول	۵۱۲	۶۴	۰/۱۲۵	۰/۶۲۵	هم افزایی نسبی
کیتوزان	۳۲	۱۶	۰/۵		
ایزوتیوسیانات	۵۱۲	۱۶	۰/۰۳۱	۰/۵۳۲۱	هم افزایی نسبی
کیتوزان	۳۲	۱۶	۰/۵		

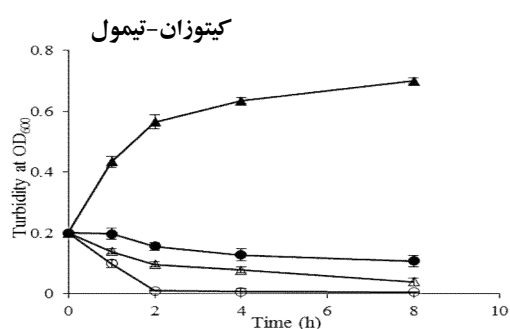
جدول ۲. تعیین حداقل غلظت قارچ کش ترکیب کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس. MIC: حداقل غلظت بازدارندگی، MIC_A: حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده به تنهایی، MIC_B: حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده در آزمون هم افزایی و در ترکیب با ماده دوم، MFC: حداقل غلظت قارچ کشی، MFC_B: حداقل غلظت قارچ کشی هر ماده در آزمون هم افزایی و در ترکیب با ماده دوم.

ترکیبات مورد استفاده	MIC (μg/mL)					
	MFC _A	MFC/MIC _A	تفسیر نتایج	MFC _B	MFC/MIC _B	تفسیر نتایج
تیمول	۵۱۲	۴	بازدارنده رشد قارچ	۱۶	۴	کشنده قارچ
کیتوزان	۱۲۸	۴	بازدارنده رشد قارچ	۳۲	۲	کشنده قارچ
کارواکرول	>۱۰۲۴	>۴	بازدارنده رشد قارچ	۲۵۶	۴	بازدارنده رشد قارچ

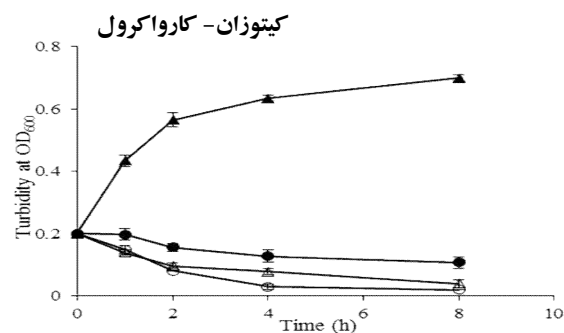
بازدارنده رشد قارچ	۴	۶۴	بازدارنده رشد قارچ	۴	۱۲۸	کیتوزان
بازدارنده رشد قارچ	۴	۶۴	بازدارنده رشد قارچ	>۴	>۱۰۲۴	ایزوتیوسیانات
کشنده قارچ	۲	۳۲	بازدارنده رشد قارچ	۴	۱۲۸	کیتوزان



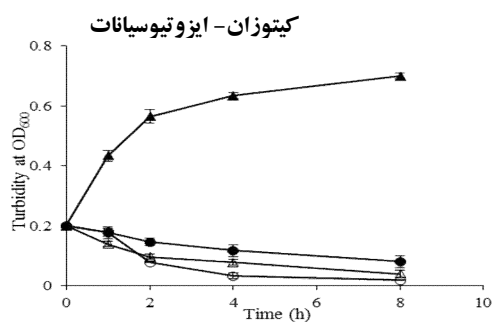
شکل ۱. منحنی کشتن در زمان ، کیتوزان-تیمول، کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات با غلظت دو برابر حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) علیه کاندیدا آلبیکنس (آ) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان ۶۴ µg/mL (مثلث تو خالی)، تیمول ۲۵۶ µg/mL (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان ۶۴ µg/mL و تیمول ۲۵۶ µg/mL (دایره تو خالی). (ب) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان ۶۴ µg/mL (مثلث تو خالی)، کارواکرول ۱۰۲۴ µg/mL (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان ۶۴ µg/mL و کارواکرول ۱۰۲۴ µg/mL (دایره تو خالی). (ج) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان ۶۴ µg/mL (مثلث تو خالی)، ایزوتیوسیانات ۱۰۲۴ µg/mL (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان ۶۴ µg/mL و ایزوتیوسیانات ۱۰۲۴ µg/mL (دایره تو خالی).



(ا)



(ب)



(ج)

شکل ۲. منحنی رشد کیتوزان- تیمول، کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات با غلظت دو برابر حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) علیه کاندیدا آلبیکنس (آ) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان ۶۴ µg/mL (مثلث تو خالی)، تیمول ۲۵۶ µg/mL (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان ۶۴ µg/mL و تیمول ۲۵۶ µg/mL (دایره تو خالی). (ب) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان ۶۴ µg/mL (مثلث تو خالی)، کارواکرول ۱۰۲۴ µg/mL (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان ۶۴ µg/mL و کارواکرول ۱۰۲۴ µg/mL (دایره تو خالی). (ج) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان ۶۴ µg/mL (مثلث تو خالی)، ایزوتیوسیانات ۱۰۲۴ µg/mL (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان ۶۴ µg/mL و ایزوتیوسیانات ۱۰۲۴ µg/mL (دایره تو خالی).

بحث

در این مطالعه اثرات هم‌افزایی کیتوزان با سه ماده موثره گیاهی تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات با اثرات ضدقارچی اثبات شده، علیه کاندیدا آلیکنس مقاوم به فلوکونازول مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آزمون چکربرد هر سه ماده در ترکیب با کیتوزان اثرات هم‌افزایی نشان دادند. هر چند کم‌ترین غلظت بازدارنده رشد مربوط به ترکیب کیتوزان تیمول با غلظت $8 \mu\text{g/mL}$ تیمول و $16 \mu\text{g/mL}$ کیتوزان بود. مطالعات قبلی نشان داده بود نانوذرات کیتوزان حاوی اثر ضد باکتریایی قوی علیه *Staphylococcus aureus* دارند (۵). نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی وجود اثر هم‌افزایی بین کیتوزان و مواد موثره گیاهی مورد استفاده را تأیید کرد. این اثر در ترکیب کیتوزان-تیمول و کیتوزان ایزوتیوسیانات محدوده اثر کیتوزان را از بازدارندگی رشد قارچ به محدوده کشندگی ارتقا داد. در پژوهشی دیگر، نانوکپسوله‌های کیتوزان حاوی اسانس آویشن، اثرات ضد میکروبی قویتری علیه کاندیدا آلیکنس نشان داد، به طوریکه افزایش غلظت اسانس آویشن درون نانوکپسوله‌ها منجر به افزایش توانایی ضدقارچی نانوکپسوله‌های کیتوزان علیه کاندیدا آلیکنس شد (۳۲).

آزمونهای کشتن در زمان و منحنی رشد، اثرات کشندگی و بازدارندگی رشد ترکیب کیتوزان-تیمول در مدت زمان کمتر از دو ساعت علیه کاندیدا آلیکنس را تأیید کردند. هرچند ترکیب کیتوزان-کارواکرول و کیتوزان-ایزوتیوسیانات نیز با کاهش تعداد سلولهای زنده کاندیدا آلیکنس به نزدیک صفر، در کمتر از دو ساعت نتایج قارچ کشی موفق علیه کاندیدا آلیکنس نشان دادند. اما بهترین و سریعترین ترکیب در کنترل کاندیدا آلیکنس، ترکیب کیتوزان-تیمول بود (شکل ۱ و ۲).

مشخص شده است که غلظت پایین کیتوزان که برای سلولهای قارچ کشنده نیست، منجر به ایجاد تغییراتی در

پایداری یونی و متابولیسم سلولی می‌شود. کیتوزان به دلیل بار مثبت خود قادر به اتصال به غشا سلولی که بار منفی دارد، می‌باشد. در نتیجه این اتصال و ایجاد یک میدان الکتریکی، قدرت تبادل مواد با محیط بیرون سلول کاهش می‌یابد و میزان یون پتاسیم موجود در سطح بیرونی غشا کاهش می‌یابد و لذا یونهای پتاسیم درون سلولی خارج می‌شوند. این امر مقدمه تخریب کانالهای غشایی و پلاسمولیز سلولی را فراهم می‌کند (۴). از طرف دیگر تیمول و کارواکرول ترکیباتی چربی دوست هستند که به درون غشا سلولی قارچ نفوذ می‌کنند و مسیر پیوستن آراگسترول را هدف قرار می‌دهند و سبب لیز سلولی و در نهایت مرگ سلول قارچ می‌شوند (۲۴). لذا با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، غلظت اندک کیتوزان با ناپایدار کردن غشا، امکان ورود و تاثیر تیمول را افزایش می‌دهد. در نتیجه این دو ماده در حالت ترکیبی با یکدیگر، در غلظتی کمتر از میزان حداقل غلظت بازدارنده خود قادر به ایجاد تخریب در غشا سلول قارچ و کنترل کاندیدا آلیکنس می‌باشند.

مطالعات پژوهشگران قبلی بر روی سمیت تیمول برای سلولهای قرمز خون نشان داد که غلظت پایینتر از $100 \mu\text{g/mL}$ تیمول حدود ۲٪ خاصیت همولوتیکی نشان دادند (۳۳). حتی در غلظت بالای حدود $2000 \mu\text{g/mL}$ هم این میزان قابل چشم‌پوشی و حدود ۳۰٪ بود همچنین آزمایشات متعدد اثرات سمیت کیتوزان بر روی سلولهای اریتروسیتهی انسان، اثرات بسیار جزئی لیزکنندگی را نشان داد و کیتوزان در محدوده مواد ایمن برای استفاده دارویی و یا استفاده به عنوان ناقل داروهای مختلف، قرار داده است (۳۴).

نتیجه گیری

نتایج ضد قارچی و هم‌افزایی ترکیب تیمول و کیتوزان با غلظت های بسیار پایین $8 \mu\text{g/mL}$ تیمول و $16 \mu\text{g/mL}$

های پلیمری یا نانوکپسولهای ضدقارچی کیتوزان- تیمول می تواند راهگشای مشکل روزافزای مقاومت دارویی در کاندیدا آلبیکنس باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است و موفق به دریافت کد اخلاق به شماره IR.ARAKMU.REC.1396.54 شده است. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافع برای انتشار این مقاله ندارند.

کیتوزان در آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی علیه کاندیدا آلبیکنس و عملکرد افزایشی کشندگی این ترکیب با غلظت های بسیار پایین $16 \mu\text{g/mL}$ تیمول و $32 \mu\text{g/mL}$ کیتوزان علیه این قارچ، با نتایج کارایی این ترکیب در کشتن سریع و آسیب دیواره قارچ کاندیدا آلبیکنس در کمتر از دو ساعت از تیمار سلولهای قارچی در آزمون های کشتن در زمان و منحنی رشد، همخوانی بالایی نشان داد. این نتایج حاکی از کارایی و تاثیر بالای ترکیب تیمول و کیتوزان با غلظت های بسیار پایین و ایمن سلولهای انسانی می باشند. بنابراین، پژوهشهای بعدی در راستای تولید فیلم

منابع

- 1.Vengurlekar S, Sharma R, Trivedi P. Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. *Pharmacogn Rev.* 2012;6(12):91- 9.
- 2.Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules.* 2012;17(4):3989-4006.
- 3.Mirjamali NA-S, Soufian S, Molaei N, Abbasian SS, Abtahi H. Cloning and expression of the enzymatic region of Streptococcal hyaluronidase. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(9):667-72.
- 4.Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan L, et al. 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.
- 5.Sotelo-Boyás M, Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, y Gómez YG. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *Int J Biol Macromol.* 2017;103:409-14.
- 6.Goy RC, Britto Dd, Assis OB. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros.* 2009;19(3):241-7.
- 7.Fahimirad S, Ajallouei F. Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents. *Int J Pharm.* 2019;566:307-28.
- 8.Fahimirad S, Abtahi H, Satei P, Ghaznavi-Rad E, Moslehi M, Ganji A. Wound healing performance of PCL/Chitosan based electrospun nanofiber electrosprayed with curcumin loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym [Internet].* 2021 Jan [cited 2021 May 1]; 259: 117640. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486172100028X>.doi:10.1016/j.carbpol.2021.117640
- 9.Ghazavi A, Abtahi H, Karimi M, Mollaghasemi S, Mosayebi G. Antimicrobial activities of water and methanol extracts of bitter apricot seeds. *J Med Sci.* 2008;8(4):433-6.
- 10.Fahimirad S, Hatami M. Heavy metal-mediated changes in growth and phytochemicals of edible and medicinal plants. IN: Ghorbanpour M, Varma A, Editors. *Medicinal Plants and Environmental Challenges.* 1st ed. Germany: Springer, Cham, 2017: 189-214.
- 11.Ghorbanpour M, Fahimirad S. Plant nanobionics a novel approach to overcome the environmental challenges. IN: Ghorbanpour M, Varma A, Editors. *Medicinal Plants and Environmental Challenges.* 1st ed. Germany: Springer, Cham, 2017:247-57.
- 12.Fahimirad S, Abtahi H, Razavi SH, Alizadeh H, Ghorbanpour M. Production of recombinant antimicrobial polymeric protein beta casein-E 50-52 and its antimicrobial synergistic effects assessment with thymol. *Molecules.* 2017;22(6):822-37.

13. Da Silva NB, de Lucena Rangel M, Almeida BB, de Castro RD, Valença AMG, Cavalcanti AL. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. An in vitro study. *J Oral Res.* 2017;6(12):319-23.
14. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 2016;210:402-14.
15. Fahimirad S, Razavi SH, Abtahi H, Alizadeh H, Ghorbanpour M. Recombinant production and antimicrobial assessment of beta casein-IbAMP 4 as a novel antimicrobial polymeric protein and its synergistic effects with thymol. *Int J Pept Res Ther.* 2018;24(1):213-22.
16. Lima IO, Pereira FdO, Oliveira WAd, Lima EdO, Menezes EA, Cunha FA, et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J Essent Oil Res.* 2013;25(2):138-42.
17. Dufour V, Stahl M, Baysse C. The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology.* 2015;161(2):229-43.
18. Liang R, Li X, Yuan W, Jin S, Hou S, Wang M, Wang H. Antifungal activity of nanochitin whisker against crown rot diseases of wheat. *J agric food chem.* 2018;66(38):9907-13.
19. Fahimirad S, Hatami M. Nanocarrier-Based Antimicrobial Phytochemicals. *Advances in Phytonanotechnology*. IN: Ghorbanpour M, Wani S, Editors. *Advances in Phytonanotechnology*. 1st ed. United states: Elsevier, Academic Press, 2019: 299-314.
20. Reginato CF, Bandeira LA, Zanette RA, Santurio JM, Alves SH, Danesi CC. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against *Candida dubliniensis* before and after in vitro fluconazole exposure. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(1):75-9.
21. Zhou W, Wang Z, Mo H, Zhao Y, Li H, Zhang H, et al. Thymol Mediates Bactericidal Activity against *Staphylococcus aureus* by Targeting an Aldo-Keto Reductase and Consequent Depletion of NADPH. *J agric food chem.* 2019;67(30):8382-92.
22. Molaee N, Abtahi H, Mosayebi G. Expression of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* and its reaction with infected human and murine sera. *Iran j basic med sci.* 2013;16(9):985-89.
23. Santos ERd, Forno CFD, Hernandez MG, Kubiça TF, Venturini TP, Chassot F, et al. Susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;56(6):477-82.
24. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016;38(6):1015-9.
25. Jang WS, Kim HK, Lee KY, Am Kim S, Han YS, Lee IH. Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Lett.* 2006;580(5):1490-6.
26. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2013;23(105):20-7.
27. Bao M, Zhang L, Liu B, Li L, Zhang Y, Zhao H, et al. Synergistic effects of anti-MRSA herbal extracts combined with antibiotics. *Future Microbiol.* 2020;15(13):1265-76.
28. Lora-Tamayo J, Murillo O, Bergen PJ, Nation RL, Poudyal A, Luo X, et al. Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic biofilm model. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(9):2434-42.
29. Rudilla H, Fusté E, Cajal Y, Rabanal F, Vinuesa T, Viñas M. Synergistic antipseudomonal effects of synthetic peptide AMP38 and carbapenems. *Molecules.* 2016;21(9):1223-35.
30. Ghazavi A, Abtahi H, Karimi M, Mollaghasemi S, Mosayebi G. Antimicrobial activities of water and methanol extracts of bitter apricot seeds. *J Med Sci.* 2008; 15;8(4):433-6.
31. Hu Y, Du Y, Wang X, Feng T. Self-aggregation of water-soluble chitosan and solubilization of thymol as an antimicrobial agent. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90(3):874-81.

- 32.Liu T, Liu L. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. *Int J Biol Macromol*. 2020;162:1509-15.
- 33.Chavan PS, Tupe SG. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*. 2014;46:115-20.
- 34.Qi L, Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; 16(16):4243-5.