Research Paper

The Synergistic Activity of Eugenol and Fluconazole on the Induction of Necrosis and Apoptosis in Candida Krusei Isolates of HIV+ Patients With Oral Candidiasis

Hojjatollah Shokri[1], *Mohammadhassan Minooieanhaghighi[2], Aghil Sharifzadeh[3]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.
3. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shokri H, Minooieanhaghighi M, Sharifzadeh A. [The Synergistic Activity of Eugenol and Fluconazole on the Induction of Necrosis and Apoptosis in Candida Krusei Isolates of HIV+ Patients With Oral Candidiasis (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(4):434-449. https://doi.org/10.32598/hms.27.4.13.2

https://doi.org/10.32598/hms.27.4.13.2

CC BY NC

Received: 29 Jan 2021
Accepted: 02 Jun 2021
Available Online: 01 Oct 2021

Key words:
Candida krusei, Eugenol, Fluconazole, Antifungal effect, synergy, Necrosis, Apoptosis

ABSTRACT

Aims The oral cavity contains more than 200 microbial species. Candida species are also part of the fungal flora of the oral cavity. In recent years, Candida krusei, as a common oral candida in AIDS patients, has been shown resistant to some antifungal drugs. The emergence of multidrug-resistant fungi, especially in immunodeficient populations, is a major global problem. Today, medicinal plants and their pure compounds in treating infectious diseases have provided a new horizon. This study aimed to investigate the synergistic activity of eugenol and fluconazole on the necrosis and apoptosis of Candida krusei (C. krusei) isolates from HIV+ patients with oral candidiasis.

Methods & Materials The antifungal susceptibility tests were performed using the broth microdilution (CLSI, M27-A2) method, and the synergy between eugenol and fluconazole was evaluated using the checkerboard method. Necrotic and apoptotic effects of different antifungal agents against C. krusei were analyzed using the flow cytometry method.

Findings In antifungal susceptibility tests by microdilution broth, the mean minimum inhibitory concentration (MIC) values of eugenol and fluconazole for C. krusei isolates were 755.06 and 60.1 µg/mL, respectively. According to the checkerboard test results, eugenol in combination with fluconazole exhibited significant synergistic effects against most of the yeast isolates tested (P<0.05). Eugenol decreased approximately 81.81% of the MIC value of fluconazole in growth inhibition of C. krusei. The flow cytometry test results indicated that eugenol plus fluconazole has significant necrotic effects on C. krusei isolates compared with the control group (P<0.05). In contrast, minor early and late apoptotic effects of this compound were observed.

Conclusion Eugenol can be used to reduce fluconazole dose, inhibit the growth of fluconazole-resistant C. krusei, and the necrosis of yeast cells.

English Version

1. Introduction

The oral cavity contains more than 200 microbial species, so the incidence of bacterial and fungal infections in the mouth is high. The most common bacterial flora in saliva, tongue, and gums include the Streptococcus species [1]. Candida species are also part of the coexisting fungal flora of the oral cavity, which has different oral transport rates in different age groups and background conditions. These predisposing conditions in-

* *Corresponding Author:*
Mohammadhassan Minooieanhaghighi, PhD.
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.
Tel: +98 (915) 533472
E-mail: drminooeian@gmu.ac.ir

clude immunosuppressive diseases or infections, such as human immunodeficiency virus, diabetes mellitus, long-term corticosteroid therapy, organ transplantation, and chemotherapy for cancer. Under these conditions, a weakened immune system gives the candidate yeast in the body a chance to multiply and grow and cause disease. The highest rates of oral candidiasis are reported in healthy children, the elderly, and AIDS patients [2].

Oral candidiasis is often caused by Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis, Candida dublinensis, Candida parapsilosis, and Candida krusei [3]. In recent years, oral colonization with Candida krusei has become common as an emerging yeast agent, especially in patients with AIDS that accounts for about 20% of yeasts isolated from the culture of AIDS patients [4]. Despite the wide range of effective antifungal and antiviral therapies that improve the immune system in AIDS patients, one of the main problems in the treatment of AIDS patients with oral candidiasis is drug resistance due to prolonged treatment period, recurrent relapse, and lack of various antifungal drugs on the market. Multiple studies have shown that Candida krusei, as a common oral Candida species in this group of patients, has shown resistance to some antifungal drugs such as azoles, which has led to treatment failure in treated patients [5].

The use of natural antimicrobial compounds in treating diseases has been common since ancient times. Today, the use of herbal medicines and their pure compounds in treating some infectious diseases has opened new horizons for patients. Extensive research is being done in Iran and the world on natural antifungal compounds [6]. One of these pure compounds is eugenol (4-allyl 2-methoxyphenyl), an allyl derivative of guaiacol. This compound is a member of the phenylpropanoid family with a molecular weight of 164.20 g/mol. It forms a sticky solution in water, while it dissolves well in organic solvents. Cloves, cinnamon, and nutmeg contain significant amounts of this compound [7]. Eugenol is effective in vitro against yeasts, colored and clear filamentous fungi, and mycotoxin-producing fungi also its inhibitory effects on various Candida species have been demonstrated in previous studies [8, 9]. Studies have shown that eugenol has an antifungal effect against Candida yeasts in the range of 350 to 500 µg/mL [10]. Researchers have also demonstrated that combining pure herbal substances with antifungal chemical drugs can significantly help treat patients with candidiasis by reducing the dose of chemical drugs, reducing side effects, and creating synergistic impact [11].

To date, no studies have been performed on the necrotic and apoptotic effects of the combination of eugenol with fluconazole on Candida species. In this study, we evaluated the synergistic effects of antifungal, necrosis, and apoptosis of the natural substance of eugenol in combination with fluconazole against candidate strains isolated from the mouth of AIDS patients. Our results can help meet the scientific needs of the country, commercialization, and manufacture of pharmaceutical products based on natural compounds available in Iran for the treatment of oral candidiasis in humans.

2. Materials and Methods

Fungal isolates and their identification

This study is experimental-laboratory research. In this study, ten clinical strains of Candida krusei (C.k1-10) (isolated from the mouth of HIV+ patients) and one standard strain of Candida krusei (ATCC6258) were used. All yeast isolates were cultured on a Saburaud dextrose agar (Merck) medium and incubated at 37°C for 2 to 3 days. All Candida krusei isolates were identified using standard mycological methods such as chromium agar culture (Paris France Company) and sugar uptake and fermentation tests using RAPIDTM kit (Innovative Diagnostic Systems, USA).

Antifungal compounds and their preparation in different dilutions

In this study, a natural herbal compound called eugenol (Sigma-Aldrich, USA) and a chemical antifungal drug called fluconazole (Sigma-Aldrich, USA) were used. For the experiment, double dilutions of eugenol from 9.76 to 5000 µg/mL and double dilutions of fluconazole from 0.031 to 512 µg/mL were prepared. Isopropanol 70% (Merck) and sterile distilled water were used to prepare dilutions of eugenol and fluconazole, respectively.

Preparation of yeast suspension

To prepare a standard yeast suspension, Candida krusei isolates were first cultured in Saburaud dextrose agar and incubated at 37°C for 24 hours. The inoculum suspension was prepared by harvesting five colonies (about 1 mm in diameter) from the fresh culture in 10 mL of physiological saline (0.85% saline). The suspension was vortexed for 15 seconds, and the cell density was determined by McFarland (0.5) method so that the number of yeast cells was finally adjusted to 0.5 × 103 cells/mL [10].

Antifungal susceptibility testing

The anticandidal activity of the studied compounds was evaluated by serial dilution method in liquid medium (microdilution broth) according to the proposed CLSI method called M27-A2 [12]. In this method, the Minimum

Inhibitory Concentration (MIC) was determined using RPMI1640 (Merck) medium containing glutamine and glucose with MOPS buffer with pH 7. Also, 96-plate sterile bottom polystyrene plates were used for the experiment, so that in each well, 100 µL of dilutions of the test compounds and 100 µL of yeast suspension (0.5×103 cells/mL) were added. For each yeast, a negative control well (no-yeast pit) and a positive control well (drug-free pit) were considered. Each experiment was repeated twice separately.

The MIC after 24 hours of microplate incubation at 35°C was determined by ELISA reader. To determine the Minimum Fungicidal Concentration (MFC), 100 µL of the concentration specified as the MIC as well as a few concentrations higher than the MIC, which also appeared to be macroscopically clear, was cultured on Saburaud dextrose agar medium and was examined in an incubator at 35°C after 24 hours. The minimum concentrations that inhibited the growth of Candida species were considered as MFCs. The criterion for sensitivity or resistance to fluconazole has been proposed by CLSI [12]: MIC≥ 8 µg/mL is known as susceptible, MIC≥16-32 µg/mL is known as dose-dependent, and MIC≤64 µg/mL is known as resistant.

Checkerboard Synergy Test

A checker synergy test was performed to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) and Fractional Inhibitory Concentration (FIC) [13]. For this purpose, double serial dilutions of eugenol and fluconazole were prepared. In other words, 50 µL of each dilution of eugenol and fluconazole was added to each plate of 96 cells. Also, 100 µL of yeast suspension of 0.5×103 cells/mL was added to each well and incubated at 35°C for 48 h. The FIC rate was calculated according to the following formula:

FIC drug = "MIC combination drug" / "MIC drug alone"

The synergy of drugs (FICI) was obtained by combining FIC eugenol and FIC fluconazole. The interpretation of the checkboard test is as follows: FICI ≤0.5 (synergistic effect), 1<FICI <0.5 (additive effect), 1 <FICI ≤ 4 (ineffective), FICI> 4 (antagonistic effect).

Evaluation of necrosis and apoptosis by flow cytometry

To determine the percentage of necrotic and apoptotic cells in the population of drug-treated yeasts and compare it with the control population, we stained the yeasts with two dyes of annexin V and Propidium Iodide (PI) using the commercial Annexin-V-FLUOS staining Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For this purpose, standard Candida krusei isolates (2 × 106 cells/mL) were incubated in broth dextrose containing eugenol and fluconazole for 24 hours at 30°C. Yeast cells were harvested by centrifugation and washed with potassium phosphate buffer (0.1 M). Annexin V / PI test was performed according to the protocol of the staining kit using 5 µg of annexin V and 5 µg of PI at 37°C for 20 minutes. Candidate apoptosis was then analyzed using a C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). In this analysis, cells that lost their membranes during programmed death transfer phosphatidylserine from the inner surface to the outer surface of the membrane. Accordingly, annexin V is attached to the phosphatidylserine on the outer surface of the cell and is detected by flow cytometry. Also, the PI attached to the DNA of the fragmented nucleus of dead cells is detected by flow cytometry [14].

Statistical analysis

For statistical analysis, a t-test was used to compare the means of the groups and 1-way ANOVA to find the maximum and minimum effect of the studied materials in all groups. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

Antifungal Susceptibility Testing

The MIC and MFC values of eugenol and fluconazole against clinical isolates of Candida krusei are presented in Table 1. The MIC values of Candida krusei yeasts for eugenol ranged from 312.5 to 1250 µg/mL (geometric mean: 755. 06 µg/mL) and for fluconazole from 8 to 128 µg/mL (geometric mean: 60.1 µg/mL). About 81.8% of the tested Candida krusei strains were resistant to fluconazole. The geometric mean values of MFC eugenol and fluconazole were 1173.66 and 120.2 µg/mL, respectively.

Checkboard Test

The FICI index values for eugenol and fluconazole against different strains of Candida krusei are shown in Table 2. The FICI index range for eugenol + fluconazole was calculated between 0.25 and 0.75 for yeasts. The combination of eugenol with fluconazole had a synergistic effect on 90.9% of clinical isolates of Candida krusei. Statistical analysis of the checkboard test showed a significant synergistic effect between eugenol and fluconazole against the candidate isolates under study (P <0.05). The results showed that eugenol could reduce fluconazole MIC by 81.81% in inhibiting the growth of Candida krusei. Also, in this study, no antagonistic effect was observed between eugenol and fluconazole.

Flow Cytometry Test results

As seen in histograms (Figure 1):

Area Q1: Necrotic cells with PI^+ Annexin V^-

Area Q2: Cells in the final apoptotic stage with PI^+ Annexin V^+

Area Q3: Cells in the stage of early apoptosis with PI^- Annexin V^+

Area Q4: Healthy cells with PI^- Annexin V^- specificity

Flow cytometry results showed that the combination of eugenol + fluconazole had a significant necrotic effect on clinical isolates of Candida krusei compared to the control group ($P < 0.05$). In contrast, the impact of primary and final apoptosis on this yeast isolate was low (Table 3).

4. Discussion

One of the biggest obstacles to overcoming candida infections of the mouth is using treatment with an antifungal drug, which leads to the emergence of resistance in pathogenic yeasts [15]. Therefore, searching for safe and effective natural ingredients with few side effects is very important. This study aimed to evaluate the synergistic effect of one of the phenylpropanoid compounds in the essential oil of some medicinal plants called eugenol in combination with fluconazole and determine their necrotic and apoptotic effect against clinical isolates of Candida krusei.

In the current study, the mean MIC of fluconazole against Candida krusei isolates was about 60.1 µg/mL and among all the yeasts tested, about 81.8% of them showed significant resistance to fluconazole. The research results by other researchers showed that Candida krusei strains with high MIC values between 50 and 179 µg/mL fluconazole showed high resistance, which is consistent with our findings [13, 16]. Most antifungal drugs used topically and systemically today are azoles. Among azoles, fluconazole is most commonly used to treat candida infections. Although this chemical antifungal drug inhibits fungal cell growth by inhibiting the production of ergosterol in the plasma membrane of Candida species, most strains of Candida krusei are inherently resistant to fluconazole. Therefore, using compounds with high inhibitory activity is necessary to treat infections caused by this species.

The current study results showed that the natural composition of eugenol with a MIC range from 312.5 to 1250 µg/mL has an antifungal effect against resistant Candida krusei isolates. With increasing eugenol concentration in the experimental medium, the growth of candidate isolates gradually decreased. Other researchers have demonstrated the antifungal activity of eugenol against Candida species. In this case, Ahmed et al. [17] showed that eugenol at concentrations of 475-500 µg/mL is an effective natural antifungal compound against candidiasis. In a study by Marcus Arias et al. [9], eugenol concentrations 450-500 µg/mL inhibited the growth of various Candida species, especially Candida krusei. Also, Gallucci et al. [15] reported that eugenol with MIC and MFC values of 880 and 1090 µg/mL, respectively, inhibited the growth and death of Candida krusei strains. Several studies, such as Benis et al. [18] and Braga et al. [19] studies investigated the mechanism of action of eugenol against fungi. Using electron microscopy, the researchers showed that eugenol causes superstructure morphological changes in the membranes of Candida species. In this regard, following the treatment of yeast cells with eugenol at a rate of 500 µg/mL, a significant increase was observed in the number of damaged candidate yeasts with rough and wrinkled surfaces. Researchers have suggested that eugenol, due to its lipophilic properties, can penetrate the fatty acyl chains of the bilayer membrane of yeast plasmalemma and alter the permeability of the cell membrane [20]. Other researchers have shown that eugenol at a concentration of 500 µg/mL inhibits the H^+-ATPase activity of Candida species, the ion transport pathway, and the release of H+ stimulated by glucose [21].

Combining molecules with different mechanisms of action is a good strategy for the combined treatment of infectious diseases because it will reduce the side effects, toxicity, and overall dose of the drugs. In our study, the FICI values of the combination of eugenol and fluconazole for Candida krusei isolates were between 0.25 and 0.75. Therefore, a significant decrease (81.81%) in MIC was observed after combining eugenol with fluconazole. Synergistic effects were seen in 90.9% of Candida krusei isolates. Compounds in essential oils are effective in synergistic, augmentative, and antagonistic activities. The synergistic effects of eugenol and antifungal drugs have been evaluated in previous studies. Consistent with our findings, Ahmad et al. [13] showed that eugenol and methyl eugenol combined with fluconazole with FICI values of 0.55-0.31 and 0.58-0.24, respectively, have synergistic effects on Candida species. Other researchers have reported synergistic effects of the combination of eugenol with fluconazole [22], eugenol with amphotericin B [23], and eugenol with nystatin [11]. The role of major constituents of essential oils such as eugenol in such interactions has not been fully studied. Eugenol is thought to interfere with the plasma membrane of the fungal cell and facilitate the penetration of other antifungal drugs such as azoles into the cell.

Table 1. Minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration values of eugenol and fluconazole against candida krusei strains

Drug (µg/mL)	Eugenol		Fluconazole		
Candida Krusei Strains	MIC	MFC	MIC	MFC	Interpretation of Results
C.k1	1250	2500	64	128	Resistant
C.k2	625	1250	128	256	Resistant
C.k3	1250	2500	128	256	Resistant
C.k4	625	625	64	128	Resistant
C.k5	1250	1250	128	256	Resistant
C.k6	625	1250	128	256	Resistant
C.k7	1250	1250	8	16	sensitive
C.k8	625	1250	64	128	Resistant
C.k9	625	1250	8	16	sensitive
C.k10	625	625	128	256	Resistant
ATCC6258	312.5	625	64	128	Resistant
Geometric mean	755.06	1173.66	60.1	120.2	-

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 2. Results of eugenol-fluconazole combination checker test against candida krusei (C.k) strains

Candida Krusei Strains	Combined MIC (µg/mL)		FIC	FIC Fluconazole	Combined FICI	Interpretation of Results	Percentage Reduction of Fluconazole MIC
	Eugenol	Fluconazole	Eugenol				
C.k1	2.156	8	12.0	13.0	25.0	Synergistic	5.87
C.k2	2.156	8	25.0	06.0	31.0	Synergistic	75.93
C.k3	5.312	16	25.0	13.0	38.0	Synergistic	5.87
C.k4	1.78	16	12.0	25.0	37.0	Synergistic	75
C.k5	5.312	8	25.0	06.0	31.0	Synergistic	75.93
C.k6	1.78	16	12.0	13.0	25.0	Synergistic	5.87
C.k7	625	2	50.0	25.0	75.0	Incremental effect	75
C.k8	1.78	16	12.0	25.0	37.0	Synergistic	75
C.k9	2.156	2	25.0	25.0	5.0	Synergistic	75
C.k10	2.156	32	25.0	25.0	5.0	Synergistic	75
ATCC6258	1.78	16	25.0	25.0	5.0	Synergistic	75

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; FIC: Fractional Inhibitory Concentration; FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index.

Table 3. Results of necrosis and apoptosis tests determined by flow cytometry on the effect of eugenol with fluconazole combined on candida krusei strains

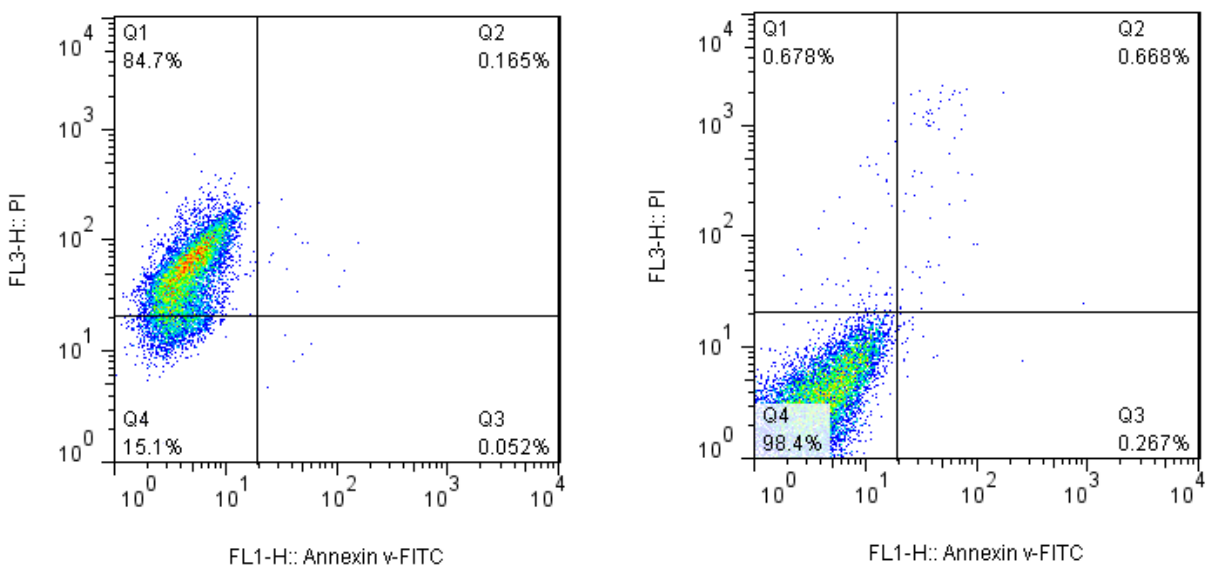
Eugenol + Fluconazole	Control	Candida Krusei ATCC 6258
7.84	678.0	Necrotic cells (Q1: PI^+ / $FITC^-$)
165.0	668.0	Final apoptotic cells (Q2: PI^+ / $FITC^+$)
052.0	267.0	Primary apoptotic cells (Q3: PI^- / $FITC^+$)
15.1	4.98	Healthy cells (Q4: PI^- / $FITC^-$)

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

In this study, flow cytometry showed that the combination of eugenol plus fluconazole has a high necrosis effect and, to a lesser extent, early and late apoptosis on clinical isolates of Candida krusei. According to our extensive research, no studies have been performed on the synergistic effects of necrosis and apoptosis of eugenol with antifungal drugs. Our results are the first laboratory findings reported in the field of combination therapy. However, few reports exist on the necrotic and apoptotic effects of eugenol and its derivatives on Candida species. Lone et al. [24] showed that eugenol derivatives could induce necrosis and apoptosis of yeast cells through the metacaspase pathway. The researchers also showed that eugenol causes yeast necrosis by DNA damage, mitochondrial depolarization, and decreased cytochrome C oxidase activity. Also, in the study of Raja et al. [25], eugenol caused necrosis and apoptosis of yeast cells by reducing ergosterol biosynthesis. In general, the processes of apoptosis and necrosis can be induced by different internal and external stimuli, and their induction, especially in yeast cells, can be considered as a suitable model for monitoring new antifungal agents and treating patients with fungal infections [26].

5. Conclusion

The current study showed that eugenol is a natural monoterpene with antifungal activity and is effective against fluconazole-sensitive oral candida isolates. The combination of eugenol with fluconazole showed a strong synergistic effect that was associated with a significant reduction in the minimum dose of fluconazole. Eugenol in combination with fluconazole also had significant synergistic effects in the development of yeast necrosis. Therefore, combining a natural substance such as eugenol with a chemical drug



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. Histogram of flow cytometry test for standard candida krusei (ATCC 6258) strains treated with a combination of eugenol and fluconazole: Eugenol (78.1 µg/mL) + Fluconazole (16 µg/mL) and Control

like fluconazole can both increase the effectiveness of the chemical drug and reduce the dose of the chemical drug, which in turn reduces the side effects of the chemical drug. According to the study results, combination therapy can be a suitable therapeutic approach in cases of treatment failure and resistance to antifungal drugs in AIDS patients with oral candidiasis.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the University Ethics Committee according to the confirmation letter No. 9055/20/98 dated 04/21/2020.

Funding

This research project was approved by the Amol University of New Technologies. An oral sampling of HIV+ patients was referred to Imam Khomeini Hospital of Tehran University of Medical Sciences. Experiments were performed at the Mycology Center of the Amol University of New Technologies in 2020.

Authors' contributions

All authors have contributed to the design, execution, and writing of all sections of the current study.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

افق دانش
فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گناباد

مقاله پژوهشی

ارزیابی عملکرد هم‌افزایی ضد کاندیدایی اوژنول و فلوکونازول و القای نکروز و آپوپتوز در جدایه‌های کاندیدا کروزئی بیماران ایدزی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی

حجت اله شکری[۱]، *محمد حسن مینوئیان حقیقی[۲]، عقیل شریف‌زاده[۳]

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۲. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۰ بهمن ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۱۲ خرداد ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۰

چکیده

اهداف حفره دهان دارای بیش از ۲۰۰ گونه میکروبی است. گونه‌های کاندیدا، بخشی از فلور قارچی حفره دهان می‌باشند. در سال‌های اخیر، کاندیدا کروزئی به عنوان یک گونه کاندیدایی شایع دهانی در بیماران ایدزی نسبت به برخی داروهای ضد قارچی مقاوم بوده است. ظهور قارچ‌های مقاوم به چند دارو، به‌ویژه در جمعیت‌های با کمبود ایمنی، یک معضل بزرگ جهانی است. امروزه، استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات خالص آن‌ها در درمان بیماری‌هاي عفوني، افق تازه‌ای را برای ما گشوده است. اهداف این مطالعه، بررسی عملکرد هم‌افزایی ضد کاندیدایی اوژنول و فلوکونازول و القای نکروز و آپوپتوز در جدایه‌های کاندیدا کروزئی بیماران ایدزی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی است.

مواد و روش‌ها آزمایش‌های حساسیت ضد قارچی با استفاده از روش براث میکرودایلوشن و سینرژی بین اوژنول و فلوکونازول با استفاده از روش چکربورد انجام شدند. اثرات نکروزی و آپوپتوزی عوامل ضد قارچی مختلف بر علیه کاندیدا کروزئی با استفاده از روش فلوسایتومتری آنالیز شدند.

یافته‌ها در آزمایش‌های حساسیت ضد قارچی به روش براث میکرودیلوسیون، میانگین مقادیر MIC اوژنول و فلوکونازول برای جدایه‌های کاندیدا کروزئی، به ترتیب ۷۵۵/۰۶ و ۶۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. طبق نتایج حاصل از آزمایش چکربورد، اوژنول در ترکیب با فلوکونازول، اثرهای هم‌افزایی معناداری علیه اکثر جدایه‌های مخمری آزمایش شده، نشان داد (۰۵/ P<۰). در واقع، اوژنول، حدود ۸۱/۸۱ درصد میزان MIC فلوکونازول را در مهار رشد کاندیدا کروزئی کاهش داد. نتایج آزمایش فلوسایتومتری نشان داد، ترکیب اوژنول + فلوکونازول بر جدایه کاندیدا کروزئی در مقایسه با گروه کنترل، دارای اثرهای نکروزی معناداری دارند (P<۰/۰۵)، در حالی‌که اثرهای آپوپتوز اولیه و نهایی ناچیزی از این ترکیب مشاهده شد.

نتیجه‌گیری از اوژنول برای کاهش دوز فلوکونازول، مهار رشد کاندیدا کروزئی مقاوم به فلوکونازول و نکروز سلول‌های مخمری می‌توان استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها:
کاندیدا کروزئی، اوژنول، فلوکونازول، اثر ضد قارچی، سینرژی، نکروز، آپوپتوز

مقدمه

حفره دهان بیش از ۲۰۰ گونه میکروبی دارد. به همین دلیل، موارد بروز عفونت‌های باکتریایی و قارچی در دهان بالاست. گونه‌های استرپتوکوکوس، شایع‌ترین فلور باکتریایی در بزاق، زبان و لثه است [۱]. گونه‌های کاندیدا، بخشی از فلور قارچی همزیست حفره دهان می‌باشند که میزان حمل دهانی آن‌ها در گروه‌های سنی مختلف و شرایط زمینه‌ای مختلف، متفاوت است. از جمله این شرایط مستعدکننده، می‌توان به بیماری‌ها یا عفونت‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی مانند، ویروس نقص سیستم ایمنی انسان، دیابت ملیتوس، کورتیکواستروئید درمانی طولانی مدت، دریافت عضو پیوندی و شیمی‌درمانی علیه سرطان اشاره کرد. در این شرایط، ضعف سیستم ایمنی موجب می‌شود مخمرهای کاندیدایی موجود در بدن فرصت تکثیر یافته و ایجاد بیماری کنند. بیشترین میزان حمل دهانی کاندیدا در کودکان سالم، سالمندان و بیماران مبتلا به ایدز گزارش می‌شود [۲].

* نویسنده مسئول:
دکترمحمد حسن مینوئیان حقیقی
نشانی: گناباد، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی.
تلفن: ۵۳۳۴۷۲۱ (۹۱۵) ۹۸+
پست الکترونیکی: drminooeian@gmu.ac.ir

کاندیدیازیس دهانی، اغلب توسط کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا دابلینینسیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا کروزئی ایجاد می‌شود [۳]. در سال‌های اخیر، کلونیزاسیون دهانی با کاندیدا کروزئی به عنوان عوامل مخمری نوظهور به‌ویژه در بیماران ایدزی شایع شده است و حدود ۲۰ درصد از مخمرهای جدا شده از کشت بیماران ایدزی را تشکیل می‌دهد [۴]. با وجود درمان‌های وسیع ضد قارچی و ضد ویروسی موثر که منجر به بهبود سیستم ایمنی در بیماران ایدزی می‌شود، متاسفانه از مشکلات اصلی در درمان بیماران ایدزی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی، بروز مقاومت‌های دارویی است که به دلیل طولانی بودن دوره درمان، عود مکرر و عدم وجود داروهای متنوع ضد قارچی در بازار می‌باشد. مطالعات مختلف نشان دادند، کاندیدا کروزئی به عنوان یک گونه کاندیدایی شایع دهانی در این دسته از بیماران، نسبت به برخی داروهای ضد قارچی مانند آزول‌ها مقاومت نشان داده که این امر منتج به شکست درمانی در بیماران تحت درمان شده است [۵].

بنابراین، استفاده از ترکیبات طبیعی ضد میکروبی در درمان بیماري‌ها از گذشته‌های دور متداول بوده و دارای سابقه چندهزار ساله است. امروزه، استفاده از داروهای گیاهی و ترکیبات خالص آن‌ها در درمان برخی از بیماري‌هاي عفوني، افقي را برای ما گشوده است. هم‌اکنون تحقیقات گسترده‌ای در ایران و جهان بر روی ترکیبات طبیعی ضد قارچی در حال انجام است [۶]. یکی از این ترکیبات خالص، اوژنول (۴- آلیل ۲- متوکسی‌فنیل) بوده که یک مشتق آلیلی از گایاکول است. این ترکیب، یکی از اعضای خانواده فنیل‌پروپانوئید بوده که وزن مولکولی آن ۱۶۴/۲۰ گرم بر مول است. این ترکیب در آب، ایجاد محلولی چسبنده می‌کند، درحالی‌که در حلال‌های آلی به‌خوبی حل می‌شود. گیاهان میخک، دارچین و جوز هندی حاوی مقادیر قابل‌توجّهی از این ترکیب هستند [۷]. اوژنول در شرایط آزمایشگاهی علیه مخمّرها، قارچ‌های رشته‌ای رنگی و شفاف و قارچ‌های مولّد مایکوتوکسین موثر است و اثرات مهارکنندگی آن بر روی گونه‌های مختلف کاندیدا در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است [۸، ۹]. مطابق بررسی‌ها، اوژنول علیه مخمرهای کاندیدایی در دامنه بین ۳۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، اثر ضدقارچی دارد [۱۰]. محققین نشان دادند، ترکیب مواد خالص گیاهی با داروهای شیمیایی ضد قارچی، قادر خواهد بود با کاستن دوز داروهای شیمیایی، کاهش عوارض جانبی و ایجاد اثرات سینرژیستی یا افزایشی، به درمان بیماران مبتلا به کاندیدیازیس کمک قابل توجهی کند [۱۱].

تاکنون، مطالعه‌ای در زمینهٔ اثرات نکروزی و آپوپتوزی ترکیب اوژنول با فلوکونازول بر روی گونه‌های کاندیدا صورت نگرفته است. بنابراین، در این مطالعه سعی شده است تا اثرات سینرژیستی ضد قارچی، نکروزی و آپوپتوزی ماده طبیعی اوژنول در ترکیب با داروی شیمیایی فلوکونازول بر علیه سویه‌های کاندیدایی جدا شده از دهان بیماران ایدزی، مورد ارزیابی قرار گیرد تا نتایج آن بتواند به رفع نیازهای علمی کشور، تجاری‌سازی و ساخت فرآورده‌های دارویی با تکیه بر ترکیبات طبیعی موجود در ایران برای درمان کاندیدیازیس دهانی در انسان کمک شایانی نماید.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی و شناسایی آن‌ها

این مطالعه، یک تحقیق تجربی - آزمایشگاهی است. در این پژوهش، ۱۰ سویه بالینی کاندیدا کروزئی[1] (جدا شده از دهان بیماران[2]) و یک سویه استاندارد کاندیدا کروزئی[3] مورد استفاده قرار گرفت. همه جدایه‌های مخمری در محیط سابورو دکستروز آگار[4] کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ روز گرمخانه‌گذاری شدند. تمامی جدایه‌های کاندیدا کروزئی با استفاده از روش‌های استاندارد قارچ‌شناسی نظیر کشت در کروم آگار[5] و آزمایشات جذب و تخمیر قند با استفاده از کیت RAPIDTM™[6] تعیین هویت شدند.

ترکیبات ضد قارچی و تهیه رقت‌های مختلف آن‌ها

در این پژوهش، یک ترکیب طبیعی گیاهی به نام اوژنول[7] و یک داروی ضد قارچی شیمیایی به نام فلوکونازول[8] مورد استفاده قرار گرفتند. برای آزمایش، رقت‌های دو برابر اوژنول با دامنهٔ ۹/۷۶ تا ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و رقت‌های دو برابر فلوکونازول با دامنهٔ ۰/۰۳۱ تا ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند. به ترتیب، برای تهیهٔ رقت‌های اوژنول و فلوکونازول، از ایزوپروپانول ۷۰ درجه (Merck) و آب مقطر استریل استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون مخمری

برای تهیه سوسپانسیون استاندارد مخمری، ابتدا جدایه‌های کاندیدا کروزئی در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شدند. به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. سوسپانسیون تلقیحی از طریق برداشت ۵ کلنی (با قطری حدود ۱ میلی‌متر) از کشت تازه در داخل ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژي (سالین ۰/۸۵درصد) آماده شد. سوسپانسیون فوق به مدت ۱۵ثانیه ورتکس شده و میزان تراکم سلولی با روش مک فارلند (۰/۵) تعیین شد؛ به طوری که در نهایت، مقدار سلول‌های مخمری، $۰/۵\times۱۰^{۳}$ سلول در هر میلی‌لیتر تنظیم شد [۱۰].

1. C.k1-10
2. HIV+
3. ATCC6258
4. Merck
5. Paris France Company
6. Innovative Diagnostic Systems, USA
7. Sigma-Aldrich, USA
8. Sigma-Aldrich, USA

آزمایش حساسیت ضد قارچی

فعالیت ضدکاندیدایی ترکیبات تحت مطالعه، با روش رقت‌سازی سریالی در محیط مایع (براث میکرودایلوسیون) مطابق با روش پیشنهادی CLSI تحت عنوان M27-A2انجام شد [۱۲]. در این روش، با استفاده از محیطRPMI1640 (Merck) حاوی گلوتامین و گلوکز به همراه بافر MOPS با pH:7، حداقل غلظت مهاری تعیین شد. از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای پلی استیرنی ته‌گرد استریل برای انجام آزمایش استفاده شد، به طوری که در هر چاهك،۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ترکیبات تحت آزمایش و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری[9] اضافه شد. براي هر مخمر، چاهك کنترل منفی[10] و چاهک کنترل مثبت[11] در نظر گرفته شد. هر آزمایش دو مرتبه به صورت مجزا تکرار شد.

میزان حداقل غلظت مهارکنندگی[12] پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری میکروپلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتي‌گراد با الایزا ریدر تعیین شد. براي تعیین حداقل غلظت کشندگي[13] ، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظتي که به عنوان MIC تعیین گردیده و همچنین چند غلظت بالاتر از MIC که با دید ماکروسکوپي هم شفاف به نظر مي‌رسید، بر روي محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در انکوباتور ۳۵ درجه سانتي‌گراد بعد از ۲۴ ساعت، مورد بررسي قرار گرفت. حداقل غلظتي که مانع رشد گونه‌های کاندیدا شده بودند، به عنوان MFC در نظر گرفته شدند. ملاک حساسیت یا مقاومت برای فلوکونازول توسط CLSI پیشنهاد شده است [۱۲]: MIC≥ ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان حساس، ۳۲ -۱۶= MIC میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان حساس وابسته به دوز و MIC≤ ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان مقاوم شناخته می‌شوند.

آزمایش تعیین سینرژی چکربورد[14]

آزمایش سینرژی چکربورد برای تعیین شاخص غلظت بازدارنده جزئی[15] انجام شد [۱۳]. بنابراین، رقت‌های سریالی دوتایی از اوژنول و فلوکونازول تهیه شدند. میزان ۵۰ میکرولیتر از هر رقت اوژنول و فلوکونازول به هر گوده پلیت ۹۶ خانه اضافه شدند. همچنین، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری ۰/۵×۱۰[3] سلول در هر میلی‌لیتر به هر گوده اضافه شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. فرمول محاسبه میزان FICبدین ترتیب است:

FIC دارو =«MIC داروی ترکیبی» / «MIC دارو به تنهایی»

میزان سینرژیستی داروها[16] با جمع FIC اوژنول و FIC فلوکونازول به‌دست آمد. تفسیر آزمایش چکربورد به شرح ذیل می‌باشد: FICI≤۰/۵ (اثر سینرژیستی)، ۰/۵<FICI<۱ (اثر افزایشی)، ۱ ≤FICI<۴(بی‌تاثیر)، ۴<FICI (اثر آنتاگونیستی).

بررسی نکروز و آپوپتوز به روش فلوسایتومتری[17]

برای تعیین درصد سلول‌های نکروزه و آپوپتوزه در جمعیت مخمرهای تیمار شده با داروها و مقایسه آن با جمعیت کنترل، رنگ‌آمیزی مخمرها با دو رنگ Annexin-V و پروپیدیوم یدید (PI) با استفاده از کیت تجاری Annexin-V-FLOUS staining[18] Kitانجام گرفت. بدین منظور، سلول‌های جدایه‌های استاندارد کاندیدا کروزئی (۱۰[6]× ۲ سلول در هر میلی‌لیتر) در سابورو دکستروز براث حاوی اوژنول و فلوکونازول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌های مخمری به روش سانتریفیوژ برداشت شده و با بافر فسفات پتاسیم (۰/۱ مولار) شستشو شدند. آزمایش آنکسین PI/Vمطابق پروتکل کیت رنگ‌آمیزی با استفاده از ۵ میکروگرم آنکسین Vو ۵ میکروگرم PI در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس، میزان آپوپتوز سلول‌های کاندیدایی با استفاده از یک دستگاه فلوسایتومتر مدل C6[19] آنالیز شد. در این آنالیز، سلول‌هایی که طی مرگ برنامه‌ریزی شده، غشای خود را از دست داده‌اند، فسفاتیدیل سرین را از سطح داخلی به سطح خارجی غشاء منتقل کرده و آنکسین V به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی سلول متصل شده و توسط فلوسایتومتری تشخیص داده شد. PI متصله به DNA قطعه‌قطعهٔ شده هستهٔ سلول‌های مرده نیز با آزمایش فلوسایتومتری مشخص شد [۱۴].

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری نتایج پژوهش حاضر، از آزمون‌های آماری آزمون تی[20] برای مقایسهٔ میانگین گروه‌های مورد نظر و آنالیز واریانس[21] برای یافتن بیشترین و کمترین تأثیر مواد تحت مطالعه در تمام گروه‌ها استفاده شد. مقدار P<۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

9. ۰/۵×۱۰[3] سلول در هر میلی‌لیتر
10. گوده بدون مخمر
11. گوده بدون دارو
12. MIC=Minimum inhibitory concentration
13. MFC=Minimum fungicidal concentration
14. Checkerboard Method
15. FICI= Fractional inhibitory concentration index
16. FICI
17. flow cytometry
18. Rche Diagnostics, Mannheim, Germany
19. BD biocsiences, San Jose,CA,USA
20. t-test
21. One Way Anova

جدول ۱. مقادیر MIC و MFCاوژنول و فلوکونازول بر علیه سویه‌های کاندیدا کروزئی (C.k)

دارو (میکروگرم در میلی‌لیتر) / کاندیدا کروزئی	اوژنول		فلوکونازول		
	MIC	MFC	MIC	MFC	تفسیر نتایج
C.k1	۱۲۵۰	۲۵۰۰	۶۴	۱۲۸	مقاوم
C.k2	۶۲۵	۱۲۵۰	۱۲۸	۲۵۶	مقاوم
C.k3	۱۲۵۰	۲۵۰۰	۱۲۸	۲۵۶	مقاوم
C.k4	۶۲۵	۶۲۵	۶۴	۱۲۸	مقاوم
C.k5	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۱۲۸	۲۵۶	مقاوم
C.k6	۶۲۵	۱۲۵۰	۱۲۸	۲۵۶	مقاوم
C.k7	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۸	۱۶	حساس
C.k8	۶۲۵	۱۲۵۰	۶۴	۱۲۸	مقاوم
C.k9	۶۲۵	۱۲۵۰	۸	۱۶	حساس
C.k10	۶۲۵	۶۲۵	۱۲۸	۲۵۶	مقاوم
ATCC6258	۳۱۲/۵	۶۲۵	۶۴	۱۲۸	مقاوم
میانگین هندسی	۷۵۵/۰۶	۱۱۷۳/۶۶	۶۰/۱	۱۲۰/۲	–

افق دانش

یافته‌ها

آزمایش حساسیت ضد قارچی

مقادیر MICو MFC اوژنول و فلوکونازول علیه جدایه‌های بالینی کاندیدا کروزئی در جدول شماره ۱ ارایه شده است. دامنه مقدار مخمرهای MIC کاندیدا کروزئی برای اوژنول از ۳۱۲/۵ تا ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر[۲۲] و برای فلوکونازول از ۸ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر[۲۳] بودند. حدود ۸۱/۸ درصد سویه‌های کاندیدا کروزئی آزمایش شده به فلوکونازول مقاومت نشان دادند. تنها ۱۸/۲ درصد به فلوکونازول حساس بودند. میانگین هندسی مقادیر MFC اوژنول و فلوکونازول به ترتیب ۱۱۷۳/۶۶ و ۱۲۰/۲میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شدند.

آزمایش چکربورد

مقادیر شاخص FICI برای اوژنول و فلوکونازول علیه سویه‌های مختلف کاندیدا کروزئی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. دامنهٔ شاخص FICI برای ترکیب اوژنول + فلوکونازول بین ۰/۲۵ تا ۰/۷۵ برای مخمرها محاسبه شد. ترکیب اوژنول با فلوکونازول بر روی ۹۰/۹ درصد جدایه‌های بالینی کاندیدا کروزئی، دارای اثر سینرژیستی بوده است. آنالیز آماری آزمایش چکربورد، یک اثر معنادار سینرژیستی بین اوژنول و فلوکونازول بر علیه جدایه‌های کاندیدای تحت مطالعه نشان داد (P<۰/۰۵). نتیجه آزمایش ثابت کرد، اوژنول قادر است تا ۸۱/۸۱ درصد، میزان MIC فلوکونازول را در مهار رشد کاندیدا کروزئی کاهش دهد. در این مطالعه، هیچ اثر آنتاگونیستی بین اوژنول و فلوکونازول مشاهده نشده است.

نتایج آزمایش فلوسایتومتری

همان‌طور که در هیستوگرام‌ها مشاهده می‌شود (تصویر شماره ۱):

ناحیه Q_1: سلّول‌های نکروزی با ویژگی PI^+ Annexin-V^-

ناحیه Q_2: سلّول‌ها در مرحلهٔ آپوپتوز نهایی با ویژگی PI^+ An-nexin-V^+

ناحیه Q_3: سلّول‌ها در مرحلهٔ آپوپتوز اولیه با ویژگی PI^- An-nexin-V^+

ناحیه Q_4: سلّول‌های سالم با ویژگی PI^- Annexin-V^-.

نتایج آزمایش فلوسایتومتری نشان دادند، ترکیب اوژنول + فلوکونازول دارای اثر نکروزی معناداری بر روی جدایه‌های بالینی کاندیدا کروزئی در مقایسه با گروه کنترل بودند (P<۰/۰۵)، در حالی‌که اثرات آپوپتوز اولیه و نهایی بر این جدایه مخمری، کم بوده است (جدول شماره ۳).

22. میانگین هندسی: ۷۵۵/۰۶ میکروگرم در میلی‌لیتر
23. میانگین هندسی: ۶۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر

جدول ۲. نتایج آزمایش چکربورد ترکیب اوژنول با فلوکونازول بر علیه سویه‌های کاندیدا کروزئی (C.k)

کاندیدا کروزئی	MIC ترکیبی (میکروگرم در میلی‌لیتر)		FIC اوژنول	FIC فلوکونازول	FICI ترکیبی	تفسیر نتایج	درصد کاهش MIC فلوکونازول
	اوژنول	فلوکونازول					
C.k1	۱۵۶/۲	۸	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۲۵	سینرژیستی	۸۷/۵
C.k2	۱۵۶/۲	۸	۰/۲۵	۰/۰۶	۰/۳۱	سینرژیستی	۹۳/۷۵
C.k3	۳۱۲/۵	۱۶	۰/۲۵	۰/۱۳	۰/۳۸	سینرژیستی	۸۷/۵
C.k4	۷۸/۱	۱۶	۰/۱۲	۰/۲۵	۰/۳۷	سینرژیستی	۷۵
C.k5	۳۱۲/۵	۸	۰/۲۵	۰/۰۶	۰/۳۱	سینرژیستی	۹۳/۷۵
C.k6	۷۸/۱	۱۶	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۲۵	سینرژیستی	۸۷/۵
C.k7	۶۲۵	۲	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۷۵	اثر افزایشی	۷۵
C.k8	۷۸/۱	۱۶	۰/۱۲	۰/۲۵	۰/۳۷	سینرژیستی	۷۵
C.k9	۱۵۶/۲	۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیستی	۷۵
C.k10	۱۵۶/۲	۳۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیستی	۷۵
ATCC6258	۷۸/۱	۱۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیستی	۷۵

افق دانش

بحث

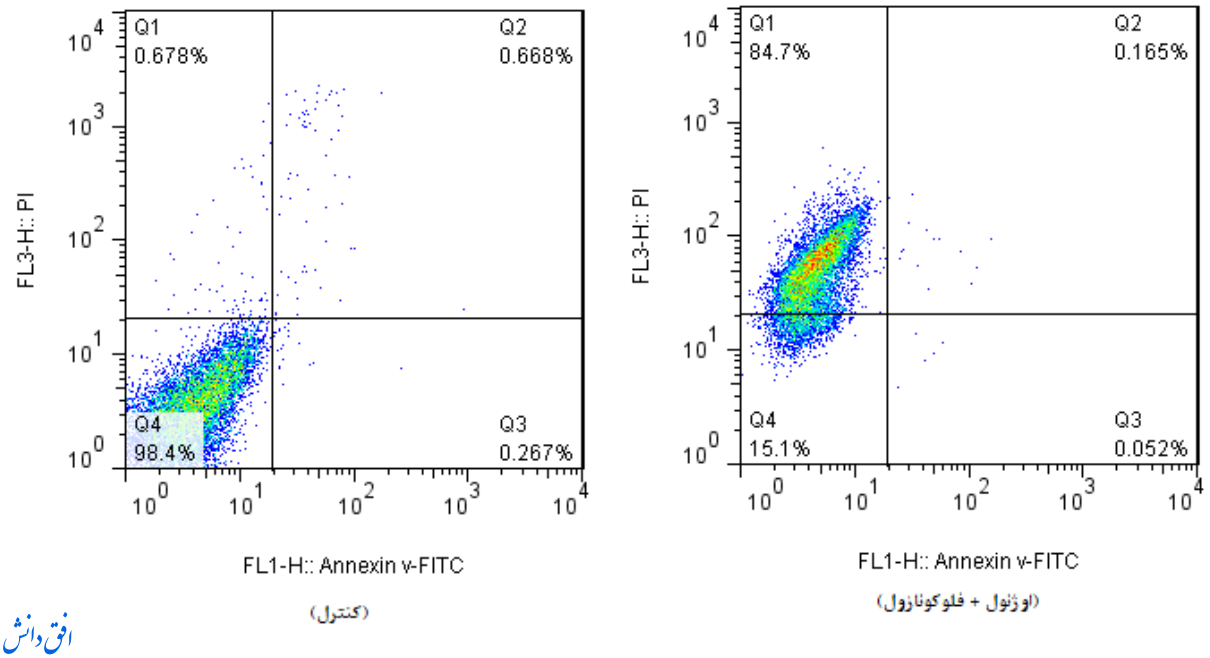
یکی از بزرگترین موانع برای غلبه بر عفونت‌های کاندیدایی دهان، استفاده از درمان با یک داروی ضد قارچی بوده که منجر به ظهور مقاومت در مخمرهای بیماری‌زا می‌شود [۱۵]. بنابراین، یافتن ترکیبات طبیعی ایمن و موثر همراه با عوارض جانبی اندک، بسیار حائز اهمیت است. این مطالعه با اهداف سنجش اثر سینرژیستی ضدکاندیدایی، یکی از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی موجود در اسانس روغنی برخی از گیاهان دارویی به نام اوژنول در ترکیب با فلوکونازول و تعیین اثر نکروزی وآپوپتوزی آن‌ها علیه جدایه‌های بالینی کاندیدا کروزئی انجام شد.

در این پژوهش، میانگین MIC فلوکونازول بر علیه جدایه‌های کاندیدا کروزئی حدود ۶۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. از بین تمامی مخمرهای آزمایش شده، حدود ۸۱/۸ درصد آن‌ها به فلوکونازول مقاومت معنادار نشان دادند. نتایج تحقیقات سایر پژوهشگران ثابت کرد، سویه‌های کاندیدا کروزئی در مقادیر MIC بین ۵۰ و ۱۷۹ میکروگرم در میلی‌لیتر فلوکونازول، مقاومت بالایی را نشان دادند که با این یافته‌ها تطابق دارند [۱۳، ۱۶]. امروزه، اکثر داروهای ضد قارچی استفاده شده به صورت موضعی و نظام‌مند از دسته آزول‌ها هستند. از بین آزول‌ها، فلوکونازول بیشتر در درمان عفونت‌های کاندیدایی استفاده می‌شود. این داروی ضد قارچی شیمیایی با مهار تولید ارگوسترول در غشای پلاسمایی گونه‌های کاندیدا موجب مهار رشد سلول قارچی می‌شود، اما بیشتر سویه‌های کاندیدا کروزئی به طور ذاتی مقاوم به فلوکونازول هستند. بنابراین، استفاده از ترکیبات با فعالیت بالای مهارکنندگی برای درمان عفونت‌های ناشی از این گونه کاندیدایی ضروری است.

جدول ۳. نتایج آزمایش نکروز و آپوپتوز تعیین شده با روش فلوسایتومتری در مورد تاثیر ترکیب اوژنول با فلوکونازول بر کاندیدا کروزئی

کاندیدا کروزئی ATCC 6258	کنترل	اوژنول+ فلوکونازول
سلول‌های نکروزی ($Q1: PI^{+}/FITC^{-}$)	۰/۶۷۸	۸۴/۷
سلول‌های آپوپتوز نهایی ($Q2: PI^{+}/FITC^{+}$)	۰/۶۶۸	۰/۱۶۵
سلول‌های آپوپتوز اولیه ($Q3: PI^{-}/FITC^{+}$)	۰/۲۶۷	۰/۰۵۲
سلول‌های سالم ($Q4: PI^{-}/FITC^{-}$)	۹۸/۴	۱/۱۵

افق دانش



تصویر ۱. هیستوگرام آزمایش فلوسایتومتری برای سویهٔ استاندارد کاندیدا کروزئی (ATCC ۶۲۵۸) تیمار شده با ترکیب اوژنول و فلوکونازول: اوژنول (۷۸/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) + فلوکونازول (۶۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کنترل

نتایج حاصله از مطالعه موردنظر نشان داد، ترکیب طبیعی اوژنول با دامنه MIC از ۳۱۲/۵ تا ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر ضد قارچی علیه جدایه‌های مقاوم کاندیدا کروزئی است. در واقع، با افزایش غلظت اوژنول در محیط آزمایش، رشد جدایه‌های کاندیدایی بتدریج کاهش یافته بود. سایر محققین هم فعالیت ضد قارچی اوژنول بر علیه گونه‌های کاندیدا را به خوبی نشان داده‌اند. از جمله، احمد و همکاران [۱۷] نشان دادند، اوژنول در غلظت‌های ۴۷۵-۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر یک ترکیب طبیعی ضد قارچی موثر بر علیه کاندیدا کروزئی است. در مطالعه انجام شده توسط مارکوس آریاس و همکاران [۹]، اوژنول در غلظت‌های ۴۵۰-۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب مهار رشد گونه‌های مختلف کاندیدا، به‌ویژه کاندیدا کروزئی شده بود. گالوچی و همکاران [۱۵] گزارش کردند، اوژنول با مقادیر MIC و MFC به ترتیب ۸۸۰ و ۱۰۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب مهار رشد و مرگ سویه‌های کاندیدا کروزئی می‌شود. چندین مطالعه مانند مطالعات بنیس و همکاران [۱۸] و براگا و همکاران [۱۹]، مکانیسم عمل اوژنول بر علیه قارچها را مورد بررسی قرار دادند. این محققین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نشان دادند، اوژنول سبب تغییرات مورفولوژیکی فوق ساختاری در غشای گونه‌های کاندیدا می‌شود. در این مورد، متعاقب تیمار سلول‌های مخمری با اوژنول به میزان ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، افزایش معناداری در تعداد مخمرهای کاندیدایی آسیب‌دیده با سطوح خشن و چروکیده مشاهده شد. محققین پیشنهاد دادند، اوژنول به دلیل خاصیت لیپوفیلیکی می‌تواند به داخل زنجیره‌های آسیل چرب غشای دو لایه‌ای پلاسمالمای مخمر نفوذ کرده و موجب تغییر در نفوذپذیری غشای سلول شود [۲۰]. سایر محققین نیز ثابت کردند، اوژنول در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب مهار فعالیت H^+-ATPase گونه‌های کاندیدا، مسیر انتقال یون و خروج H^+ تحریک شده توسط گلوکز می‌شود [۲۱].

تلفیق مولکول‌های با مکانیسم عمل متفاوت، یکی از استراتژی‌های خوب برای درمان ترکیبی بیماری‌های عفونی است، زیرا کاهش عوارض جانبی، سمی بودن و دوز کلی داروها را در پی خواهد داشت. در مطالعه انجام شده، مقادیر FICI ترکیب اوژنول و فلوکونازول، برای جدایه‌های کاندیدا کروزئی بین ۰/۲۵ تا ۰/۷۵ به‌دست آمده است. بنابراین، یک کاهش معناداری (۸۱/۸۱ درصد) در میزان MIC، بعد از ترکیب اوژنول با فلوکونازول مشاهده شد. اثرات سینرژیستی در ۹۰/۹ درصد از جدایه‌های کاندیدا کروزئی دیده شدند. ترکیبات موجود در اسانس‌های روغنی قادر هستند در فعالیت‌های سینرژیستی، افزایشی و آنتاگونیستی تاثیرگذار باشند. اثرات سینرژیستی اوژنول و داروهای ضد قارچی در مطالعات گذشته ارزیابی شده‌اند. در تطابق با این یافته‌ها، احمد و همکاران [۱۳] نشان دادند، اوژنول و متیل اوژنول در ترکیب با فلوکونازول با مقادیر FICI به ترتیب ۰/۳۱-۰/۵۵ و ۰/۲۴-۰/۵۸ دارای اثرات سینرژیستی بر روی گونه‌های کاندیدا بودند. محققین دیگر نیز اثرات سینرژیستی ترکیب اوژنول با فلوکونازول [۲۲]، اوژنول با آمفوتریسین بی [۲۳] و اوژنول با نیستاتین [۱۱] را گزارش کردند. نقش ترکیبات اصلی اسانس‌های روغنی همچون اوژنول در چنین تداخلاتی به طور کامل مطالعه نشده است. می‌توان حدس زد، اوژنول با غشای پلاسمایی سلول قارچی تداخل نموده و نفوذ سایر داروهای ضد قارچی مانند آزول‌ها را به داخل سلول تسهیل می‌کند.

در این بررسی، آزمایش فلوسایتومتری نشان داد، ترکیب اوژنول + فلوکونازول دارای اثر نکروزی زیاد و به میزان کمتر اثرات آپوپتوز اولیه و نهایی بر جدایه‌های بالینی کاندیدا کروزئی می‌باشد. طبق بررسی‌های وسیع انجام شده در این پژوهش، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه اثرات سینرژیستی نکروزی و آپوپتوزی اوژنول با داروهای ضد قارچی انجام نشده است. این نتایج، اولین یافته آزمایشگاهی گزارش شده در زمینه درمان ترکیبی می‌باشد. البته، گزارشات کمی در مورد اثرات نکروزی و آپوپتوزی اوژنول و مشتقات‌اش به تنهایی بر روی گونه‌های کاندیدا وجود دارند. لون و همکاران [۲۴] نشان دادند، مشتقات اوژنول می‌توانند از مسیر متاکاسپاز موجب القای نکروز و آپوپتوز سلول‌های کاندیدا شوند. این محققین ثابت کردند، اوژنول به واسطهٔ آسیب DNA، دپولاریزاسیون میتوکندری و کاهش در فعالیت سیتوکروم Cاکسیداز موجب نکروز مخمرها می‌شود. در مطالعه راجا و همکاران [۲۵]، اوژنول سبب نکروز و آپوپتوز سلول‌های کاندیدا از طریق کاهش در بیوسنتز ارگوسترول شده است. به‌طور کلی، فرایندهای آپوپتوز و نکروز می‌توانند توسط محرک‌های داخلی و خارجی متفاوتی القا شوند و القای آن‌ها به‌ویژه در سلول‌های مخمری می‌تواند به عنوان یک مدل مناسب برای پایش عوامل ضد قارچی جدید و درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های قارچی در نظر گرفته شود [۲۶].

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد، اوژنول یک مونوترپن طبیعی با فعالیت ضد قارچی موثر بر علیه جدایه‌های دهانی کاندیدا کروزئی مقاوم و حساس به فلوکونازول می‌باشد. ترکیب اوژنول با فلوکونازول یک اثر سینرژیستی قوی را نشان دادند که با کاهش معنادار حداقل دوز فلوکونازول همراه بوده است. اوژنول در ترکیب با فلوکونازول دارای اثرات سینرژیستی معناداری در ایجاد نکروز مخمرهای تحت مطالعه بوده است. بنابراین، ترکیب یک ماده طبیعی مانند اوژنول با یک داروی شیمیایی مانند فلوکونازول می‌تواند هم اثر داروی شیمیایی را افزایش داده و هم دوز داروی شیمیایی را کاهش دهد که خود منجر به کاستن عوارض جانبی داروی شیمیایی می‌شود. طبق نتایج این مطالعه، درمان ترکیبی می‌تواند یک رهیافت درمانی مناسب در موارد شکست درمانی و مقاومت به داروهای ضد قارچی در بیماران ایدزی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه، طبق نامه تاییدیه به شماره ۹۸/۲۰/۹۰۵۵ به تاریخ ۱۳۹۹/۰۲/۰۱ ، مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاهی قرار گرفته است.

حامی مالی

این بررسی در قالب طرح پژوهشی مصوب دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شده است. در سال ۱۳۹۹، نمونه‌برداری از دهان بیماران HIV+ مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشات در مرکز قارچ‌شناسی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین دانشگاه آمل انجام شد.

مشارکت نویسندگان

هر سه نویسنده در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

Refrences

[1] Shokri H. Immunology of fungal infections. Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad (FUM Press); 2002. https://press.um.ac.ir/index.php?option=com_k2&view=item&id=939&lang=fa

[2] Patil S, Majumdar B, Sarode SC, Sarode GS, Awan KH. Oropharyngeal candidosis in HIV-infectedpatients-An update. Frontiers in Microbiology. 2018; 9(10):980. [DOI:10.3389/fmicb.2018.00980]

[3] Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. Clinics in Dermatology. 2016; 34(4):487-94. [DOI:10.1016/j.clindermatol.2016.02.022] [PMID]

[4] Hosain Pour A, Salari S, Ghasemi Nejad Almani P. [Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and non-HIV subjects in the Southeast of Iran (Persian)]. Current Medical Mycology. 2018; 4(4):1-6. [DOI:10.18502/cmm.4.4.379] [PMID] [PMCID]

[5] Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens. Genes. 2018; 9(9):461. [DOI:10.3390/genes9090461] [PMID] [PMCID]

[6] Salehi Surmaghi H. Medicinal plants and phytotherapy. Tehran: Donyaee Taghazie; 2006.

[7] Shokri H. Natural compounds as novel antifungal agents. Amol: Amol University of Special Modern Technologies Press, 2018.

[8] Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. [Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi (Persian)]. Journal de Mycologie Médicale. 2014; 24(2):e51-6. [DOI:10.1016/j.mycmed.2014.01.063] [PMID]

[9] Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral candida isolates from denture wearers. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2011; 11:119. [DOI:10.1186/1472-6882-11-119] [PMID] [PMCID]

[10] Sharifzadeh A, Shokri H. [In vitro synergy of eugenol on the antifungal effects of voriconazole against candida tropicalis and candida krusei strains isolated from the genital tract of mares (Persian)]. Equine Veterinary Journal. 2021; 53(1):94-101. [DOIi:10.1111/evj.13268] [PMID]

[11] Da Silva ICG, Santos HBP, Cavalcanti YW, Nonaka CFW, de Sousa SA, de Castro RD. Antifungal activity of eugenol and its association with nystatin on candida albicans. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clinica Integrada. 2017; 17(1):e3235. [DOI:10.4034/PBOCI.2017.171.16]

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline second Edition. CLSI document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 2008.

[13] Ahmad A, Khan A, Khan LA, Manzoor N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical candida isolates. Journal of Medical Microbiology. 2010; 59(Pt 10):1178-84. [DOI:10.1099/jmm.0.020693-0] [PMID]

[14] Kolahi M, Tabandeh M, Saremy S, Hosseini S, Hashemitabar M. [The study of apoptotic effect of p-coumaric acid on breast cancer cells MCF-7 (Persian)]. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 2016; 24 (3):211-21. https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=514049

[15] Gallucci MN, Carezzano ME, Oliva MM, Demo MS, Pizzolitto RP, Zunino MP, et al. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant candida species: A quantitative structure-activity relationship analysis. Journal of Applied Microbiology. 2014; 116(4):795-804. [DOI:10.1111/jam.12432] [PMID]

[16] Sharifzadeh A, Khosravi AR, Shokri H, Shirzadi H.[Potential effect of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol) alone and in combination with fluconazole against clinical isolates of candida albicans, C. glabrata and C. krusei (Persian)]. Journal de Mycologie Medicale. 2018; 28(2):294-9. [DOI:10.1016/j.mycmed.2018.04.002] [PMID]

[17] Ahmad A, Wani MY, Khan A, Manzoor N, Molepo J. Synergistic Interactions of eugenol-tosylate and Its congeners with fluconazole against candida albicans. Plos One. 2015; 10(12):e0145053. [DOI:10.1371/journal.pone.0145053] [PMID] [PMCID]

[18] Bennis S, Chami F, Chami N, Bouchikhi T, Remmal A. Surface alteration of saccharomyces cerevisiae induced by thymol and eugenol. Letters in Applied Microbiology. 2004; 38(6):454-8. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2004.01511.x] [PMID]

[19] Braga PC, Sasso MD, Culici M, Alfieri M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of candida albicans. Fitoterapia. 2007; 78(6):396-400. [DOI:10.1016/j.fitote.2007.02.022] [PMID]

[20] Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Critical Reviews in Microbiology. 2017; 43(6):668-89. [DOI:10.1080/1040841X.2017.1295225] [PMID]

[21] Ahmad A, Khan A, Yousuf S, Khan LA, Manzoor N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. Fitoterapia. 2010; 81(8):1157-62. [DOI:10.1016/j.fitote.2010.07.020] [PMID]

[22] Pemmaraju SC, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. Candida albicans biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole. Indian Journal of Experimental Biology. 2013; 51(11):1032-7. [PMID]

[23] Alves JCO, Ferreira GF, Santos JR, Silva LCN, Rodrigues JFS, Neto WRN, et al. Eugenol induces phenotypic alterations and Increases the oxidative burst in cryptococcus. Frontiers in Microbiology. 2017; 8:2419. [DOI:10.3389/fmicb.2017.02419] [PMID] [PMCID]

[24] Raja MRC, Srinivasan V, Selvaraj S, Mahapatra SK.Versatile and synergistic potential of eugenol: A review. Pharmaceutica Analytica Acta. 2015; 6(5):367. [DOI:10.4172/2153-2435.1000367]

[25] Lone SA, Wani MY, Fru P, Ahmad A. Cellular apoptosis and necrosis as therapeutic targets for novel eugenol tosylate congeners against candida albicans. Scientific Reports. 2020; 10(1):1191. [DOI:10.1038/s41598-020-58256-4] [PMID] [PMCID]

[26] Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in candida albicans. AMB Express. 2013; 3(1):54. [DOI:10.1186/2191-0855-3-54] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank