



ارزیابی اثر ضدقارچی کورکومین محبوس شده در نانوذرات میسلی بر بیان ژن *CDRI* در جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول

حدیثه گل پور^۱، نجمه رنجی^{۲*}، سیده هاجر شارمی^۳

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ^۳ استاد، گروه زنان و زایمان، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، بیمارستان الزهرا، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت.

چکیده

سابقه و هدف: کورکومین به عنوان یک ترکیب فنولی طبیعی مشتق از گیاه زردچوبه، خاصیت ضد قارچی دارد. *کاندیدا آلبیکنس* شایع ترین پاتوژن فرصت طلب قارچی است که مصرف پیوسته ضد قارچ ها در درمان آن منجر به ظهور و افزایش مقاومت چند دارویی شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر کورکومین محبوس شده در نانوذرات میسلی و فلوکونازول بر روی بیان ژن *CDRI* در جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به دارو انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، ۶ جدایه *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول، در تیمار با فلوکونازول به تنهایی (1/2 MIC) (نمونه کنترل) و در ترکیب با کورکومین محبوس شده در نانوذرات (نمونه آزمون) قرار گرفت. دو گروه سلولی برای تخمین درصد مرگ سلولی پس از ۲۴ ساعت، در محیط کشت سابرو دکستروز آگار کشت داده شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن *CDRI* به طور کمی به روش Real-time PCR در سلول های تیمار شده و تیمار نشده با کورکومین بررسی گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که ترکیب کورکومین محبوس شده در نانوذرات با فلوکونازول (1/2 MIC) پس از ۲۴ ساعت، رشد *کاندیدا آلبیکنس* را تا ۵۰٪ کاهش می دهد. همچنین آنالیز Real-time PCR نشان داد که کورکومین محبوس شده در نانوذرات، بیان ژن *CDRI* را کاهش داد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، کورکومین می تواند رشد قارچ را از طریق مکانیسم های مختلفی مانند کاهش تعداد پمپ افلاکس ABC در سطح سلول، مهار کند و اثر هم افزایی بر ویژگی ضد قارچی فلوکونازول در جدایه های مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* داشته باشد.

واژگان کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*، ژن *CDRI*، کورکومین، پمپ افلاکس، نانوذرات میسلی.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۶

مقدمه

طولانی مدت با آنتی بیوتیک) است، به یک پاتوژن فرصت طلب تبدیل می گردد (۱). از آنجایی که *کاندیدا آلبیکنس* یک پاتوژن قارچی یوکاریوت است، بسیاری از مسیرهای بیولوژیکی آن با انسان مشترک است. بیشتر داروهای ضد قارچی مورد استفاده دارای اثرات جانبی در دوز های مورد استفاده می باشند. بنابراین شناسایی داروهای ضد قارچی که اثرات جانبی کمتری بر بدن انسان داشته و سبب از بین رفتن کامل پاتوژن قارچی

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) به عنوان یک فلور طبیعی در بخش های مختلف بدن انسان از جمله دستگاه گوارش، دستگاه ادراری تناسلی و به میزان کمتری پوست زندگی می کند و در شرایطی که فرد دچار ضعف سیستم ایمنی (در نتیجه کهن سالی یا شیمی درمانی و یا در اثر درمان

(* آدرس برای مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی.

(1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5 dione اشاره نمود که یک ترکیب پلی فنل و هیدروفوب مشتق از گیاه زردچوبه (*Curcuma longa*) می‌باشد (۸). کورکومین دارای اثرات درمانی متنوعی شامل اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد آلزایمری و ضد آرتریت روماتوئید است (۹-۱۲). با توجه به وجود این ترکیب گیاهی در عادات غذایی روزانه و استفاده از آن در مقادیر زیاد از زمان‌های قدیم، بی‌خطر بودن این ترکیب به اثبات رسیده است (۱۳ و ۱۴). بنابراین مصرف کورکومین غیر از جنبه خوراکی آن که از ترکیبات مهم زردچوبه است، از دیدگاه دارویی و اثرات درمانی نیز قابل ملاحظه می‌باشد. از آنجایی که کورکومین حلالیت کمی در آب دارد، برای افزایش کارایی و رسانش آن در بدن باید از ناقلین حلال در چربی استفاده شود. در مطالعات انجام‌گرفته در سال‌های گذشته اثرات ضد سرطانی کورکومین محبوس شده در ناقل نانومیسل‌ی علیه سرطان مثانه، معده، پستان و کبد در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدن تأیید شده است. همچنین ثابت شده که این نانو ذرات اثر سمی بر سلول‌های طبیعی ندارند (۱۵). با این حال تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثر کورکومین محبوس شده در نانومیسل بر روی عوامل بیماری‌زا صورت نگرفته است. در این مطالعه از نانو ذرات میسلی ۰۴۰۰ برای انتقال کورکومین به داخل سلول‌های مخمر *کاندیدا آلبیکنس* استفاده شد. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهار کورکومین محبوس شده در نانومیسل بر رشد جدایه های مقاوم به فلوکونازول مخمر *کاندیدا آلبیکنس* و همچنین بررسی تأثیر این ترکیب گیاهی بر مهار بیان یکی از ژن‌های پمپ افلاکس خانواده ABC (ژن *CDR1*) با استفاده از روش Q-PCR بود.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و کشت مخمر *کاندیدا آلبیکنس*: در این مطالعه مقطعی-توصیفی در بازه زمانی یک ساله ۹۵-۹۴، نمونه‌های بالینی از ترشحات واژن ۵۰ زن مشکوک به عفونت کاندیدیایی واژینال مراجعه‌کننده به بیمارستان الزهرا و مطب دکتر شارمی شهر رشت تهیه شد. نمونه‌ها در محیط کشت انتقال کری بلیر

گردد، بسیار حائز اهمیت است (۲). آزول‌ها از جمله رایج‌ترین داروهای ضد قارچی مورد استفاده در درمان هستند که فعالیت آن‌ها اغلب از طریق مهار آنزیم لانوسترول دی متیلاز و ممانعت از تبدیل لانوسترول به ارگوسترول (استرول اصلی غشای *کاندیدا آلبیکنس*) می‌باشد. یکی از داروهای تری آزولی رایج، فلوکونازول است که در درمان عفونت‌های قارچی سطحی و سیستمیک ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* استفاده می‌شود. در سال‌های گذشته مصرف خودسرانه و بیش از حد داروهای آزولی سبب ایجاد مقاومت دارویی در این پاتوژن‌ها شده است. مقاومت به آزول‌ها در گونه های *کاندیدا*، به واسطه چند مکانیسم مهم رخ می‌دهد: افزایش بیان و یا جهش در ژن *ERG11*، تغییر در مسیر بیوسنتز ارگوسترول و یا بیان بیش از حد ژن‌های درگیر در سیستم‌های افلاکس پمپ مانند *CDR1*، *CDR2* و *MDR1* (۳) ناقلین قابل اتصال به ATP (ABC= ATP-Binding Cassette) و ناقلین ابر خانواده بزرگ تسهیل‌کننده (MFS= Major Facilitators Superfamily) دو گروه از سیستم‌های پمپ افلاکس در غشای *کاندیدا آلبیکنس* هستند که سبب جریان دارو به خارج از سلول قارچی می‌گردند (۴ و ۵). در میان ناقلین ABC، بیشترین مشکلات بیمارستانی مربوط به *Cdr1p* و *Cdr2p* است و افزایش *Cdr1p* شاخص اصلی مقاومت به آزول‌ها محسوب می‌شود (۶). علاوه بر ناقلین ABC (*Cdr2p* و *Cdr1p*)، از ناقلین MFS، *Mdr1p* نیز در *کاندیدا آلبیکنس* از مهم‌ترین واسطه های مقاومت به آزول‌ها می‌باشد (۷).

در بسیاری از جدایه های مقاوم به آزول *کاندیدا آلبیکنس*، بیان بیش از حد ژن‌های *CDR1*، *CDR2* و *MDR1* مشاهده شده است (۴ و ۵). مواجهه با عواملی مانند استرادیول و فلوفنازین باعث القای بیان *Cdr1p* و *Cdr2p* می‌شود. در حالی که بنومیل و H_2O_2 موجب القای *MDR1* می‌گردند (۷). بنابراین محققان به دنبال داروهای جایگزینی هستند که بتوانند در سویه‌های مقاوم، توان کشندگی داشته باشند. امروزه داروهای جایگزینی با منشأ گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. از این داروها می‌توان به کورکومین با نام علمی دی فرولووئیل متان با فرمول شیمیایی

میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (با غلظت معادل نیم مک فارلند $10^8 \times 1/5$)، فلوکونازول با غلظت MIC 1/2 هر نمونه و کورکومین محبوس شده در نانومیسلی با غلظت‌های (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه و در انکوباتور 37°C به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت به منظور تعیین MFC، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه تیمار شده به محیط ساپرو دکستروز آگار منتقل و کشت پر داده شد. هر تیمار دارویی حداقل دو بار تکرار گردید.

ه) استخراج RNA پس از تعیین بهترین غلظت کشته کورکومین (در ترکیب با فلوکونازول) که توان کشته‌کنندگی ۵۰ درصد سلول‌ها را داشت، استخراج RNA سلولی با استفاده از کیت YZol Pure RNA (یکتا تجهیز آزما، تهران) از جدایه های تیمار شده با فلوکونازول و کورکومین (نمونه آزمون) و همچنین از جدایه های تیمار شده با فلوکونازول به تنهایی (نمونه کنترل) صورت گرفت. برای جداسازی RNA از پروتئین‌های سلولی از کلروفرم استفاده شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده با دستگاه نانو دراپ 2000c (آمریکا) بررسی گردید.

و) سنتز *cdNA* و واکنش *Q-PCR*. با استفاده از کیت *cdNA* Synthesis Kit YT4500 (یکتا تجهیز آزما، تهران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، سنتز *cdNA* از RNA تام سلولی صورت گرفت. سپس برای بررسی بیان ژن *CDRI* و مقایسه میزان بیان با ژن *ACT1* (ژن مرجع) از کیت SYBR® Premix Ex Taq™ II (ژن مرجع) و دستگاه Rotor Gene Q (Germany) استفاده شد. اجزای واکنش Q-PCR شامل: ۱ میکرولیتر *cdNA*، ۰/۸ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۱۰ میکرولیتر SYBR Premix Ex Taq II، ۰/۴ میکرولیتر رنگ ROX و ۷ میکرولیتر آب استریل بود. برنامه دمایی واکنش Q-PCR به ترتیب شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی (95°C به مدت ۳۰ ثانیه) و 40°C سیکل شامل 95°C به مدت ۵ ثانیه و 60°C به مدت ۳۰ ثانیه بود. از ژن *ACT1* به عنوان ژن مرجع استفاده شد. پرایمر های مورد استفاده توسط شرکت Bioneer کره جنوبی سنتز گردیدند (جدول ۱).

(Quelab، کانادا) سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند و بر روی محیط ساپرو دکستروز آگار (Quelab، کانادا) حاوی کلرامفنیکل کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری شکل کلنی در زیر میکروسکوپ بررسی گردید. سپس آزمون تشکیل لوله زایا و کروموگرافی از طریق کشت میکروب در محیط کروم آگار کاندیدا صورت گرفت (۱۶).

ب) بررسی مقاومت به فلوکونازول: جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* از نظر مقاومت و حساسیت به فلوکونازول، با روش دیسک دیفیوژن بررسی شدند. برای این منظور از دیسک فلوکونازول (10µg) شرکت HiMedia (هند) استفاده شد. مقاومت دارویی جدایه های مورد مطالعه بر اساس روش استاندارد M44-A توصیه شده توسط موسسه ملی استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (Clinical and Laboratory Standard Institute=CLSI) تعیین گردید (۱۷). نمونه‌های مقاوم جداسازی شدند و از نظر حداقل غلظت مهارکنندگی دارو (Minimum Inhibitory Concentration=MIC) مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور رقت های $2-2048 \mu\text{g/ml}$ از فلوکونازول به همراه مقدار یکسان از سوسپانسیون مخمری با کدورت نیم مک فارلند در لوله آزمایش تهیه شد و پس از ۲۴ ساعت میزان MIC تعیین گردید.

سپس جهت تعیین حداقل غلظت قارچ کشی دارو Minimum Fungicidal Concentration=MFC) مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر چاهک برداشته شد و بر روی محیط ساپرو دکستروز آگار کشت پر داده شد. پس از ۲۴ ساعت بر اساس چگونگی تشکیل کلنی‌های مخمری، MFC تعیین گردید (۱۷).

ج) تهیه کورکومین محبوس شده در نانومیسلی: کورکومین مورد استفاده در این مطالعه توسط گروه تحقیقاتی دکتر فرهود نجفی و دکتر مجید صادقی زاده در دانشگاه تربیت مدرس تهران از گیاه زردچوبه استخراج و در نانو ذرات میسلی (ترکیب اولئیک اسید و پلی اتیلن گلاکول در ابعاد نانو) محبوس شد و از نظر آزمایش‌های استاندارد بررسی گردید (۱۵).

د) تیمار جدایه های مقاوم به فلوکونازول با کورکومین محبوس شده در نانومیسلی: برای بررسی اثر ضد قارچی کورکومین، ۶۰

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

منبع	طول قطعه (جفت باز)	توالی پرایمر	پرایمر	نام ژن
(۱۹)	۸۵	5'-CTTAGTCAAACCACTGGATCG-3'	F	<i>CDRI</i>
		5'-CCAAAAGTGATGAAAAGGC-3'	R	<i>CDRI</i>
(۲۰)	۷۲	5'-GCTTTTGGTGTGACGAGTTTCT-3'	F	<i>ACT1</i>
		5'-GTGAGCCGGGAAATCTGTATAGTC-3'	R	<i>ACT1</i>

به غلظت ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که ۱۰٪ از کل نمونه‌های مقاوم را شامل می‌شد. کمترین MIC مربوط به غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که ۵٪ از ۲۰ نمونه را شامل می‌شد. همچنین مقدار MIC ۵۵٪ (۱۱ نمونه) ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

ب) تیمار جدایه‌ها با کورکومین محبوس شده در نانومیسل و فلوکونازول: بهترین غلظت کشندگی حداکثر ۵۰ درصدی سلول‌ها توسط کورکومین محبوس شده در نانومیسل در ترکیب با غلظت ۱/۲ MIC فلوکونازول، ۴۰۰ µg/ml پس از ۲۴ ساعت در ۶ جدایه به صورت مشاهده مستقیم تعیین شد. بهترین غلظت در این گروه از آزمایش‌ها، غلظتی است که توان کشندگی حدود ۵۰ درصد سلول‌ها را داشته باشد تا با مابقی سلول‌ها که هنوز زنده مانده‌اند بتوان مطالعات مولکولی را به پیش برد. برای تأیید کشندگی حداکثر ۵۰ درصدی از تست

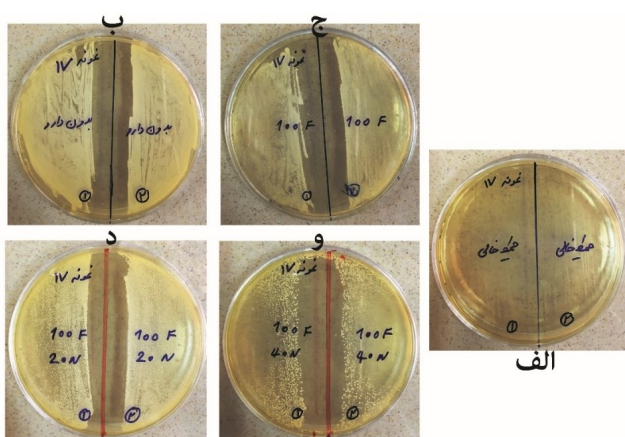
آنالیز بیان ژن‌ها به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت (۱۸).
 ز) آزمون آماری: نتایج بیان ژن به صورت میانگین \pm SD نشان داده شد. از آزمون *t*-test برای مقایسه اختلاف بین دو گروه استفاده گردید. تمامی محاسبات آماری به کمک نسخه شانزدهم نرم افزار SPSS صورت گرفت. مقدار $P < 0.05$ نشانه معنی دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

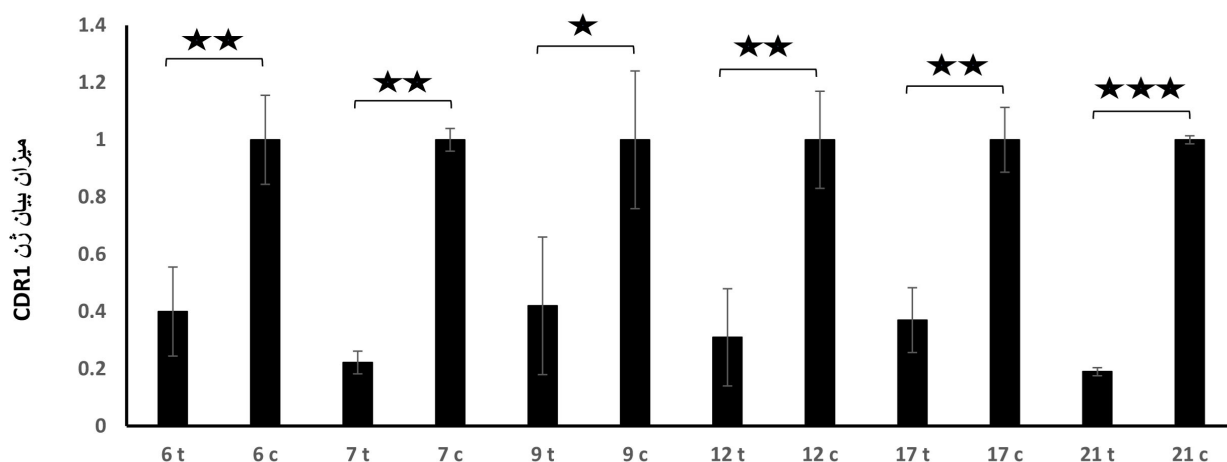
الف) بررسی میزان مقاومت جدایه های *آلبیکنس* به فلوکونازول: در این مطالعه، با روش انتشار دیسک ۸۶/۹۵٪ جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* (۲۰ نمونه) مقاوم به فلوکونازول بودند. تنها یک جدایه (۴/۳۴٪) حساس و دو جدایه (۸/۶۹٪) نیمه حساس گزارش شدند (جدول ۲). همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی دارو (MIC) مشخص گردید. در این بین بیشترین MIC مربوط

جدول ۲: آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ کشی.

شماره نمونه	MIC µg/ml	MFC µg/ml
۶	۱۰۲۴	۲۰۴۸
۹	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۱۲	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۱۷	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۱۹	۱۰۲۴	۲۰۴۸
۲۱	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۲۲	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۲۳	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۲۴	۱۰۲۴	۲۰۴۸
۲۵	۱۰۲۴	۲۰۴۸<
۲۶	۵۱۲	۲۰۴۸
۲۹	۱۲۸	۵۱۲
۳۰	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۳۲	۵۱۲	۱۰۲۴
۳۴	۲۵۶	۵۱۲
۳۵	۵۱۲	۲۰۴۸
۳۶	۵۱۲	۵۱۲
۳۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۴۰	۲۰۴۸	۲۰۴۸<
۴۲	۲۰۴۸	۲۰۴۸<



شکل ۱: نتایج مربوط به تیمار نمونه شماره ۱۷ با دارو. الف) محیط کشت به تنهایی، ب) کشت نمونه شماره ۱۷ بدون دارو، ج) کشت نمونه شماره ۱۷ به همراه فلوکونازول با غلظت ۱۰۲۴ µg/ml، د) کشت نمونه شماره ۱۷ به همراه فلوکونازول با غلظت ۱۰۲۴ µg/ml و نانو ذرات حاوی کورکومین با غلظت ۲۰۰ µg/ml، و) کشت نمونه شماره ۱۷ به همراه فلوکونازول با غلظت ۱۰۲۴ µg/ml و نانو ذرات حاوی کورکومین با غلظت ۴۰۰ µg/ml.



نمودار ۱: میزان بیان ژن *CDR1* در نمونه‌های ۶، ۷، ۹، ۱۲، ۱۷ و ۲۱ در تیمار با فلوکونازول و نانو ذرات حاوی کورکومین (t) در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با فلوکونازول به تنهایی (c).

در مطالعه رشیدی (Rashidi) و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر بازدارندگی اسانس روغنی زیره سیاه بر روی *کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ mg/ml از اسانس روغنی زیره سیاه، رشد *کاندیدا آلبیکنس* را به تأخیر انداخته و بر روی آن اثر مهاری دارند (۲۲).

در مطالعه دیگری اثر مهاری عصاره هیدرو الکلی گیاه تشنه داری (*Scrophularia striata*) روی *کاندیدا آلبیکنس* در شرایط آزمایشگاهی توسط هواسیان (Havasian) و همکاران بررسی گردید. نتایج حاکی از بی‌تأثیر بودن عصاره الکلی و اثر مهاری ضعیف عصاره آبی این گیاه روی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بود (۲۳).

در مطالعه صادق پور (Sadeqpour) و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر هیدرو متانولی پوست انار بر رشد *کاندیدا آلبیکنس* در موش‌های دیابتی شده صورت گرفت. نتایج نشان داد که تیمار خوراکی عصاره متانولی پوست میوه انار سبب بهبود عفونت ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* شده و دارای اثر ضد کاندیدایی قوی می‌باشد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز اثر مهاری کورکومین محبوس شده در نانومیسل در ترکیب با فلوکونازول باعث افزایش اثربخشی فلوکونازول در جدایه های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک گردید.

در مطالعه وایت (White) و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی

کشت پر استفاده شد که طبق شکل ۱ کاهش رشد در آن مشهود بود.

ج) کاهش بیان ژن *CDR1* بعد از تیمار با نانو ذرات حاوی کورکومین: میزان بیان ژن *CDR1* در سلول‌های تیمار شده با فلوکونازول و نانو ذرات حاوی کورکومین در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با فلوکونازول (کنترل) بررسی شد. نتایج کاهش بیان این ژن را در همه جدایه های تحت تیمار با کورکومین نشان داد (نمودار ۱).

بحث

کاندیدا آلبیکنس یک پاتوژن فرصت طلب شایع انسانی است که باعث بیماری‌هایی چون برفک و ولوواژینیت در افراد مستعد از نظر ایمنی می‌شود. درمان اصلی عفونت‌های *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از داروهای ضد قارچی (آزول‌ها، آنالوگ‌های پایریمیدین، پلی‌انها و کاندین‌ها) است. با این حال رایج‌ترین داروهای ضد قارچی داروهای خانواده آزول هستند. با وجود تأثیر گذاری زیاد این داروها در روند بهبود بیمار، استفاده بیش از حد این داروها باعث ایجاد مقاومت دارویی شده است (۲۱). این مساله محققان را بر آن داشته که از ترکیبات گیاهی به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار رشد این عوامل بیماری‌زا در تحقیقات استفاده نمایند.

کورکومین سبب کاهش خروج رودامین 6G به واسطه ناقلین ABC می گردد. اما تأثیری بر روی انتشار متوترکسات از طریق انتقال‌دهنده خانواده MFS ندارد (۲۷).

در مطالعه خواجه (Khajeh) و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی جدایه های مقاوم به آژول *کاندیدا آلبیکنس* با تیمار گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba*) نشان داده شد که بیان ژن‌های *CDR1* و *CDR2* در تیمار با عصاره این گیاه کاهش می‌یابد (۲۸). بنابراین قابل تصور است که ترکیبات گیاهی با اثر هم افزایی با آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند اثر بر بیان ژن‌های درگیر در پمپ‌های افلاکس موجب کاهش رشد عوامل بیماری‌زا شوند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که کورکومین محبوس شده در نانومیسسل قادر است اثر کشندگی فلوکونازول را در جدایه های مقاوم به این دارو افزایش دهد. مکانیسم عمل کورکومین در افزایش اثربخشی فلوکونازول، از طریق کاهش بیان ژن‌های موثر در پمپ افلاکس از جمله *CDRI* و در نتیجه کاهش خروج فلوکونازول از سلول و محبوس شدن غلظت بیشتری از آنتی‌بیوتیک در سلول است.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی می‌باشد. نویسندگان این مقاله از معاون محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و همچنین سرکار خانم دکتر انوری، سرکار خانم دکتر اسدپور، جناب آقای دکتر ناظمی و جناب آقای پورسیف به دلیل همکاری صمیمانه کمال تشکر را دارند.

۳۸ نمونه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از ۱۲ بیمارستان کالیفرنیا گزارش شد که حدود نیمی از آن‌ها به داروهای آژولی مقاوم بودند. افزایش بیان ژن‌های *CDR1*، *CDR2* و *MDR1* در برخی از سویه‌های مقاوم مشاهده شد (۲۵).

در مطالعه لیو (Liu) و همکاران در چین در سال ۲۰۱۵ مشخص شد که از ۳۰ نمونه جمع‌آوری‌شده ۱۲ نمونه حداقل به یکی از داروهای آژولی مقاوم بود و در جدایه های مقاوم به آژول، افزایش بیان ژن‌های *CDR1* و *CDR2* مشاهده گردید (۲۶). با توجه به نتایج اولیه این تحقیق که جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* در غلظت 1/2 MIC رشد کامل داشت، اما در صورت استفاده از کورکومین رشدشان کاهش می‌یابد، می‌توان فرض کرد که کورکومین قادر است به طریقی مقاومت به فلوکونازول را کاهش دهد. با توجه به اینکه در جدایه های مقاوم به فلوکونازول کاهش بیان ژن‌های پمپ افلاکس به‌وفور مشاهده می‌شود، در این تحقیق فرض شد که کورکومین با اثر بر بیان *CDRI* به‌عنوان یکی از ژن‌های موثر در انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها به خارج سلول، باعث اثربخشی آنتی‌بیوتیک شود.

در این مطالعه برای اولین بار از نانو ذرات حاوی کورکومین به منظور بررسی اثر کشندگی بر جدایه های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* استفاده شد و غلظت مناسب کشندگی ۵۰ درصدی جدایه ها، ۴۰۰ µg/ml تعیین شد که به همراه آنتی‌بیوتیک فلوکونازول باعث کاهش بیان ژن *CDRI* در ۶ جدایه شد. بر این اساس کورکومین با کاهش بیان این ژن باعث کاهش تعداد پمپ‌های افلاکس فعال در سطح سلول و در نتیجه کاهش خروج آنتی‌بیوتیک از سلول شده و غلظت پایین‌تری از آنتی‌بیوتیک قادر به کشندگی سلول می‌شود.

در مطالعه شارما (Sharma) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی جدایه های مقاوم به آژول *کاندیدا آلبیکنس* گزارش شد که

References

1. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Rev Genetics*. 2002; 3(12): 918-932.

2. Pierce CG, Lopez-Ribot JL. Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2013; 8(9): 1117-1126.
3. Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole anti-fungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(10): 2676-2684.
4. Casalnuovo I, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004; 8: 69-78.
5. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun.* 2003; 71(8): 4333-4340.
6. Prasad R, Banerjee A, Khandelwal NK, Dhamgaye S. The ABCs of *Candida albicans* multidrug transporter Cdr1. *Eukaryot Cell.* 2015; 14(12): 1154-1164.
7. Karababa M, Coste AT, Rognon B, Bille J, Sanglard D. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(8): 3064-3079.
8. Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Res Int.* 2014; doi: 10.1155/2014/186864
9. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 807-818.
10. Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, Yun I, Bae SK, Kim KW. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. *Oncol Rep.* 2006; 15(6): 1557-1562.
11. Dcodhar S, Sethi R, Srimal R. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res.* 1980; 71: 632-634.
12. Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2005; 2(2): 131-136.
13. Sharma P, Blackburn RC, Parke CL, McCullough K, Marks A, Black C. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers for adults with early (stage 1 to 3) non diabetic chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; 10: CD007751.
14. Ranji N. Investigation of Survivin and hTERT gene expression in gastric adenocarcinoma cell line (AGS) treated by nano Curcumin. *J Cell Mol Res.* 2014; 27(2): 233-241.
15. Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, Nazem S, Farhangi B, Motahari P, Sadeghizadeh M. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. *Prog Biol Sci.* 2015; 5(2): 143-158.

16. Merlino J, Tambosis E, Veal D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1998; 36(4): 1157-1159.
17. Coyle MB. Manual of antimicrobial susceptibility testing: American Society Microbiology; 2005.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4): 402-408.
19. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, Godoy Martinez PC, Goldman MH, Colombo AL. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004; 50(1): 25-32.
20. Watamoto T, Samaranayake LP, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. J Med Microbiol. 2011; 60(Pt 9): 1241-1247.
21. Lohberger A, Coste AT, Sanglard D. Distinct roles of *Candida albicans* drug resistance transcription factors TAC1, MRR1, and UPC2 in virulence. Eukaryot Cell. 2014; 13(1): 127-142.
22. Rashidi A, Mahbod A, Jahanloo AS, Gholami A. Antifungal effect of essential oil of *Bunium persicum* on *Candida albicans*, In vitro study. Hormozgan Med J. 2014; 17(1): 37-44. [In Persian]
23. Havasian MR, Panahi J, Pakzad I, Davoudian A, Jalilian A, Zamanian Azodi M. Study of inhibitory effect of alcoholic and aqueous extract of *Scrophularia striata* (tashne dari) on *candida albicans* in vitro. Res Med. 2013; 36(5): 19-23. [In Persian]
24. Sadeghpour M, Noor-Bakhsh F. The Effect of Hydro-Peel (Pomegranate Peel) on Blood Biochemical Parameters in Diabetic Rats Infected with *Candida Albicans*. J Zanjan Univ Med Sci. 2016; 24(104): 83-93. [In Persian]
25. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(6): 1704-1173.
26. Liu JY, Shi C, Wang Y, Li WJ, Zhao Y, Xiang MJ. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. Res Microbiol. 2015; 166(3):153-161.
27. Sharma M, Manoharlal R, Shukla S, Puri N, Prasad T, Ambudkar SV, Prasad R. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(8): 3256-3265.
28. Khajeh E, Hosseini Shokouh SJ, Rajabibazl M, Roudbary M, Rafiei S, Aslani P, Farahnejad Z. Antifungal effect of *Echinophora platyloba* on expression of CDR1 and CDR2 genes in fluconazole-resistant *Candida albicans*. Br J Biomed Sci. 2016; 73(1): 44-48.



Investigation of antifungal effect of nanoparticle-encapsulated curcumin on *CDR1* gene expression in fluconazole-resistant isolates of *Candida albicans*

Hadiseh Golpour¹, Najmeh Ranji², Seyedeh Hajar Sharami³

¹M.Sc., Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

³ Professor, Reproductive Health Research Center, Department of Obstetrics & Gynecology, Azzahra Hospital, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Curcumin as a natural phenolic compound derived from *Curcuma longa* plant has shown an antifungal property. *Candida albicans* is the most common opportunistic fungal pathogen. Continuous deployment of antifungals against this pathogen has led to the emergence and increasing of the multi-drug resistance. In this study, the effect of nanoparticle-encapsulated curcumin on *CDR1* gene expression was evaluated in fluconazole-resistant isolates of *C. albicans*.

Materials & Methods: In this study, 6 fluconazole-resistant isolates of *C. albicans* were treated just by fluconazole (1/2MIC) as the control sample and in the combination with nanoparticle-encapsulated curcumin as the test sample. After 24h, two cell groups were cultured in Sabouraud Dextrose Agar to estimate cell death percentage. Following RNA extraction and cDNA synthesis, *CDR1* gene expression was investigated quantitatively by real-time PCR method in both curcumin-treated and untreated cells.

Results: Our findings showed that the combination of fluconazole (1/2MIC) and nanoparticle-encapsulated curcumin treatment reduces the fungal growth by 50% after 24 h. Moreover, quantitative real-time PCR analysis revealed that nanoparticle-encapsulated curcumin decreases the expression level of *CDR1*.

Conclusion: Our findings suggested that curcumin can inhibit fungal growth through different mechanisms such as decreasing the number of ABC efflux pumps at the cell surface and synergistically increases the antifungal effect of fluconazole in resistant isolates of *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*, *CDR1* gene, Curcumin, Efflux pump, Micelles nanoparticles.

Correspondence to: Najmeh Ranji

Tel: +98 1333424080

E-mail: n_ranji@iaurasht.ac.ir

Journal of Microbial World 2017, 10(3): 222-230.