Original Article

A Survey of the Effect of Camphor on *INT1* and *EFG1* Gene Expressions of *Candida albicans* at Three Treatment Times (24, 48, and 72 hours) via Real-time PCR

Reza Ghaffaripour[1], Masoumeh Rajabibazl[2*], Mohammad Hossein Yadegari[3]**

1- M.Sc., Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1985717443, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: Rajabi_m@sbmu.ac.ir

***Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: Yadegarm@modares.ac.ir

Received: 15/Jul/2016, Accepted: 07/Feb/2017

Abstract

Objective: *Candida albicans (C. albicans)* is an opportunistic yeast that can lead to pathogenesis in immunocompromised individuals and under suitable conditions. Medicinal plants ingredients such as camphor can reduce the expressions of genes involved in virulence of the fungi through their antifungal properties. The products of *INT1* and *EFG1* are implicated in inducing filamentous growth and adhesion of *C. albicans* to the host tissues. Both of these characteristics are very important in its virulence. The present study focuses on the evaluation of the effects of camphor on *INT1* and *EFG1* expressions at three time points of treatment (24, 48, and 72 hours) via real-time PCR.

Methods: We prepared serial dilutions of camphor (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512 mg/ml) and co-cultured them with 1.5×10^3 cells/ml of a *C. albicans* ATCC 10231 suspension for 48 hours at 35^0C. Next, we determined the MIC50/90 and MFC. *C. albicans* cells were treated with the MIC50 concentration of camphor for 24, 48, and 72 hours. RNA from *C. albicans* was extracted before and after treatment, back translated into cDNA, and analyzed with real-time PCR.

Results: MIC50, MIC90 and MFC of camphor were determined at 16 mg/ml, 32 mg/ml and 64 mg/ml, respectively. Evaluation of gene expression changes in yeast showed that camphor reduced the *INT1* gene expression about 87% at 24 hours, 97% at 48 hours, and 86% at 72 hours after treatment compared to the untreated sample. *EFG1* expression reduced about 58% at 24 hours, 93% at 48 hours, and 49% at 72 hours after treatment with camphor.

Conclusion: In recent years, advancements have been seen in herbalism due to the increased drug resistance and adverse effects of chemical drugs. These plants may efficiently act as antifungal agents. The results of this study have shown that the use of camphor can significantly reduce the expression of virulence genes *INT1* and *EFG1* in *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*, Camphor, Virulence factors

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.3, Pages: 59-72

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

مقاله اصیل

بررسی اثر کامفور بر بیان ژن‌های *INT1* و *EFG1* در کاندیدا آلبیکنس در سه زمان تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش Real Time PCR

رضا غفاری پور[۱]، معصومه رجبی بذل[۲*]، محمد حسین یادگاری[۳]**

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۹۸۵۷۱۷۴۴۳، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
Email: Rajabi_m@sbmu.ac.ir

** آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی
Email: Yadegarm@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۰۴/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۱/۱۹

چکیده

هدف: کاندیدا آلبیکنس مخمر فرصت طلبی است که در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و در شرایط مناسب، به حالت بیماری‌زا مبدل می‌شود. مواد تشکیل دهنده گیاهان دارویی مانند کامفور می‌توانند بیان ژن‌های دخیل در ویرولانس قارچ‌ها را به واسطه خواص ضد قارچی خود، کاهش دهند. محصول ژن‌های *INT1* و *EFG1* نقش مهمی در چسبندگی کاندیدا آلبیکنس به بافت میزبان و هیفی شدن آن ایفا می‌کنند که این خصوصیات می‌تواند از عوامل بسیار مهم بیماریزایی آن باشند. مطالعه حاضر به بررسی اثر کافور بر تغییرات بیان ژن‌های *INT1* و *EFG1* در سه زمان تیمار ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت با استفاده از Real time PCR پرداخته است.

مواد و روش‌ها: رقت‌های سریالی از کامفور در غلظت‌های ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ٦٤، ۳۲، ۱٦، ۸، ٤، ۲ و ۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تهیه شد و سپس سوسپانسیون سلولی کاندیدا آلبیکنس سویه ATCC 10231 با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۳}$ سلول در میلی‌لیتر به‌مدت ٤٨ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد با آن تیمار شد. سپس حداقل غلظت مهارکننده ۵۰ درصد و ۹۰ درصد (MIC50/90) رشد قارچ و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC) این ترکیب به روش رقت میکروبراث تعیین شد. کاندیدا آلبیکنس به‌مدت ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت با کامفور در حداقل غلظت مهارکننده ۵۰ درصد رشد قارچ (MIC50) تیمار شد. استخراج RNA مخمرها قبل و بعد از مجاورت با این ترکیب صورت گرفت، سپس ترجمه معکوس به cDNA و در نهایت ارزیابی به کمک Real time PCR انجام شد.

نتایج: حداقل غلظت مهارکننده ۵۰ درصد رشد قارچ (MIC50)، حداقل غلظت مهارکننده ۹۰ درصد رشد قارچ (MIC90) و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC) برای کامفور به ترتیب ١٦، ۳۲ و ٦٤ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تعیین شد. بررسی تغییرات بیان این ژن‌ها در مخمر نیز نشان داد که کامفور بیان ژن *INT1* را در زمان ٢٤ ساعت پس از تیمار به میزان ۸۷ درصد، ٤٨ ساعت پس از تیمار ۹۷ درصد و ۷۲ ساعت پس از تیمار ٨٦ درصد نسبت به نمونه تیمار نشده کاهش داده است. این موضوع در خصوص ژن *EFG1* نیز نشان داد که بیان این ژن در تیمارهای ٢٤ ساعتی با کامفور به میزان ۵۸ درصد، در تیمارهای ٤٨ ساعتی ۹۳ درصد و در تیمارهای ۷۲ ساعتی ٤۹ درصد کاهش داشته است.

نتیجه‌گیری: در سال‌های اخیر به دنبال بروز مقاومت‌های دارویی و بروز عوارض جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی افزایش یافته است. این گیاهان ممکن است بتوانند به‌عنوان عوامل ضد قارچی کارآمد عمل نمایند. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از ترکیبات خالص شیمیایی موجود در ساختار این گیاهان مانند کامفور، می‌تواند به‌طور چشمگیری در کاهش بیان ژن‌های ویرولانس قارچی از جمله *INT1* و *EFG1* تأثیر داشته باشد.

کلیدواژگان: کاندیدا آلبیکنس، کامفور، عوامل بیماری‌زا

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

مقدمه

مخمرها برای ایجاد عفونت در انسان یا حیوان، نیاز به وجود نوعی اختلال در سیستم دفاعی میزبان دارند و توانایی ایجاد عفونت در افراد سالم را ندارند. تعداد این قبیل مخمرها فراوان است ولی عاملی که اغلب موجب بروز بیماری می‌شود، کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) نام دارد. سایر گونه‌های جنس کاندیدا به‌خصوص تروپیکالیس (*C. tropicalis*) و دابلینینسیس (*C. dubliniensis*) نیز قادرند در شرایطی که دفاع بدن میزبان کاهش شدیدی داشته باشد، تکثیر یافته و با وجود ویرولانس کمی که دارند، مهاجم شوند [۱]. از جمله ابزارهای مهم این قارچ در ایجاد عفونت، تولید انواع پروتئازها، فسفولیپازها، چسبندگی به سطوح و توانایی مهمی بنام تغییر فنوتیپی و ریخت‌شناختی است [۲-۵]. یکی از ژن‌های دخیل در تولید هیف کاندیدا آلبیکنس و بیماری‌زایی آن، ژن *EFG1* (*Elongation* factor G) است که نقش تنظیم کنندگی این ژن برای سایر ژن‌های مولد هیف، موجب جلب توجه پژوهشگران به اهمیت بالینی آن در تنظیم شدت و ضعف بیماریزایی کاندیدا شده است [۲، ٦]. مسیری که ژن *EFG1* از طریق آن اعمال اثر و تولید هیف می‌نماید، cAMP- پروتئین کیناز A (cyclic AMP- Protein Kinase A: cAMP-PKA) نام دارد. در این مسیر، فعال شدن این ژن موجب افزایش بیان و تولید محصول دیگر ژن‌های اختصاصی دخیل در تولید هیف از جمله *HGC1*، *ALS3* و *HWP1* می‌شود که در نهایت فعالیت این مجموعه ژن‌ها موجب تغییراتی در بیان پروتئین‌های سطحی دیواره سلولی مخمر و افزایش طول و ایجاد تیغه در آن می‌شود [٦]. از دیگر ژن‌های مهم و اساسی در چسبندگی، تولید هیف و تغییر فنوتیپی کاندیدا آلبیکنس، *INT1* (Integrin-like protein) است که محصول آن یک پروتئین شبه اینتگرین است [۲]. این ژن در بسیاری از مقالات و پژوهش‌های متنوع، در کنار *EFG1* به‌عنوان ژن‌های مهم در تولید لولهٔ زایا و هیف معرفی شده و در برخی تحقیقات، خواص ویرولانسی آن‌ها به کمک حیوانات آزمایشگاهی بررسی شده است [٤]. از آن‌جایی که هم تغییرات فنوتیپی قارچ و هم توانایی اتصال و چسبندگی و ایجاد بیوفیلم از جمله عوامل مهم بیماری‌زایی در کاندیدا آلبیکنس است، موجب شده تا قدرت بیماری‌زایی محصولات این ژن، بیش از سایر ژن‌های دخیل در چسبندگی مورد توجه قرار گیرد [۷، ۸].

داروهای مصنوعی به موازات آثار درمانی خود، همواره دارای آثار جانبی سوء نیز بوده‌است که بعضاً در دراز مدت و بر اثر مصرف مداوم، عوارضی را برای مصرف کننده به همراه داشته و از جوانب دیگر موجب آزار بیماران شده است. تنوع بسیار زیاد و وفور ترکیبات دارای خواص درمانی در گیاهان باعث شده تا بتوان از آن‌ها به‌عنوان یک منبع مهم به منظور جستجوی ترکیبات جدید دارویی و سنتز داروهای مؤثر استفاده نمود [۹]. یکی از این گیاهان دارویی، درمنه ترکی است که از خانواده اسفناج است. این جنس دارای بیش از ۱۰۰ گونه است [۱۰]. در اغلب بررسی‌های انجام شده روی گونه‌های مختلف گیاه درمنه، حدوداً بیش از ٤٠ ترکیب شیمیایی با غلظت‌های مختلف از هر گونه به‌دست آمده است که عموماً غلظت اصلی‌ترین ترکیبات موجود در این گونه‌ها، با توجه به محل جمع‌آوری گیاه و جغرافیای آن منطقه با هم متفاوت است. عمده این ترکیبات در گونه‌های جمع‌آوری شده از ایران شامل کامفور (Camphor)، المول(Elemol)، آلفا کادینول (alpha Cadinol)، آلفا اویدسمول (alpha Eudesmol)، اپی-آلفا-موروئول (epi-alpha-Muurolol)، کوبنول (Cubenol)، آلفا-کنوپودیول استات (α-Chenopodiol acetate)، جرماکرول (Germacrol) و چند ترکیب دیگر است [۱۱، ۱۲]. در این بین، تاکنون آزمایش‌های مدونی روی تک تک این ترکیبات برای بررسی خاصیت ضد کاندیدایی صورت نگرفته است و عموم مطالعات روی عصاره‌های آلی و اسانس تام درمنه بوده است ولی در این میان از ترکیب کامفور به‌عنوان یک ضد قارچ مهم نام برده شده است [۱۳].

با توجه به گفته‌های فوق، محققین در این پژوهش بر آن شدند تا با بررسی اثر کامفور در حداقل غلظت مهار کننده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

رشد قارچ (Minimum inhibatory concentration: MIC) بر تغییرات بیان ژن‌های مهم *INT1* و *EFG1* در کاندیدا آلبیکنس در سه زمان تیمار ۲٤ ساعت، ٤۸ ساعت و ۷۲ ساعت به روش Real Time PCR، ضمن تعیین بهترین زمان اثرگذاری این ماده بر سطح بیان ژن‌ها، افق دید نوینی را در حوزه طراحی داروهای خالص مشتق شده از گیاهان دارویی بومی ایران ایجاد کنند. این پژوهش زمینه ساز مطالعات تکمیلی به منظور استفاده از ترکیبات مؤثر موجود در گیاهان دارویی در طراحی و ساخت داروهای جدید ضد قارچ است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تحلیلی است که در بخش قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و با تأیید کمیته اخلاق پزشکی به شماره ٥۲/٥٥٠٤د به تاریخ ۹۳/۹/۳ به انجام رسید. مراحل کار به ترتیب ذیل انجام شد.

تهیه کامفور

کامفور به صورت تجاری از شرکت Sigma-Aldrich (آلمان) با کد CAS Number 464-48-2 تهیه شد.

تهیه سوش قارچی

برای انجام آزمایش از سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) استفاده شد. این سویه روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (Sabourad Dextrose Agar + Chloramphenicol) شرکت Merck آلمان کشت داده شد و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳٥ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

تهیه سوسپانسیون قارچی

برای به‌دست آوردن یک سوسپانسیون سلولی همگن برای استفاده در آزمون تعیین حساسیت قارچ به کامفور، از کشت تازه ۲٤ ساعتی ۲ تا ۳ کلونی برداشت شد و به بافر فسفات سالین استریل منتقل شد و ۳ مرحله شستشو به وسیله سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱٥۰۰ دور در دقیقه انجام شد. طبق دستورالعمل M27-A3 به‌دست آمده از CLSI، غلظت نهایی سوسپانسیون مخمری باید حدود $۰/٥-۲/٥\times۱۰^{۳}$ ارگانیسم در هر میلی‌لیتر باشد که بر این اساس غلظت سوسپانسیون قارچی مدنظر در این پژوهش به کمک شمارش سلولی با لام نئوبار ۳×۱۰^{۳} سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) تعیین شد تا غلظت نهایی آن پس از افزوده شدن به هر چاهک معادل $۱/٥\times۱۰^{۳}$ سلول در هر میلی‌لیتر شود [۱٤].

تهیه رقت سریالی از کامفور و مجاورسازی سوسپانسیون مخمری با رقت‌های مختلف کامفور

برای تهیه رقت سریالی از کامفور، ۲۰٤۸ میلی‌گرم از آن در ۱ میلی‌لیتر اتانول ٥۰ درصد حل شد (کامفور در محیط‌های آبی نامحلول می‌باشد). سپس در ۱۳ چاهک از یک میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 بدون فنل رد حاوی ۲ درصد گلوکز اضافه شد و به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر کامفور با غلظت ۲۰٤۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم منتقل شد و این عمل تا چاهک دهم ادامه یافت و از چاهک دهم ۱۰۰ میکرولیتر بیرون ریخته شد. سپس به همه ده چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری اضافه شد. بدین ترتیب غلظت یکسانی از سلول‌های مخمری با رقت‌های سریالی از کامفور با غلظت‌های نهایی ٥۱۲، ۲٥٦، ۱۲۸، ٦٤، ۳۲، ۱٦، ۸، ٤، ۲ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تیمار شد. چاهک یازدهم نیز که شامل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

سوسپانسیون مخمری و محیط کشت بود برای به‌دست آوردن حداکثر رشد مخمر بدون وجود عوامل مداخله‌گر احتمالی، در نظر گرفته شد. چاهک دوازدهم با بالاترین غلظت کامفور و محیط کشت بدون وجود سلول‌های مخمری، برای اثبات عدم وجود آلودگی استفاده شد. چاهک سیزدهم نیز برای اثبات بی اثر بودن حلال (اتانول ۵۰ درصد) در مهار رشد مخمر، حاوی محیط کشت، اتانول ۵۰ درصد بدون کامفور و سوسپانسیون مخمری بود. مراحل فوق در دو سری چاهک مجزا به‌صورت دو بار تکرار انجام شد [۱۵].

تعیین MIC و MFC

میکروپلیت ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس برای تعیین MIC و حداقل غلظت کشنده قارچ (Minimum fungicidal concentration: MFC) از تمام چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و مقایسه از نظر تعداد کلونی پس از ٢٤ ساعت انجام شد. کشت‌های به‌دست آمده تا ٤٨ ساعت نگهداری شد و مجدداً از نظر تعداد کلونی بررسی شد. اولین رقتی از کامفور که در آن تعداد کلونی‌های مخمری رشد یافته در محیط کشت به نصف تعداد کلونی‌های نمونه مجاور شده با حلال اتانول بدون کامفور رسیده بود به‌عنوان MIC50 و اولین رقتی از کامفور که در آن هیچ کلونی مخمری روی محیط رشد نیافته بود به‌عنوان MFC در نظر گرفته شد. یک رقت قبل از MFC نیز به‌عنوان MIC90 مد نظر قرار داده شد [١٦].

مجاور سازی مخمر با کامفور در غلظت MIC50

در این مرحله ۰/۵ میلی‌لیتر از کامفور که در محیط سابوروی مایع در غلظتی معادل دو برابر غلظت MIC50 تهیه شده بود، و ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون مخمری تازه با غلظت حدود ۳×۱۰^{۳} سلول در میلی‌لیتر با هم مخلوط شدند که غلظت نهایی کامفور در این لوله معادل MIC50 شد. سپس به‌مدت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در هر سه زمان روی محیط کشت جامد سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و از کلونی‌های تازه ٢٤ ساعتی برای استخراج RNA استفاده شد. برای به‌دست آوردن نمونه کنترل در شرایطی همانند نمونه‌های مورد آزمایش، اتانول ۵۰ درصد (حلال کامفور) بدون کامفور و محیط کشت سابوروی مایع در نسبتی برابر با نمونه‌های مورد بررسی به همراه سوسپانسیون مخمری استفاده شد.

استخراج RNA از کاندیدا آلبیکنس

با استفاده از کیت RNX-plus شرکت سیناکلون (ایران)، استخراج RNA از مخمر کاندیدا آلبیکنس قبل و بعد از تیمار با کامفور به صورت دو بار تکرار انجام شد. این کیت بر اساس روش فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل طراحی شده است. پس از استخراج RNA، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

طراحی و سنتز آغازگرها

سه جفت آغازگر مربوط به ژن‌های *INT1*، *EFG1* و نیز *ACT1* به‌عنوان ژن کنترل داخلی طراحی و به کمک نرم افزار تحت شبکه اولیگو آنالایزر (Oligoanalyzer) و نرم افزارهای مشابه، کنترل و توسط شرکت سینا کلون (ایران) ساخته شد که در جدول ۱ نشان داده شده است. آغازگرهای مربوط به دو ژن *EFG1* و *ACT1* از پژوهش‌های قبلی به‌دست آمد و مورد تحلیل و بررسی توسط نرم‌افزارهای اشاره شده قرار گرفت [۱۷]. اما یک جفت آغازگر مربوط به ژن *INT1*، به کمک توالی mRNA و نیز DNA موجود از این قطعه در بانک اطلاعات ژنوم NCBI با کد ژن ۳٦۳۷۷٦۱، طراحی و مورد تحلیل نرم‌افزاری قرار گرفت. این

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

ژن دارای دو ناحیه اگزون بود کـه ایـن آغازگرهـا از ناحیـه اگزون دوم به‌دست آمد و طراحی شد.

جدول ۱ آغازگرهای طراحی شده برای سه ژن *INT1*، *EFG1* و *ACT1*

نام آغازگر	توالی 5' 3'	T_m	طول قطعه تکثیر شده (جفت باز)
INT1. Forward	CTTTCTTCTGCCTCCCCTAG	٥٤/٢	١١٦
INT1. Reverse	GGTTTGTGAGTGGCTTTTGG	٥٦/٧	
EFG1. Forward	TGCCAATAATGTGTCGGTTG	٥٦/٧	٩٩
EFG1. Reverse	CCATCTCTTCTACCACGTGTC	٥٣/٥	
ACT1. Forward	ACGGTATTGTTTCCAACTGGGACG	٦٢/٧	١١٠
ACT1. Reverse	TGGAGCTTCGGTCAACAAAACTGG	٦٤/٢	

ساخت cDNA و انجام RT-PCR

برای سنتز cDNA بـه‌عنـوان الگـو در واکـنش RT-PCR ابتدا غلظت و خلوص RNA های اسـتخراج شـده بـه‌وسـیله دستگاه اسـپکتروفتومتر تعیـین شـد (میـزان یکسـانی از RNA نمونه‌ها یعنی حدود ۲ میکروگرم در ۲۰ میکرولیتر استفاده شد) سپس با اسـتفاده از کیـت شـرکت Thermo (آمریکـا) رشـته cDNA ساخته شد و پس از آماده‌سازی مواد برای انجام RT-PCR بـراسـاس دسـتورالعمل کیـت Master mix شـرکت Ampliqon (دانمارک) مخلوط مواد به میزان ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی (Denaturation)، ۲۰ ثانیـه در دمـای ٩٤ درجـه سانتی‌گراد و اتصال (Annealing)،۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های *INT1* و *EFG1* و دمـای ۵۸ درجـه سانتی‌گراد برای ژن *ACT1* و سـپس بسـط (Extension) ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد.

انجـام RT-PCR کمـی (RT- quantitative PCR: RT-qPCR)

برای این کار از کیـت SYBR Green PCR master mix Low ROX شرکت Ampliqon (دانمارک) استفاده شـد. ایـن واکنش توسط دستگاه Rotor Gene 3000 و به‌صورت سه بار تکرار انجام شد. برنامه‌ریزی برای PCR کمی مطابق الگوی تأیید شده در مرحله قبل انجام شد و مخلوط مواد برای ۳۵ چرخـه شامل واسرشتگی به‌مدت ۲۰ ثانیه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در دماهای به‌دست آمده از مرحله RT-PCR و بسط به‌مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، حرارت داده شد. بتا اکتین به‌عنوان یک سیستم کنترل داخلی تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج ΔCt به‌دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS نسـخه ۱۸ تحلیل شد و پس از انجام آزمـون کولمـوگروف اسـمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov Test) برای اثبـات توزیـع نرمـال داده‌ها، از طریق آزمون همگنی واریانس (homogeneity of variance) و سپس آزمون آنالیز واریانس یک طرفـه (one-way Analysis of Variance: ANOVA)، معنـی‌داری اختلاف این نتایج بررسی شـد و سـپس از طریـق دو آزمـون Post Hoc شامل Scheffe و LSD معنی‌داری اخـتلاف میـان گروه‌های مختلف شامل نمونه‌های ٢٤ سـاعت، ٤٨ سـاعت و ۷۲ ساعت مجاور شده با کامفور، ارزیابی شد.

نتایج

تعیین نتایج MIC و MFC

نتایج اثردهی رقت‌های مختلف کامفور بـر سوسپانسـیون

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

مخمری با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۳}$ سلول در میلی‌لیتر پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، با کشت مجدد روی محیط سابورو دکستروز آگار بررسی شد و نتایج MIC50، MIC90 و MFC به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲ نتایج MIC50، MIC90 و MFC حاصل از اثردهی غلظت‌های مختلف کامفور بر سلول‌های کاندیدا آلبیکنس

ماده	MIC50 (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	MIC90 (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	MFC (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
کامفور	۱٦ ±۰	۳۲ ±۰	٦٤ ±۰

بررسی‌های انجام شده نشان داد که با افزایش غلظت کامفور میزان رشد قارچ کاهش یافت و مقایسه کشت میکروپلیت‌های حاوی کامفور با میکروپلیت حاوی سوسپانسیون مخمری و محیط کشت بدون کامفور، توانایی مهار رشد قارچ توسط این ماده را اثبات کرد.

نتایج استخراج RNA از نمونه‌های گروه کنترل و آزمون

استخراج RNA از مخمرهای گروه کنترل و آزمون انجام شد و برای تأیید درستی استخراج RNA، الکتروفورز روی ژل آگارز انجام شد که RNA جدا شده فاقد آلودگی با DNA بود و باندهای 28s، 18s و 5s به خوبی مشاهده شد.

برای اندازه‌گیری خلوص و میزان دقیق RNA از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. نتایج نشان دهنده وجود حدود ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده در هر گروه با نسبت OD260/OD280>۱/۷ (Optical Density :OD) بود و خلوص بالای RNA نشان داده شد.

نتایج RT-PCR

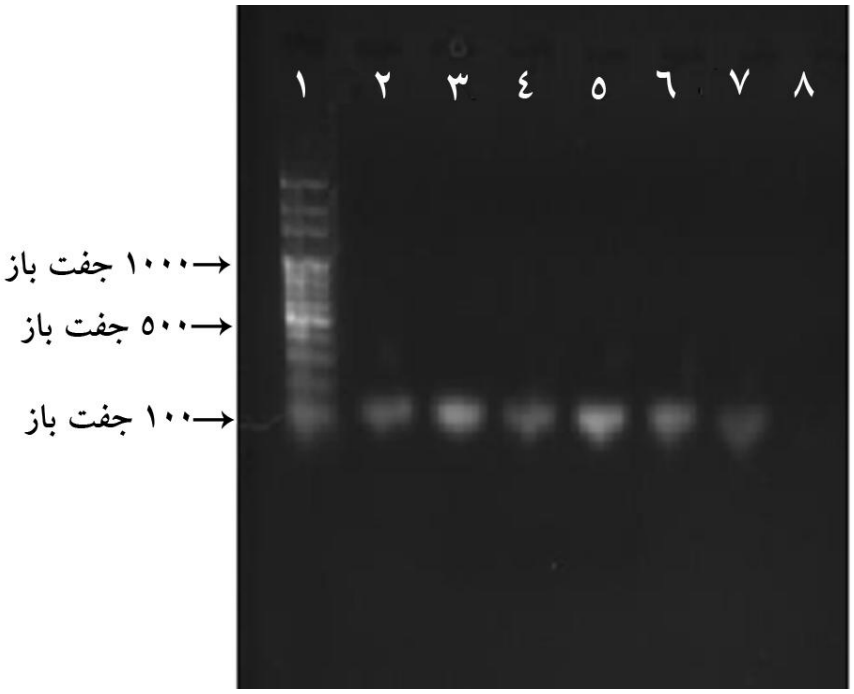
به منظور کنترل عملکرد آغازگرها، اطمینان از درستی ساخت cDNA ها و نیز طراحی فرآیند مورد نیاز برای انجام PCR کمی از نظر دما و زمان هر چرخه، ابتدا RT-PCR انجام شد و محصول تکثیر توالی ژن‌های *INT1* و *EFG1* و نیز ژن کنترل داخلی *ACT1* با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از RT-PCR کمی

با استفاده از برنامه حرارتی و زمانی مناسب و آغازگرهای پیشرونده و معکوس بیان ژن‌های *INT1* و *EFG1* طی عمل RT-qPCR سنجیده شد و به منظور اثبات بروز تغییرات ذکر شده در بیان ژن در مجاورت کامفور از یک ژن ثابت (House keeping gene) در قارچ مزبور به نام بتا اکتین استفاده شد. RT-PCR کمی به روش سایبر گرین (Sybr green) انجام شد و به‌عنوان فلوروفور (Fluorophore) زمینه از Rox استفاده شد. بررسی منحنی‌های به‌دست آمده نشان داد بیان ژن‌های *INT1* و *EFG1* در نمونه‌های کنترل تحت تأثیر هیچ‌گونه بازدارنده‌ای نبوده است. از طرف دیگر؛ در نمونه‌های خالص شده که تحت اثر کامفور قرار داشت، کاهش بیان مشاهده شد. سطح بیان ژن‌های *INT1* و *EFG1* تحت تأثیر غلظت ١٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کامفور در تیمارهای ٢٤ ساعت، ٤٨ ساعت و ٧٢ ساعت کاهش متفاوتی را نشان داد. کاهش بیان در هر سه زمان تیمار ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعتی، برای ژن *INT1* بیش از *EFG1* مشاهده شد (جدول ۳)، به طوری که بیان ژن *INT1* در زمان ٢٤ ساعت پس از تیمار به میزان ٨٧ درصد، ٤٨ ساعت پس از تیمار ٩٧ درصد و ٧٢

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

ساعت پس از تیمار ۸٦ درصد نسبت به نمونه مجاور نشده کاهش یافته است. اما در خصوص ژن *EFG1*، هرچند کاهش بیان ظرف ٤٨ ساعت تیمار با کامفور بسیار مشهود و معادل ۹۳ درصد است، ولی این میزان پس از ٢٤ ساعت تیمار ۵۸ درصد و پس از ۷۲ ساعت تیمار تنها ٤۹ درصد کاهش را نسبت به نمونه تیمار نشده نشان داده است. نمودار مربوط به دمای ذوب هر سه ژن خلوص محصول واکنش تکثیر و عدم وجود آلودگی را نشان داد (شکل ۲).

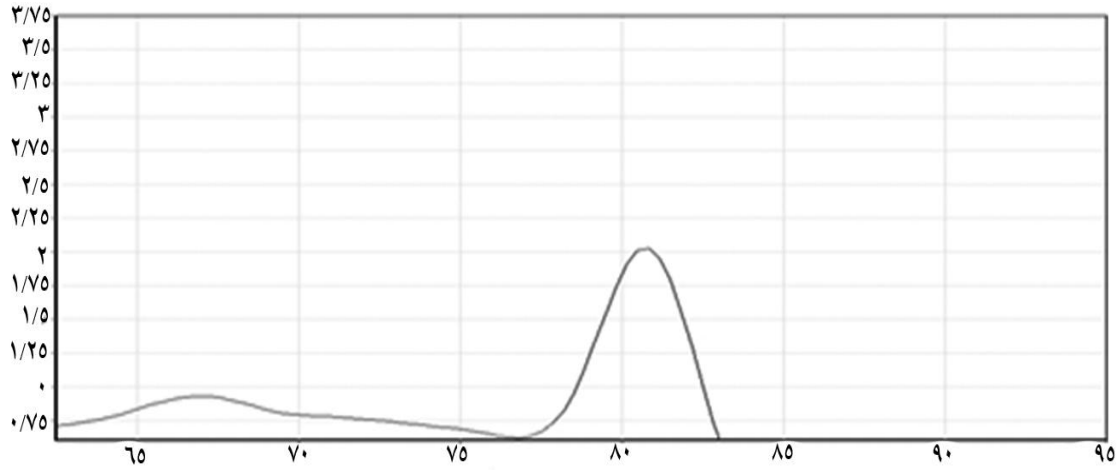


شکل ۱ باندهای حاصل از تکثیر توالی ژن‌های *INT1*، *ACT1* و *EFG1* باند ۱: نشانگر DNA تا ۱۰۰ جفت باز، باندهای ۲ و ۳: محصول تکثیر توالی ژن *INT1* به طول قطعه ۱۱٦ جفت باز، باندهای ٤ و ۵: محصول تکثیر توالی ژن *ACT1* به طول قطعه ۱۱۰ جفت باز، باندهای ٦ و ۷: محصول تکثیر توالی ژن *EFG1* به طول قطعه ۹۹ جفت باز، باند ۸: کنترل منفی

جدول ۳ میانگین نتایج ΔCt و نسبت بیان ژن به‌دست آمده از فرمول pffafl در نمونه‌های تیمار شده نسبت به کنترل

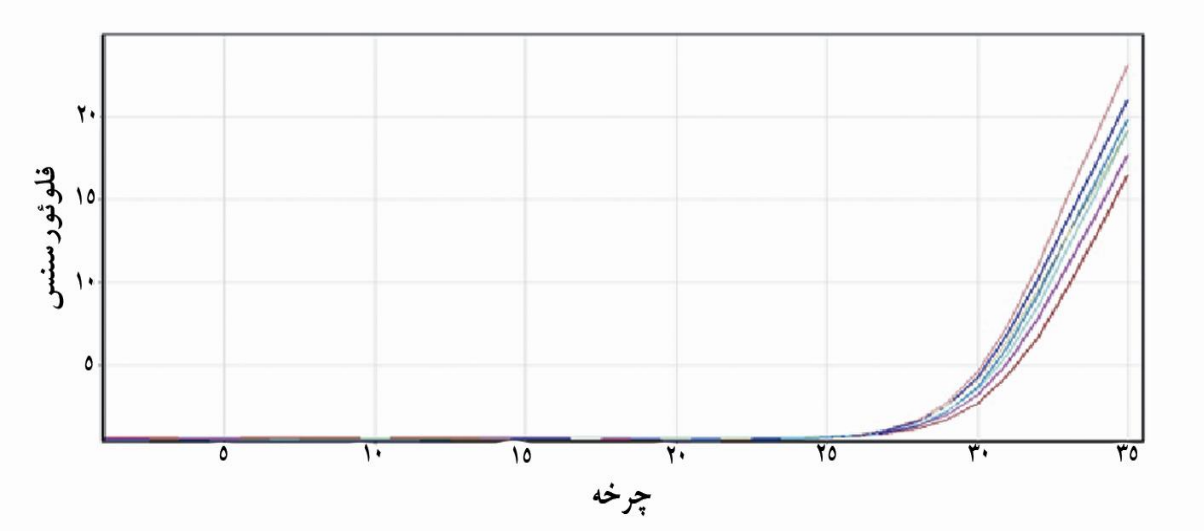
نوع نمونه	ΔCt INT1	بیان ژن INT1 نسبت به کنترل	ΔCt EFG1	بیان ژن EFG1 نسبت به کنترل
قبل از تیمار	۱/۰۵ ± ۰/۰۳	۱	۱/۲٤ ± ۰/۰٤	۱
٢٤ ساعت تیمار با کامفور	٤/۱۸ ± ۰/۰۲۵	۰/۱۳ ± ۰/۰۳۰	۲/۷۰ ± ۰/۰۲۹	۰/٤۲ ± ۰/۰۸۸
٤٨ ساعت تیمار با کامفور	٦/۵۲ ± ۰/۰۳۲	۰/۰۳ ± ۰/۰۱۸	۵/٤۳ ± ۰/۰۲۲	۰/۰۷ ± ۰/۰۱۸
۷۲ ساعت تیمار با کامفور	٤/۰۲ ± ۰/۰۱٦	۰/۱٤ ± ۰/۰۳۰	۲/۳٦ ± ۰/۰۳۸	۰/۵۱ ± ۰/۰۱۱

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]



شکل ۲ منحنی ذوب ژن *EFG1*

صعود نمودار تکثیر ژن بین محدوده چرخه ۳۵-۱۵، درستی واکنش را نشان داد. ژن‌های *INT1* و *EFG1* در نمونهٔ کنترل با سه بار تکرار به‌طور میانگین به‌ترتیب از چرخه‌های ۱/۰۱± ۲۳/٤٥ و ۱/۰۲± ۲۳/٦٤ تکثیر خود را به شکل صعودی نشان داده است، در حالی که این ژن‌ها در نمونه‌های پس از تیمار در زمان‌های مختلف از چرخه‌های بعدی تکثیر را نشان داده‌است که این موضوع خود نشان دهنده کاهش بیان این ژن‌ها است و این در حالی است که این تکثیر در خصوص ژن *ACT1* در نمونهٔ کنترل با سه بار تکرار به‌طور میانگین در چرخه ۰/۹۸± ۲۲/٤ دیده شد و این میزان در تمامی نمونه‌ها از جمله نمونه کنترل و تیمار، بیان تقریباً ثابتی داشته است که نشان دهنده عدم اثرگذاری کامفور بر بیان ژن کنترل داخلی است (شکل ۳).

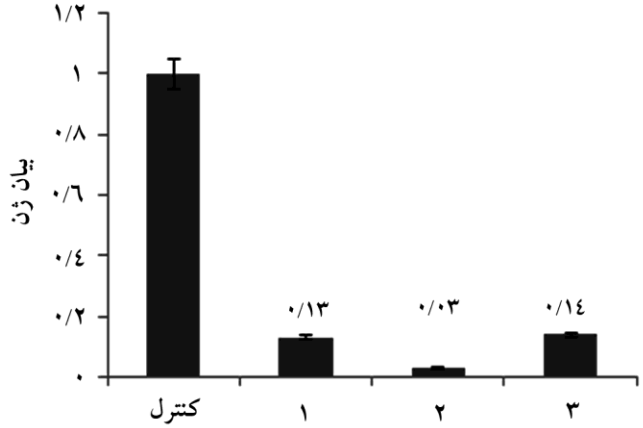


شکل ۳ نمودار بیان ژن *ACT1* در نمونه‌های مورد بررسی قبل و بعد از تیمار

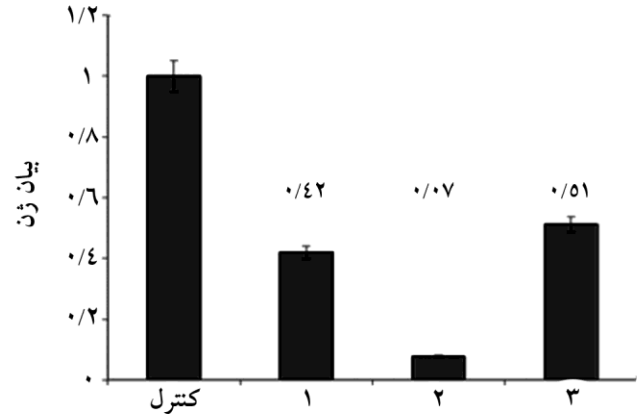
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

تحلیل آماری

در نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ΔCt ضمن اثبات شدن نرمال بودن داده‌ها و همگن بودن واریانس گروه‌های مورد آزمایش (P≥ ۰/۰۵) اختلاف معنی‌دار (P ≤ ۰/۰۵) بین این نتایج و نتیجه حاصل از گروه کنترل در هر دو ژن مشاهده شد. در بررسی اختلاف نتایج بین گروهی، تنها گروه‌هایی که اختلاف معنی‌داری در بیان ژن نسبت به یکدیگر نداشتند، گروه‌های تیمار ۲٤ ساعتی و ۷۲ ساعتی مربوط به ژن INT1 بودند ولی سایر گروه‌های تیمار ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعتی در هر دو ژن اختلاف بیان معنی‌داری را در مقایسه با یکدیگر نشان دادند. همچنین در بررسی نتایج حاصل از فرمول pffafl، به‌طور معنی‌داری کاهش بیان نسبی ژن‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل‌های ٤ و ۵).



شکل ٤ بیان ژن *INT1* پس از تیمار با کامفور نسبت به نمونه کنترل؛ ۱: ۲٤ ساعت تیمار با کامفور، ۲: ٤۸ ساعت تیمار با کامفور، ۳: ۷۲ ساعت تیمار با کامفور



شکل ۵ بیان ژن *EFG1* پس از تیمار با کامفور نسبت به نمونه کنترل؛ ۱: ۲٤ ساعت تیمار با کامفور، ۲: ٤۸ ساعت تیمار با کامفور، ۳: ۷۲ ساعت تیمار با کامفور

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

بحث

ارزیابی این‌که چطور یک بیماری‌زا به دارو حساس است و دارو قادر به درمان مؤثر و موفقیت‌آمیز است، نیازمند این است که آزمایش حساسیت دارویی در شرایط in vitro انجام شود. البته MIC تنها در برخی موارد قادر به پیشگویی نتیجه بالینی در مورد دارو است. وجود متغیرهای مختلف روی کارآیی ضد قارچی دارو اثر می‌گذارد. بروز مقاومت‌های دارویی در مقابل داروهای صناعی (Synthetic) رایج به‌خصوص در جنس کاندیدا و نیز آثار سوء جانبی که همواره در مصرف این داروها مد نظر قرار داشته است، بیش از گذشته محققین را به پژوهش در حوزه گیاهان دارویی علاقه مند کرده است [۱۸-۲۰].

دو نمونه مهم از ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی کاندیدا آلبیکنس، *INT1* و *EFG1* است. کورتینگ (Korting) و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بررسی تغییرات سطح بیماری‌زایی مخمر در حضور و عدم حضور ژن *EFG1*، نشان دادند که فعالیت این ژن نقش اصلی را در تولید هیف و ایجاد لوله زایا ایفا می‌کند [۲۱]. در خصوص ژن *INT1* نیز در پژوهش انجام شده توسط کالدرون (Calderone) و همکاران در سال ۲۰۰۱ مشخص شد که سویه‌هایی از کاندیدا آلبیکنس که این ژن در آن‌ها حذف شده، دچار کاهش بیماری‌زایی شده و میزان اتصال به رده سلولی اپی‌تلیالی در آن‌ها به میزان ٤٠ درصد کاهش یافته است. همچنین این سویه‌ها توانایی تولید هیف را از دست دادند [۲۲]. با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته به نظر می‌رسد اگر بتوان عملکرد این دو ژن را تا حد قابل قبولی کاهش داد، می‌توان احتمال داد که بیماری‌زایی قارچ در حالت تهاجمی کاهش یافته یا نسبتاً مهار شده است. ترکیب کامفور که در اغلب گیاهان دارویی به‌عنوان یک ماده مؤثر دارای خاصیت ضد میکروبی با غلظت‌های مختلفی وجود دارد، توسط برخی محققین بررسی شده است. در این خصوص ماهیل راجان (Mahilrajan) و همکاران در پژوهش خود در سال ۲۰۱٤ خاصیت ضد قارچی کامفور را بر علیه قارچ‌های فرصت طلب (Saprophytic fungi) به اثبات رساندند [۱۳]. همچنین در بررسی به‌عمل آمده توسط مهبودی و کاظم پور در سال ۲۰۰۹ آثار ضد کاندیدایی کامفور تنها در سطح تعیین MIC و نیز تعیین منطقه مهار رشد به روش دیسک‌گذاری، اثبات شد و با توجه به روش انجام آزمایش و استفاده از محلول تجاری کامفور، MIC معادل ۲ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر به‌دست آمده است [۲۳] . اما با بررسی‌های به‌عمل آمده، فعالیتی در سطح مولکولی در خصوص اثر این ترکیب بر مهار هیچ یک از عوامل بیماری‌زای قارچ‌ها به‌دست نیامد و هدف اصلی از انجام این پژوهش بررسی اثر کامفور بر بیان ژن‌های ویرولانس *INT1* و *EFG1* در کاندیدا آلبیکنس بود. همان‌گونه که از نتایج این پژوهش بر می‌آید، کمترین سطح بیان برای هر دو ژن، در زمان ٤٨ ساعت پس از تیمار و بیشترین بیان ژن در ۷۲ ساعت پس از تیمار دیده شده است. نمی‌توان ادعا کرد که این کاهش بیان در تیمارهای ٤٨ ساعتی نسبت به تیمارهای ۷۲ ساعتی، قطعاً تعیین کننده بهترین زمان اثر دارو است؛ چرا که اطلاعاتی درخصوص وجود یا عدم وجود بقایای دارو در محیط در تیمارهای ۷۲ ساعتی با مخمر در دست نیست و بررسی در این خصوص انجام نشده است. همان‌طور که از نتایج برمی‌آید، اثر کامفور بر کاهش بیان ژن *INT1* نسبت به *EFG1* بیشتر است که البته تاکنون درخصوص علت این موضوع پژوهشی صورت نگرفته است. همچنین مشخص شد که افزایش بیان ژن *INT1* در تیمارهای ۷۲ ساعتی با کامفور به شکلی بوده است که سطح بیان ژن را به مقادیر مشابه آن در تیمارهای ۲٤ ساعتی بسیار نزدیک کرده است ولی در خصوص ژن *EFG1*، سطح بیان این ژن در تیمارهای ۷۲ ساعتی با کامفور، نسبت به سایر تیمارها به میزان قابل توجهی بیشتر است و این موضوع نیز با توجه به ادعای گذشته، قطعاً نمی‌تواند اثبات وجود بهترین اثر دارویی در تیمار های ٤٨ ساعتی باشد.

به هر حال نکته مهمی که در نتیجه این تحقیق به چشم

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

می‌خورد این است که با توجه به کاهش چشم‌گیر بیان هر دو ژن پس از ٤٨ ساعت تیمار با ماده کامفور، انتظار می‌رفت که این کاهش بیان ژن در زمان ٧٢ ساعت تیمار با این ماده نیز حفظ شده یا کاهش بیان ملموس‌تر شود، ولی نتایج نشان دهنده این مطلب بود که بیان هر دو ژن پس از ٧٢ ساعت تیمار با این ماده، نسبت به بیان ژن پس از ٤٨ ساعت تیمار، بیشتر است. توجیه این مطلب نیاز به بررسی‌های تکمیلی بیشتر دارد چرا که تاکنون تأثیر زمان بر افزایش یا کاهش آثار دارویی این ترکیب در هیچ پژوهشی سنجیده نشده است ولی یکی از احتمالاتی که شاید بتوان در این خصوص عنوان کرد، نیمه عمر مؤثر این ماده در مجاورت با مخمر کاندیدا آلبیکنس یا به طور کلی باقی ماندن دارو در محیط پس از ٧٢ ساعت است که البته اثبات این مدعا بررسی‌های بیشتری را طلب می‌کند. ضمناً تاکنون هیچ پژوهشی درخصوص بررسی مکانیسم اثر کامفور بر رشد قارچ‌ها از جمله کاندیدا آلبیکنس صورت نگرفته است و این‌که چگونه مجاورت با این ماده می‌تواند موجب تغییردرسطح بیان ژن‌های بیماری‌زای قارچ‌ها شود، مشخص نیست و این مهم با ادامه پژوهش‌ها در این حوزه و بررسی مسیرهای بیوشیمیایی و نیز بررسی ساختار فیزیکی قارچ‌ها که توسط این ماده مورد مداخله قرار گرفته‌اند، مشخص خواهد شد.

اهمیت موضوع جایگزینی داروهای مصنوعی با داروهای دارای منبع طبیعی و به ویژه گیاهی زمانی بیشتر نمایان می‌شود که با پیشرفت روز افزون علوم پزشکی به‌ویژه در حوزه داروشناسی و داروسازی، مقاومت‌های دارویی بیش از پیش خود را نشان داده و به یک نگرانی برای جامعه پزشکی مبدل شده است و در نتیجه پژوهش‌هایی از این دست، می‌تواند افق دید روشنی در پیش روی صنعتگران عرصه دارو به منظور بهره‌گیری بیشتر از منابع طبیعی در طراحی داروهای نوین قرار دهد. با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته، نقش بیماری‌زایی دو ژن *INT1* و *EFG1* در مخمر کاندیدا آلبیکنس به اثبات رسیده است و همچنین به استناد نتایج به‌دست آمده از مطالعه پیش رو و نیز مطالعات اشاره شده، خاصیت ضد قارچی کامفور نیز به خوبی مشخص است و بنابراین به نظر می‌رسد اگر بتوان عملکرد این دو ژن را به کمک موادی همچون کامفور تا حد قابل قبولی کاهش داد، می‌توان احتمال داد که بیماری‌زایی قارچ در حالت تهاجمی کاهش یافته است و همان‌طور که نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد، ترکیب خالص کامفور آثار جدی در کاهش بیان این دو ژن مهم دخیل در بیماری‌زایی کاندیدا آلبیکنس داشته است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است و تمام هزینه‌های مالی این طرح توسط این دانشگاه تأمین شده است. نگارندگان مراتب احترام و قدردانی خود را از تمامی اساتید زحمت‌کش گروه قارچ شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و نیز دانشجویان مقطع دکتری که آنان را در این پژوهش یاری نمودند، اعلام می‌نمایند؛ همچنین از گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تأمین بخشی از نیازهای سخت‌افزاری این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Zeini F, Mahbod ASA, Emami M. Comprehensive medical mycology. 3th ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Press, 2011; p: 334-48. (Persian)

[2] Tsai PW, Chen YT, Hsu PC, Lan CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

host: A mini review. BioMedicine 2013; 3(1): 51-64.

[3] Shareck J, Nantel A, Belhumeur P. Conjugated linoleic acid inhibits hyphal growth in Candida albicans by modulating Ras1p cellular levels and downregulating TEC1 expression. Eukaryot Cell 2011; 10(4): 565-77.

[4] Yang YL. Virulence factors of Candida species. J Microbiol Immunol Infect 2003; 36(4): 223-8.

[5] Naglik JR, Richardson JP1, Moyes DL Candida albicans pathogenicity and epithelial immunity. PLoS Pathog 2014; 10(8): e1004257.

[6] Liu H. Transcriptional control of dimorphism in Candida albicans. Curr Opin Microbiol 2001; 4(6): 728-35.

[7] Kinneberg KM, Bendel CM, Jechorek RP, Cebelinski EA, Gale CA, Berman JG, Erlandsen SL, Hostetter MK, Wells CL. Effect of INT1 gene on Candida albicans murine intestinal colonization. J Surg Res 1999; 87(2): 245-51.

[8] Calderone R. The INT1 of Candida albicans. Trends Microbiol 1998; 6(8): 300-1.

[9] Rezaeemanesh M, Shirbazoo S, Pouryaghoub N. In-Vitro Giardicidal Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Chenopodium Botrys L. on Giardia Lamblia Cysts. Journal of Health Chimes 2013; 1(1): 21-31. (Persian)

[10] Bakhshi Khaniki G, Falaki M, Lotfi Gharaei A, Asri Y. The Anatomical Study of Leaf and Stem in Some Species of Atriplex L. and Chenopodium L. in Southern Khorasan Province. NCMBJ 2012; 2(7): 57-74. (Persian)

[11] Feizbakhsh A, Sedaghat S, Tehrani MS, Rustaiyan A, Masoudi S. Chemical Composition of the Essential Oils of *Chenopodium botrys L.* from Two Different Locations in Iran. Journal of Essential Oil Research 2003; 15(3): 193-4.

[12] Chalabian F, Monfared A, Larijani K, Saldoosi S. Comparison of the Essential Oils of *Chenopodium botrys L.*, *Ferulago subvelutina Rech.F*, *Rosa gallica L.* and Antimicrobial Activity of the Oils against some Microbes. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants 2006; 22(2): 146-54. (Persian)

[13] Mahilrajan S, Nandakumar J, Kailayalingam R, Manoharan NA, SriVijeindran S. Screening the antifungal activity of essential oils against decay fungi from palmyrah leaf handicrafts. Biol Res 2014; 47(1): 35.

[14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition.CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute; 2008. Available from: http://shop.clsi.org/microbiology-documents/M27.html

[15] Li RK, Elie CM, Clayton GE, Ciblak MA. Comparison of a new colorimetric assay with the NCCLS broth microdilution method (M-27A) for antifungal drug MIC determination. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2334-8.

[16] Xie JL, Singh-Babak SD, Cowen LE. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Assay for Antifungal Drugs. Bio-protocol 2012; 2(20): e252.

[17] Moazeni M, Khoramizadeh MR, Teimoori-Toolabi L, Noorbakhsh F, Rezaie S. The effect of EFG1 gene silencing on down-regulation of SAP5 gene, by use of RNAi technology. Acta Med Iran 2014; 52(1): 9-14.

[18] Farahbakhsh E, Yadegari M, Rajabi Bazl M,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

Taghizadeh Armaki M. Evaluation of Susceptibility of Strains of Candida Albicans Isolated from AIDS Patients to Fluconazole and Determination of CDR2 Resistance Gene in Resistant Strains by RT-PCR Method. Armaghane Danesh 2011; 16(3): 201-10. (Persian)

[19] Taghizadeh Armaki M, Yadegari MH, Rajabi Bazl M, Farahbakhsh E, Katiraee F. Overexpression of efflux pumps genes in resistant *candida albicans* clinical isolated from oral colonization in iranian hiv-positive patients. International Journal of Development Research 2014; 4(9): 1970-7.

[20] Nasrollahi Z, Yadegari MH, Roudbar Mohammadi S, Roudbary M, Hosseini Poor M; Nikoomanesh F, Rajabi Bazl M. Fluconazole resistance *Candida albicans* in females with recurrent vaginitis and Pir1 overexpression. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(9): e21468.

[21] Korting HC, Hube B, Oberbauer S, Januschke E, Hamm G, Albrecht A, Borelli C, Schaller M. Reduced expression of the hyphal-independent Candida albicans proteinase genes SAP1 and SAP3 in the efg1 mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. J Med Microbiol 2003; 52(Pt 8): 623-32.

[22] Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol 2001; 9(7): 327-35.

[23] Mahboubi M, Kazempour N. The antimicrobial activity of essential oil from Perovskia abrotanoides karel and its main components. Indian J Pharm Sci 2009; 71(3): 343-7.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]