مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره اول (پیاپی ۲۶) بهار ۱۳۹۵
صفحات ۳۳-۲۲

Original Article

سنجش کمی نسبی بیان ژن اختصاصی ریسه *HWP1* در مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس*

علیرضا خداوندی[۱]، فهیمه علیزاده*[۱]، مژده شهینی پور[۲]

[۱] استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، [۲] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج

چکیده

سابقه و هدف: کاندیدیازیس یک بیماری های قارچی است که در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی با افزایش همراه بوده است. از دلایل ایجاد مقاومت دارویی در *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد بیوفیلم می باشد. این مطالعه با هدف سنجش نسبی بیان ژن اختصاصی ریسه *HWP1* در مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* تحت تیمار با موثرترین عصاره خانواده نعناعیان انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، فعالیت ضد قارچی عصاره های آبی و اتانولی اندام های برگ، ساقه و ریشه گیاهان نعناع، پونه و آویشن باغی جمع آوری شده در یاسوج بر روی *کاندیدا* با روش های دیسک دیفیوژن و براث میکرودایلوشن ارزیابی و مقایسه شدند. علاوه بر این میزان بیوفیلم مهار شده در حضور موثرترین عصاره با روش رنگ سنجی کریستال ویولت، بررسی مورفولوژی و کمیت نسبی بیان ژن اختصاصی ریسه *HWP1* ارزیابی گردید.

یافته ها: نتایج حاصل بیانگر تاثیر قابل ملاحظه عصاره آبی ریشه آویشن باغی بر رشد *کاندیدا آلبیکنس* بود. سلول های تحت تیمار با عصاره آبی ریشه آویشن باغی به طور معنی دار کاهش میزان بیوفیلم را نشان دادند. علاوه بر این، مشاهدات میکروسکوپی، کاهش سلول های تحت تیمار با عصاره و فلوکونازول را تایید نمود. در نهایت عصاره آبی ریشه آویشن باغی موجب کاهش بیان ژن *HWP1* گردید.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده مکانیسم احتمالی مولکولی تاثیر عصاره آبی ریشه آویشن باغی بر بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* بوده است.

واژگان کلیدی: بیوفیلم، نعناعیان، ژن *HWP1*، *کاندیدا آلبیکنس*.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۴

مقدمه

مخمر پلی مورف *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) یکی از قارچ های بیماریزای فرصت طلبی است که جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان می باشد (۱ و ۲). عفونت های قارچی فرصت طلب در افرادی با ضعف سیستم ایمنی مشکلات بسیاری را ایجاد می نمایند (۳). عوامل بسیاری در *کاندیدا آلبیکانس* شناسایی شده که موجب ایجاد بیماریزایی این مخمر می گردد. از مهمترین ویژگی های قابل توجه *کاندیدا آلبیکنس* توانایی تبدیل اشکال مخمری به ریسه حقیقی، ریسه کاذب و تولید بیوفیلم می باشد (۴-۲).

شروع تشکیل بیوفیلم با چسبندگی مخمر به سطوح بیولوژیکی و تجهیزات پزشکی همراه است. چسبندگی منجر به استقرار، تولید لوله زایا و گسترش شبکه های ریسه ای همراه با شکل گیری ماده زمینه ای می گردد. پروتئین دیواره ریسه ای 1 (*HWP1*) از جمله پروتئین های موثر در چسبندگی و تنظیم

*) آدرس برای مکاتبه: یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۷۴۳۳۳۱۳۹۳۰ پست الکترونیک: falizadeh@iauyasooj.ac.ir

بیوفیلم است که توسط ژن *HWP1* تولید می گردد (۳، ۵ و ٦). عفونت های ناشی از بیوفیلم قارچی، به عنوان یک مشکل بالینی مهم شناخته شده است. یکی از اصلی ترین دلایل این موضوع، شکست در درمان عفونت می باشد (٦). همچنین خواص ضد میکروبی ترکیبات بیولوژیک گیاهی بدون مشاهده مقاومت دارویی و عوارض جانبی، امروزه مورد توجه قرار گرفته و دارای اهمیت می باشد. مطالعات نشان داده است که گیاهان دارویی موجب مهار میکروارگانیسم ها می گردند (۹-۷).

استفاده از فرآورده های طبیعی و گیاهی می تواند رویکردی جهت مقابله با مقاومت آنتی بیوتیکی باشد. به طور سنتی گیاهان نعناع (*Mentha spicata* L.)، پونه (*Mentha pulegium*) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) به دلیل ارزش غذایی و دارویی حائز اهمیت می باشند. مطالعات بسیاری خواص ضد میکروبی نعناع، پونه و آویشن باغی را نشان داده است (۷، ۸ و ۱۰). همچنین تاثیر ضد قارچی نعناع، پونه و آویشن باغی علیه *کاندیدا آلبیکنس* مشخص شده است (۱۳-۱۱).

نتایج بسیاری از تحقیقات بیانگر مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* و کاهش بیان ژن *HWP1* بوده است. تاثیر ضد میکروبی آلیسین (ترکیب مشتق از سیر) (۳)، عصاره موسیر (١٤) و پپتید KSL-W (۱۵) مانند داروهای رایج ضد قارچی فلوکونازول و آمفوتریسین B موجب مهار تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* و کاهش بیان ژن *HWP1* بوده است.

هدف از این مطالعه سنجش نسبی بیان ژن اختصاصی ریسه *HWP1* در مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* تحت تیمار با موثرترین عصاره خانواده نعناعیان بود.

مواد و روش ها

الف) میکروارگانیسم ها: چهار جدایه بالینی از افراد دچار ضعف سیستم ایمنی بدن شامل افراد مبتلا به سرطان خون، تومور مغزی، ایدز و دیابت و سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 10231 به عنوان منبعی برای کنترل کیفت مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به تولید کلنی ماهواره ای شکل کرم رنگ بر روی محیط کشت سابوراد دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SDA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan)، مشاهده میکروسکپی مخمر، تولید لوله زایا، هیدرولیز اوره و کشت بر روی محیط کشت کروم آگار *کاندیدا* (CHROMagar Company, France) جدایه ها شناسایی و در سابوراد دکستروز مایع (SDB, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) حاوی کلرامفنیکل ذخیره شدند (١٦).

ب) تهیه عصاره های گیاهی: نمونه های برگ، ساقه و ریشه گیاهان نعناع، پونه و آویشن باغی در فصل بهار از فروشگاه های یاسوج تهیه شدند و توسط شرکت دارویی زرد بند یاسوج تایید علمی گردیدند. مطابق روش انجام شده توسط خداوندی (Khodavandi) و همکاران (١٤) با اندکی تغییر، عصاره گیری انجام شد. پس از شستشوی اندام های مختلف گیاهان با آب مقطر استریل، اندام های گیاهان قطعه قطعه و در فور تا رسیدن به جرم ثابت خشک شدند. قطعات خشک شده گیاهان پودر و از الک شماره ۸۰ عبور داده شدند. به ترتیب یک گرم از نمونه های گیاهی با ۵ میلی لیتر آب مقطر و اتانول مخلوط و در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. پس از سوکسیله کردن، عصاره ها از کاغذ صافی واتمن شماره ٤٢ عبور داده شدند. برای استریل نمودن عصاره ها از میلی پور فیلتر با سایز ۰/۲۲ میکرومتر استفاده گردید.

ج) آزمون های حساسیت سنجی ضد قارچی: آزمون غربالگری دیسک دیفیوژن مطابق دستورالعمل استاندارد CLSI برای مخمرها ($CLSI-M_{44}-A$) با اندکی تغییر انجام پذیرفت. به طور خلاصه از جدایه های *کاندیدا آلبیکانس* و سویه استاندارد برای اطمینان از فاز لگاریتمی رشد دو بار کشت مجدد تهیه شد و سوسپانسیون به کدورت معادل نیم مک فارلند (CFU/ml ٦$\times$۱۰-۵-۱) در سرم فیزیولوژی تهیه گردید. برای دست یابی به سوسپانسیون با کدورت معادل نیم مک فارلند، تعداد ۵ کلنی به قطر تقریبی یک میلی متر به

۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ استریل اضافه شد و ۱۵ ثانیه ورتکس و یک بار شستشو داده شدند.

با استفاده از اسپکتروفتومتر (UNICO 2150-UV, USA) در طول موج ۵۳۰ نانومتر تراکم سلول ها را در حدود $۱-۵\times۱۰^{۶}$ سلول مخمری در میلی لیتر به منظور دست یابی به کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری به صورت کشت چمنی بر روی محیط کشت SDA در پلیت های ۹ سانتیمتری کشت داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه خشک گردید. سپس دیسک های خالی به حجم های مختلف (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) از عصاره های استریل گیاهان آغشته گردیدند و بعد از خشک شدن دیسک ها به فاصله ۳-۲/۵ سانتی متر قرار داده شدند. در این مطالعه از دیسک های حاوی ۵ میلی گرم/میلی لیتر فلوکونازول (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) به عنوان کنترل مثبت و دیسک های خالی استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ها ثبت گردید. آزمایش ها به صورت تکرارهای ۲ و ۳ تایی انجام گرفت (۳).

برای تعیین کمترین رقت ممانعت کنندگی (MIC) عصاره ها از روش میکرودایلوشن براث مطابق دستورالعمل CLSI برای مخمر ها (M_{27}-A_3) با اندکی تغییر استفاده گردید. برای انجام آزمایش از میکروپلیت های ۹۶ چاهکی استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ال-گلوتامین (Sigma) به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی در چاهک میکروپلیت اضافه و به خوبی مخلوط شد. لازم به ذکر است که مطابق دستورالعمل CLSI سوسپانسیون تهیه شده معادل ۰/۵ مک فارلند در ابتدا به میزان ۱:۱۰۰ با سرم فیزیولوژی رقیق گردید. در مرحله بعد به میزان ۱:۲۰ در محیط کشت استریل RPMI-1640 رقیق شد. در نهایت سوسپانسیون حاصل دارای $۰/۵-۲/۵\times۱۰^{۳}$ سلول مخمر در میلی لیتر محاسبه گردید. برای اینکه چاهک ها وضعیت یکسان پیدا نمایند، میکروپلیت های حاوی سوسپاسیون میکروبی و عصاره ها پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای یخچال، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شدند.

به منظور تهیه کنترل مثبت ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروب افزوده شد. همچنین برای تهیه کنترل منفی نیز ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در محیط کشت به ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پس از گرمخانه گذاری ابتدا محتویات هر چاهک به خوبی مخلوط گردید و توسط الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر میزان جذب نوری چاهک ها اندازه گیری شد. نقطه پایانی برای تاثیر عصاره ها بر مخمر به عنوان کمترین رقت هر ترکیب ضد قارچی که از ۵۰ و ۸۰ درصد رشد در مقایسه با کنترل ممانعت نماید، تعریف شد. آزمایش ها به صورت ۳ تکرار ۳ تایی انجام گرفت (۳ و ۱۴).

د) *تشکیل بیوفیلم:* برای تشکیل بیوفیلم در میکروپلیت ۹۶ چاهکی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی $۱۰^{۶}$ سلول مخمر در محیط کشت RPMI-1640 با اضافه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آبی ریشه آویشن باغی یا فلوکونازول در رقت های مختلف بر اساس نتیجه MIC از رقت های معادل یک چهارم MIC، نصف MIC، MIC و دو برابر MIC استفاده شد. میکروپلیت ها به مدت ۹۰ دقیقه در گرمخانه بدون شیک در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. سپس ۲۴ ساعت در گرمخانه شیکردار در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. سپس تاثیر عوامل ضد قارچی بر بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* با روش سنجش کریستال ویولت و مشاهدات میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفت (۳).

ه) *سنجش کریستال ویولت:* پس از تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* همزمان با تاثیر عصاره و فلوکونازول، چاهک های میکروپلیت با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و ۱۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد به هر چاهک اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه تثبیت شدن، روماند دور ریخته شد. چاهک های میکروپلیت در مجاورت هوا خشک گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویولت به میزان ۱:۵۰ استوک اولیه (Sigma) به هر چاهک اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در

دمای اتاق نگه داری شد. پس از گرمخانه گذاری با آب مقطر شستشو و ۱۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ (Sigma) به چاهک ها اضافه گردید. به منظور بررسی نتایج نمونه با استفاده از دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر میزان جذب نوری حاصل اندازه گیری شد. برای کنترل مثبت از محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی استفاده شد. آزمایش ها به صورت ۲ تکرار ۳ تایی انجام گرفت (۳).

و) ارزیابی اثر عصاره بر بیوفیلم کاندیدا آلبیکانس : پس از تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* همزمان با تاثیر عصاره آبی ریشه آویشن باغی و فلوکونازول مطابق روش انجام شده در مرحله تشکیل بیوفیلم، به جای میکروپلیت در پلیت ۶ چاهکی که در کف پلیت کاور اسلیپ استریل قرار داده شده، استفاده گردید. روماند برای انجام استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفته شد. لامل بر روی لام قرار گرفت و با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شد (۳).

ز) استخراج RNA و سنتز cDNA: سوسپانسیون مخمری جمع آوری شده از مرحله قبل در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و پلت با سرم فیزیولوژی سه بار شستشو داده شد. استخراج RNA کل توسط کیت RNeasy Mini مخصوص سلول های مخمری (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با اندکی تغییرات انجام گرفت. کیفیت و کمیت RNA کل استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز سنجش گردید. برای از بین بردن احتمال هر نوع آلودگی DNA، از تیمار با آنزیم RNase free DNase set (Qiagen) استفاده شد. با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و پرایمرهای هگزامر تصادفی موجود در کیت سنتز cDNA (Fermentas, USA) ۰/۵ میکروگرم از RNA کل، مطابق دستورالعمل کیت cDNA سنتز گردید. آزمایش ها به صورت ۲ تکرار ۳ تایی انجام گرفت (۳ و ۱۴).

جدول ۱: پرایمرهای اولیگونوکلئوتید استفاده شده برای واکنش زنجیره ای پلی مراز (۳).

ژن	توالی پرایمر (3'→5')	اندازه محصول (جفت باز)
HWP1	F: GGTAGACGGTCAAGGTGAAACA R: AGGTGGATTGTCGCAAGGTT	۲۸۳
ACT	F: ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC R: GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA	۵۱۶

ح) واکنش زنجیره ای پلی مراز معکوس نیمه کمی: ژن *HWP1 کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از پرایمر طراحی شده توسط خداوندی (Khodavandi) و همکاران (۳) از cDNA سنتز شده، تکثیر گردید. علاوه بر این، از ژن اکتین به عنوان ژن خانه دار و کنترل داخلی برای نرمال کردن رقت متفاوت RNA در طول استخراج استفاده شد (جدول ۱).

علاوه بر این، برای هر نمونه کنترل منفی داخلی بدون آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، برای اطمینان از اینکه محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز ناشی از DNA ژنومی نباشد، تهیه گردید. هر واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر 10 X، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (Bioneer, Korea)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی مراز، ۱ میکرولیتر cDNA و مقدار مناسب آب دیونیزه (سیناژن، ایران) انجام شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Techno, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و در ادامه ۲۶ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. آزمون ها به صورت ۲ تکرار ۳ تایی انجام گرفت (۳ و ۱۴).

ط) سنجش بیان نسبی ژن HWP1: محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. برای ایجاد شرایط یکسان در همه تکرارها، لازم است برای یکنواخت بودن ژل ابتدا کالیبراسیون ژل صورت گیرد. رقت ژل آگاروز، بافر، جهت ژل، ضخامت ژل، مقدار اتیدیوم بروماید مورد استفاده و همچنین دمای محیط بسیار مهم است.

ژل آگاروز با استفاده از تصویرساز ژل داک (Bio-Rad, USA) با شرایط عکس برداری یکسان مشاهده گردید. میزان بیان ژن با استفاده از نرم افزار Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad, USA, version 4.6) بر اساس حجم باند های ایجاد شده ارزیابی گردید. برای استاندارد نمودن حجم اندازه گیری شده از رقت مارکر استفاده شد و با استفاده از فرمول تغییر در بیان ژن=میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس (اکتین) در نمونه های تیمار شده/میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه کنترل، میزان بیان ژن ها محاسبه گردید.

پس از محاسبات آماری ژن هایی که تغییر در بیان به میزان ۲≤ و یا ۰/۵≥ داشته اند به ترتیب به عنوان افزایش بیان ژن و کاهش بیان ژن در نظر گرفته شدند (۱٤).

ی) *طرح مطالعه و آنالیز آماری*: این مطالعه به صورت طرح کاملاً تصادفی و آزمایش ها به صورت ۲ تکرار ۳ تایی انجام گرفت. نتایج حاصل از مطالعه با استفاده نسخه هفدهم نرم افزار آماری *SPSS* (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از نرمال نمودن داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شد. ارزش p <۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از تست غربالگری دیسک دیفیوژن مربوط به عصاره های گیاهی نعناع، پونه و آویشن باغی نشان داد که در مقایسه با داروی ضد قارچی بر روی جدایه های بالینی و سویه استاندارد ATCC *کاندیدا آلبیکنس* قارچی موثر بوده است. فعالیت ضد کاندیدیایی (هاله ممانعت از رشد) عصار های مورد سنجش نشان داد که دارای پتانسیل بیشتر ضد قارچی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر می باشند.

قویترین هاله ممانعت از رشد علیه جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* مربوط عصاره آبی ریشه آویشن باغی در مقایسه با عصاره های دیگر بود (جدول ۲). نتایج حاصل نشان داد که اختلاف قابل

جدول ۲: میزان هاله ممانعت از رشد (میلی متر) حاصل از تست غربالگری دیسک دیفیوژن عصاره های آبی و اتانولی اندام های برگ، ساقه و ریشه نعناع، پونه و آویشن باغی علیه *کاندیدا آلبیکنس* در حجم ۱۰۰ میکرولیتر.

عصاره های مورد آزمایش/جدایه ها		*کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴
نعناع	عصاره آبی	برگ	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
		ساقه	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
		ریشه	٦/۸۰±۰/۵۲	٦/۷۵±۱/۰٦	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
	عصاره اتانولی	برگ	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۱	٦±۰/۰۰
		ساقه	۷±۱/٤۱	٦±۰/۰۰	۷/۵±۲/۱۲	٦±۰/۰۰
		ریشه	٦±۰/۰۰	٦/۰۱±۰/۰۵	٦±۰/۰۰	٦/۱۵±۰/۲۱
پونه	عصاره آبی	برگ	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
		ساقه	۷/۷۱±۰/۷۷	٦/۲۵±۰/۳۵	٦/۷۵±۱/۰٦	٦±۰/۰۰
		ریشه	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦/۳۰± ۰/٤۲
	عصاره اتانولی	برگ	٦±۰/۰۰	٦/۵±۰/۰۱	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
		ساقه	٦±۰/۰۰	٦/۲۵ ±۰/۳۵	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
		ریشه	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦/۱۵±۰/۲۱
آویشن باغی	عصاره آبی	برگ	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	۷/٦۵±۰/۳۳	٦±۰/۰۰
		ساقه	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
		ریشه	۸/۸۳±۰/۱٤	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
	عصاره اتانولی	برگ	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰
		ساقه	٦±۰/۰۰	٦±۰/۰۰	٦/۱۹±۰/٤۹	٦/۱۵±۰/۲۱
		ریشه	۷±۱/٤۷	۸±۰/٤۹	٦/۱۹±۰/٤۹	٦/۱۹±۰/٤۹
فلوکونازول		۳۳/۱۰±۰/۰۱	۳۳/۱۱±۰/۱٦	۳۳/۳۲±۰/۵۲	۳۳/۰۱±۰/۰۲	۳۳/۱۱±۰/۱۰

جدول ۳: میزان MIC نسبی عصاره های آبی و اتانولی اندام های برگ، ساقه و ریشه نعناع، پونه و آویشن باغی علیه *کاندیدا آلبیکنس*.

عصاره های مورد آزمایش/جدایه ها		*کاندیدا آلبیکانس ATCC*	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ٤
عصاره آبی ریشه نعناع	MIC_{80}	-	۱/٥٦	۱/٥٦	-	-
	MIC_{50}	-	۰/۳۱	۰/۱۹	-	-
عصاره اتانولی ساقه نعناع	MIC_{80}	۱/٥٦	-	۱/٥٦	۱/٥٦	-
	MIC_{50}	۰/۳۱	-	۰/۲۷	۰/۲۳	-
عصاره اتانولی ریشه نعناع	MIC_{80}	-	-	-	-	۳/۱۲
	MIC_{50}	-	-	-	-	۰/۳٥
عصاره آبی برگ پونه	MIC_{80}	-	-	-	-	۳/۱۲
	MIC_{50}	-	-	-	-	۰/۱۹
عصاره آبی ساقه پونه	MIC_{80}	۰/۷۸	-	۰/۷۸	۱/٥٦	-
	MIC_{50}	۰/۰۰٥	-	۰/۰۱۱	۰/۰٤	-
عصاره آبی ریشه پونه	MIC_{80}	-	-	-	-	۳/۱۲
	MIC_{50}	-	-	-	-	۰/۲۳
عصاره اتانولی برگ پونه	MIC_{80}	-	-	٦/۲٥	-	-
	MIC_{50}	-	-	۰/۳۱	-	-
عصاره اتانولی ساقه پونه	MIC_{80}	-	-	۳/۱۲	-	-
	MIC_{50}	-	-	۰/۳۹	-	-
عصاره آبی برگ آویشن باغی	MIC_{80}	-	-	٦/۲٥	-	-
	MIC_{50}	-	-	۰/۱۷	-	-
عصاره آبی ریشه آویشن باغی	MIC_{80}	۰/۳۹	-	-	-	-
	MIC_{50}	۰/۲۳	-	-	-	-
عصاره اتانولی برگ آویشن باغی	MIC_{80}	-	۳/۱۲	-	-	-
	MIC_{50}	-	۰/۳۹	-	-	-
عصاره اتانولی ساقه آویشن باغی	MIC_{80}	-	-	-	۳/۱۲	٦/۲٥
	MIC_{50}	-	-	-	۰/۳۱	۰/۲۷
عصاره اتانولی ریشه آویشن باغی	MIC_{80}	۰/۷۸	-	-	-	-
	MIC_{50}	۰/۰۱۱	-	-	-	-
فلوکونازول	MIC_{80}	۰/۱٥۸	۰/۱۳٤	۰/۱٤۷	۰/۱٦۳	۰/۱٦۷
	MIC_{50}	۰/۰۸٥	۰/۰۸۲	۰/۰٦۸	۰/۰۸۱	۰/۰۸۳

ملاحظه ای بین حلال های مورد استفاده (آب و اتانول) در ممانعت از رشد *کاندیدا آلبیکنس* وجود نداشته است.

نتایج حاصل از سنجش MIC عصاره های مورد مطالعه علیه جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بهترین تاثیر ضد کاندیدیایی مشاهده شده در عصاره آبی آویشن باغی با کمترین میزان MIC برابر با ۰/۳۹ و هاله ممانعت از رشد ۰/۱٤±۸/۸۳ میلی متر می باشد.

نتایج حاصل از تاثیر عصاره آبی آویشن باغی و فلوکونازول بر تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* به روش سنجش کریستال ویولت نشان دهنده تاثیر قابل ملاحظه ($p<۰/۰۰٥$) کاهش تعداد سلول های تشکیل دهنده بیوفیلم بود (جدول ٤).

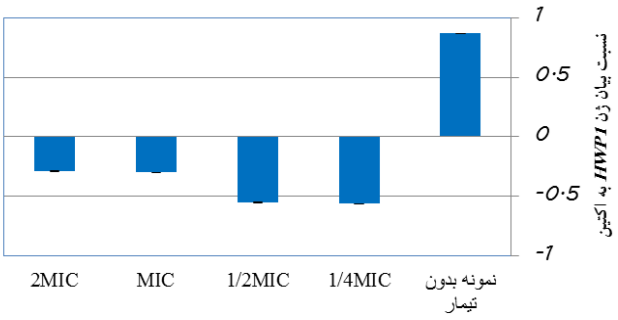
علاوه بر این نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکپی کاهش قابل ملاحظه تعداد سلول های مخمری و کاهش تبدیل سلول های مخمری به ریسه در نمونه های تحت تیمار با عصاره آبی آویشن باغی و فلوکونازول را نشان داد. به این ترتیب که افزایش رقت عصاره و فلوکونازول، کاهش تعداد سلول ها را به دنبال داشت. اما در نمونه کنترل (بدون تیمار) تغییری مشاهده نشد و بیوفیلم رشد کرده متشکل از چندین لایه فشرده از سلول های مخمری و ریسه بود (شکل ۱).

نتایج حاصل از آنالیز محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز معکوس بیانگر تغییرات معنی داری ($p\leq۰/۰۰٥$) در بیان ژن *HWP1* *کاندیدا آلبیکنس* تحت تیمار با عصاره آبی آویشن

جدول ۴: نتایج حاصل از تاثیر عصاره ی آبی ریشه ی آویشن باغی و فلوکونازول بر تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* با روش سنجش کریستال ویولت در رقت های مختلف بر اساس MIC.

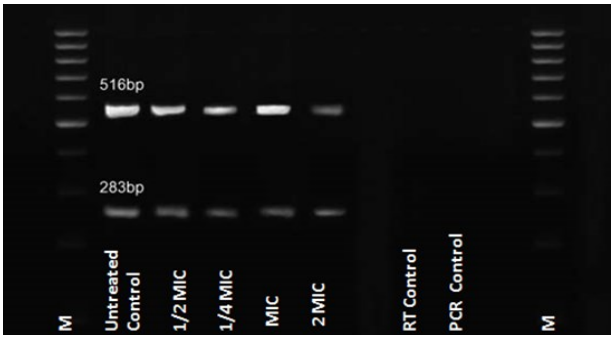
غلظت عوامل ضد قارچی	میانگین و انحراف معیار جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر	
	عصاره آبی ریشه آویشن باغی (میلی گرم در میلی لیتر)	فلوکونازول (میکروگرم در میلی لیتر)
یک چهارم MIC	۰/۱۹±۱/۲۸	۰/۰۱٤±۰/۲٤
نصف MIC	۰/۰۸±۰/۸۱	۰/۰۰۷±۰/۲۲
MIC	۰/۰٤±۰/٤۳	۰/۰۰۷±۰/۲۰
دو برابر MIC	۰/۰٤±۰/۳۲	۰/۰۰۵±۰/۱۷
نمونه بدون تیمار	۰/۰۲±۲/۲۰	۰/۰۰٦±۲/۲۰

باغی بود. میزان بیان ژن *HWP1 کاندیدا آلبیکنس* در رقت های معادل یک چهارم MIC، نصف MIC، MIC و دو برابر MIC عصاره آبی آویشن باغی در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است. تغییرات بیان ژن *HWP1* نسبت به نمونه کنترل بدون تیمار برای رقت های معادل یک چهارم MIC، نصف MIC، MIC و دو برابر MIC عصاره آبی آویشن باغی به ترتیب ۰/۰۱±۰/٦٤، ۰/۰۰۳±۰/٦۳، ۰/۰۰±۰/۳٤، ۰/۰۰±۰/۳۳ بودند.

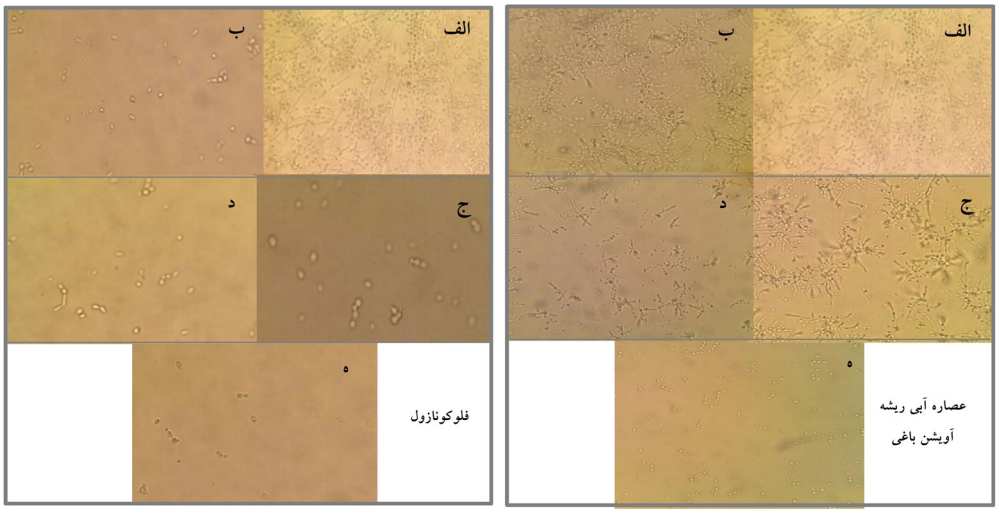


غلظت های مختلف عصاره بر اساس **MIC**

شکل ۲: مقدار نسبی بیان ژن *HWP1* در بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* تحت تیمار با رقت های مختلف عصاره آبی ریشه آویشن باغی پس از ۲٤ ساعت.



شکل ۳: نتایج حاصل از بیان ژن *HWP1* در بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* تحت تیمار با رقت های مختلف عصاره آبی ریشه آویشن باغی بعد از ۲٤ ساعت بر روی ژل آگاروز. Untreated control: نمونه بدون تیمار (کنترل مثبت)، RT control: کنترل داخلی واکنش زنجیره ای پلی مراز معکوس، PCR control: کنترل واکنش زنجیره ای پلی مراز، M: مارکر.



شکل ۱: مشاهده میکروسکوپی تاثیر عصاره آبی ریشه ی آویشن باغی و فلوکونازول بر روی بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231 در رقت های مختلف بر اساس MIC. الف) نمونه بدون تیمار، ب) یک چهارم MIC ج) نصف MIC د) MIC ه) دو برابر MIC . بزرگنمایی X40. Bar = 50 µm.

بحث

مخمر *کاندیدا* دارای عوامل بیماری زایی زیادی مانند انتقال از سلول های مخمری به ریسه، چسبندگی، تغییر فنوتیپی، توانایی ترشح آنزیم های هیدرولیتیک به طور عمده پروتئینازها، فسفولیپازها و تشکیل بیوفیلم دارند (۴-۲). گام اول در ایجاد عفونت کاندیدیازیس، اتصال *کاندیدا* بر سطح سلول میزبان است. پروتئین HWP1 اتصال دهنده‌ای مهم برای تنظیم رشد و نمو است. همچنین نقش مهمی در رشد ریسه و تشکیل بیوفیلم ایفا می نماید. تشکیل بیوفیلم توسط *کاندیدا آلبیکنس* عمدتاً متکی بر پروتئین HWP1 است که نقش مهمی در بیماریزایی *کاندیدا* دارد (۱۷). علاوه بر این مطالعات نشان داده که توانایی تولید بیوفیلم توسط *کاندیدا* نقش مهمی در قدرت بیماریزایی مخمر دارد (۲ و ۳).

در مجموع تشکیل بیوفیلم *کاندیدا* از سه مرحله فاز اولیه، چسبندگی سلول مخمر به سطح، فاز میانی، شکل گیری ماده زمینه با تبدیل فرم مخمر به فرم ریسه ای و فاز بلوغ، افزایش ماده زمینه و سه بعدی شدن تشکیل می شود. از جمله عوامل موثر در تشکیل بیوفیلم *کاندیدا* شامل ماهیت شیمیایی سطح تماس و متوسط افزایش قند می باشد (۱۸). از سوی دیگر، بیوفیلم مانعی طبیعی در مقابل درمان با برخی از داروهای ضد قارچ است که ممکن است منجر به مقاومت دارویی گردد (۲ و ۳).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تاثیر عصاره های اندام های مختلف گیاهان نعناع، پونه و آویشن باغی علیه *کاندیدا آلبیکنس* را نشان می دهد که با مطالعات قبلی در این مورد هم خوانی دارد (۱۲، ۱۳ و ۱۹). نتایج ما نشان داد که عصاره آبی ریشه آویشن باغی بیشترین تاثیر ضد قارچی علیه *کاندیدا آلبیکانس* را دارد. همچنین در مطالعات انجام شده توسط اکبری (Akbari) اثر ضد کاندیدیایی گیاه آویشن مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج به دست آمده نشان داد که آویشن تاثیر بالقوه ای در ممانعت از رشد *کاندیدا آلبیکانس* در شرایط آزمایشگاهی داشته است (۲۰) .نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی ریشه آویشن باغی و فلوکونازول تاثیر بالقوه ای در ممانعت از تولید بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* داشته است. آپالوری (Uppuluri) و همکاران (۲۱) به ارزیابی تاثیر فلوکونازول بر روی سلول های بیوفیلم *کاندیدا* پرداختند. نتایج محققین یاد شده، کشته شدن حدود ۵۰ درصد از سلول های بیوفیلم پس از ۱۲ ساعت قرار گرفتن مدوام در برابر فلوکونازول را نشان داد. علاوه بر این ۲۴ ساعت پس از تیمار با فلوکونازول، نسبت سلول های مرده در جمعیت پراکنده به میزان ۶۶ درصد افزایش یافت. این مطالعه نشان داده که عصاره آبی ریشه آویشن باغی در کاهش بیان HWP1 در رقت های مختلف بر اساس MIC تاثیر قابل ملاحظه ای داشته است.

تبرگ (Theberge) و همکاران (۱۵)، تاثیر ضد میکروبی پپتید KSL-W را در مهار تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* با ارزیابی میزان بیان ژن *HWP1* را مورد سنجش قرار دادند. کشت *کاندیدا* تحت شرایط تولید بیوفیلم، آشکار نمود که تشکیل بیوفیلم را در روزهای دوم، چهارم و ششم بعد از تیمار با پپتید کاهش یافته است. علاوه بر این پپتید KSL-W موجب تخریب بیوفیلم و همچنین کاهش معنی دار بیان ژن *HWP1* را به دنبال داشت. علاوه بر این نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج مطالعه انجام شده توسط زانگ (Zhang) و همکاران (۲۲) هم خوانی داشت.

در مطالعه یاد شده تاثیر ایزومرهای سیس و ترانس ۲-دودکانوئیک اسید را در مهار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از روش های جذب نوری، سنجش های میکروسکوپی و میزان بیان ژن اختصاصی ریسه *HWP1* و *ALS3* مورد ارزیابی قرار گرفته است. یافته ها نشان داد که ۳۰۰ میکرولیتر از هر کدام از ایزومرهای سیس و ترانس ۲-دودکانوئیک اسید به ترتیب موجب مهار ۹۰ و ۶۰ درصد بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* شده است. همچنین نتایج ارزیابی بیان ژن نشان دهنده کاهش بیان ژن های مورد مطالعه بوده است.

مطالعات نشان داده است که ژن تولید کننده HWP1 در مراحل ابتدای تشکیل بیوفیلم بیان می شود (سلول های چسبنده به شکل مخمر) و معمولاً از شکل گیری بیوفیلم ها توسط سطوح

لوله زایا پدیدار شده است. بنابراین پروتئین HWP1 نقش مهمی در شکل گیری بیوفیلم دارد که این پتانسیل با ایجاد واکنش های فیزیکی این پروتئین با فاکتورهای دیگری مانند ALS1 و ALS3 در مراحل ابتدایی شکل گیری بیوفیلم توسعه می یابد (۱٤). در مطالعه انجام شده توسط خداوندی (Khodavandi) و همکاران (۳) اثر ماده خالص آلیسین بر روی ژن مداخله کننده در تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس*، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده تاثیر آلیسین و فلوکونازول بر روی مهار بیوفیلم *کاندیدا* و کاهش بیان ژن *HWP1* بوده است. در مطالعه ای مشابه تاثیر عصاره هگزانی موسیر بر بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* کاهش قابل ملاحظه بیان ژن *HWP1* نشان داده شده است (۱٤).

لای (Li) و همکاران (۲۳) تاثیر ضد بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* ترکیب تروستیلبن مشتق شده از منابع مختلف گیاهی با هدف یافتن مکانیسم احتمالی و با استفاده روش های رنگ سنجی XTT، اندازه گیری توده بیوفیلم، مشاهدات میکروسکوپی هم کانونی(کانفوکال) و الکترونی و همچنین تغییرات بیان ژن های *ECE1*، *ALS3*، *HWP1*، *HGC1* و *RAS1* مورد سنجش قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه یاد شده تاثیر ≤۱٦ میکروگرم/ میلی لیتر از ترکیب تروستیلبن علیه بیوفیلم را نشان داده است. علاوه بر این در رقت ٤ میکروگرم/میلی لیتر تروستیلبن موجب کاهش آبگریزی سطح سلولی و مهار تشکیل ریسه شده است. مطالعه تغییرات بیان ژنی کاهش بیان ژن های مرتبط با ریسه در سلول های تیمار شده با ترکیب تروستیلبن را نشان داده است.

نتیجه گیری

مطالعه مولکولی حاضر نشان داد که عصاره آبی ریشه آویشن باغی تاثیر قابل ملاحظه ای در کاهش بیان ژن *HWP1* مخمر بیماری زای *کاندیدا آلبیکانس* دارد. از آنجایی که ژن *HWP1* یک ژن کنترل کننده و موثر بر ایجاد پروتئین های ریسه و تشکیل بیوفیلم در این مخمر می باشد. بنابراین می تواند به عنوان یک هدف موثر برای تاثیر عوامل ضد کاندیدیایی محسوب گردد. همچنین با انجام آزمایش های تکمیلی بر روی عصاره آبی ریشه آویشن باغی از قبیل شناسایی ترکیبات موثره علیه *کاندیدا آلبیکانس* و مطالعه در بدن حیوان آزمایشگاهی می تواند جایگزین داروهای شیمیایی گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این طرح و شرکت دارویی زرد بند یاسوج به دلیل کمک های ارزشمندشان در شناسایی و تهیه عصاره گیاهی، کمال امتنان را دارند.

References

1. Odds FC, Brown AJP, Grow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol. 2003; 11: 272–279.

2. Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. Mycoses. 2008; 52: 1–10.

3. Khodavandi A, Harmal NS, Alizadeh F, Scully OJ, Sidik SHM, Othman F, Sekawi Z, Ng KP, Chong PP. Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression. Phytomedicine. 2011; 19: 56–63.

4. da Silva-Rocha WP, Lemos VLB, Svidizisnki TIE, Milan EP, Chaves GM. Candida species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. BMC Oral Health. 2014; 14: 20.

5. Inci M, Atalay MA, Ozer B, Evirgen O, Duran N, Koksaldi Motor V, Nedret Koc A, Onlen Y, Kilinc C, Durmaz S. Investigations of ALS1 and HWP1 genes in clinical isolates of *Candida albicans*. Turkish J Med Sci. 2013; 43: 125–130.

6. Finke JS, Mitchel AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011; 9: 109–118.

7. Fayad NK, AL-Obaidi OHS, Al-Noor TH, Ezzat MO. Water and alcohol extraction of thyme plant (*Thymus vulgaris*) and activity study against bacteria, tumors and used as anti-oxidant in margarine manufacture. Innov Union SB - European Commn. 2013; 4(1): 41–51.

8. Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshkumar A, Sureshkumar P, Saravana MK. Antibacterial activity of *Mentha piperita* L. (peppermint) from leaf extracts–a medicinal plant. Acta agri Slovenica. 2007; 89(1): 73–79.

9. Zarringhalam M, Zaringhalam J, Shadnoush M, Rezazadeh SH, Tekieh E. Inhibitory effect of black and red pepper and thyme extracts and essential oils on enterohemorrhagic *Escherichia coli* and DNase activity of *Staphylococcus aureus*. Iranian J Pharm Res. 2013; 12(3): 363–369.

10. Gaeini Z, Taghinezhad M, Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Mahdavi SM. Healthful characteristics of pennyroyal essential oil. European J Pharm Sci. 2013; 4(4): 102–107.

11. Naeini A, Khosravi AR, Chitsaz M, Shokri H, Kamlnejad M. Anti-*Candida albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. J Med Mycol. 2009; 19: 168–172.

12. Lund RG, Serpa R, Nascente PDS, Ribeiro GA, Freitag RA, Del Pina FAB. In vitro study on the antimicrobial effect of hydroalcoholic extracts from *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) against oral pathogens. Acta Scientiarum. 2012; 34(4): 437–442.

13. Pramila DM, Xaviar R, Marimuthu K, Kathiresan S, Khoo ML, Senthilkumar M, Sathya K, Sreeramanan S. Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperita*: Lamiaceae). J Med Plants Res. 2012; 6(2): 331–335.

14. Khodavandi A, Alizadeh F, Namvar F, Rosfarizan M, Chong, PP. Anti-Candida potential of *Allium ascalonicum* Linn: antibiofilm activity and biomolecular mechanism of action. J Pure Appl Microbiol. 2014; 8(2): 349–356.

15. Theberge S, Semlali A, Alamri A, Leung KP, Rouabhia M. C. albicans growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial decapeptide KSL-W. BMC Microbiol. 2013; 13(1): 246.

16. Raju, SB, Rajappa S. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. ISRN Dent. 2011; 487921–487928.

17. Fan Y, He H, Dang Y, Pan H. Hyphae-specific genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1and relevant signaling pathways in *Candida albicans*. Mycopathologia. 2013; 176: 329–335.

18. Dominic RM, Shenoy S, Baligas S. *Candida* biofilms in medical devices: evolving trends. Kathmandu University Med J. 2007; 5(3): 431–436.

19. Carretto CFP, Almeida RBDA, Furlan MR, Jorge AOC, Junqueira JC. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. against *Candida* spp. Brazilian Dent J. 2010; 13(1): 4–9.

20. Akbari S. Antifungal activity of *Thymus valgaris* L. and *Origanum vulgare* L. against fluconazol-resistant and susceptible *Candida albicans* isolates. J Med Plants. 2007; 6(1): 53–62.

21. Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramanian A, Lopez-ribot JL. Effects of fluconazole, amphotericin b, and caspofungin on *Candida albicans* biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(7): 3591–3593.

22. Zhang Y, Cai C, Yang Y, Weng L, Wang L. Blocking of *Candida albicans* biofilm formation by cis-2-dodecenoic acid and trans-2-dodecenoic acid. J Med Microbiol. 2011; 60(Pt 11): 1643–1650.

23. Li DD, Zhao, LX, Mylonakis F, Hu GH, Zou Y, Huang TK,Yan L, Wang Y, Jiang YY. In vitro and in vivo activities of pterostilbene against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 2014; 58(4): 2344–2355.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 1, April 2016

Original Article

Relative quantitation of hyphae-specific gene *HWP1* expression in inhibition of *Candida albicans* biofilm

Alireza Khodavandi[1], Fahimeh Alizadeh[1], Mozhdeh Shahinipor[2]

[1]Assistant Professor, Department of Microbiology, Yasooj branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.
[2]MS.c., Department of Microbiology, Yasooj branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The incidence of candidiasis has been increased in immune compromised patients. Biofilm formation is counted as the main mechanisms of antibiotic resistance in *Candida albicans*. The aim of this study was to investigate the effects extractions of *Lamiaceae* family in quantification of HWP1 gene expression responsible for inhibition of biofilm formation in *C. albicans*.

Materials & Methods: In this cross- sectional study, the antifungal effect of aqueous and ethanolic extractions of leaf, stem and root of *Mentha spicata, Mentha pulegium* and *Thymus vulgar,* commercially purchased from Yasooj, was analyzed against *C. albicans* using disc diffusion and broth microdilution methods. The crystal violet colorimetric method, morphological response and expression pattern of hypha-specific gene *HWP1*were carried out to investigate the biofilm-inhibitory properties of the best plant extract tested.

Results: The data indicated that aqueous root extracts of *Thymus vulgaris* exhibits high antifungal activity against *C. albicans*. The aqueous extract of *Thymus vulgaris* root-treated cells exhibited significant reduction in biofilm growth. In addition, morphological observation of extract of *Thymus vulgaris* and fluconazole-treated cells confirmed decreases in fungal reproduction. Finally, aqueous root extractions of *Thymus vulgaris* was shown to down-regulate the expression of *HWP1*.

Conclusion: The results of this study showed the possible molecular mechanism of effects of aqueous root extraction of *Thymus vulgaris* root in *C. albicans* on biofilm formation.

Keywords: Biofilm, *Lamiaceae, HWP1* gene, *Candida albicans.*

Correspondence to: Fahimeh Alizadeh

Tel: +98 7433313930

E-mail: falizadeh@iauyasooj.ac.ir

Journal of Microbial World 2016, 9(1): 22-33.