

# Efficacy of Anethole on Biofilm Formation, Ergosterol Content, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida Glabrata* Isolated from Urinary System

Hamid Haji Gholamreza<sup>1</sup> , Aghil Sharifzadeh<sup>1</sup> , Hojjatollah Shokri<sup>2\*</sup> , Jalal Hasan<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Dept of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

<sup>3</sup> Dept of Comparative Bioscience, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

## Article Info

### Article type:

Research article

### Article History:

Received: May. 07, 2023

Received in revised form:

Jun. 01, 2023

Accepted: Nov. 25, 2023

Published Online: Feb. 03, 2025

### \* Correspondence to:

Hojjatollah Shokri

Dept of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Email:

hshokri@ausmt.ac.ir

## ABSTRACT

**Introduction:** Resistance to synthetic antifungal agents is a considerable health problem nowadays. Therefore, it is necessary to identify new antifungal molecules, such as natural products, to develop new therapeutic strategies to prevent and eradicate candidiasis. The aims of this work were to study the effect of anethole on growth, cell surface hydrophobicity, ergosterol content, and biofilm formation of *Candida glabrata* (*C. glabrata*) isolated from the urinary system.

**Materials & Methods:** The disc diffusion method (susceptibility to synthetic antifungals), the broth micro-dilution method (susceptibility to anethole), the MTT reduction assay (biofilm formation), the HPLC technique (ergosterol content), and adherence to n-hexadecane (cell surface hydrophobicity; CSH) were employed to determine the effect of anethole against *C. glabrata* isolates. Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism V.9, employing the one-way ANOVA test and pairwise comparisons using the Tukey test/post-hoc ANOVA at a significance level of 0.05.

**Results:** The range of MIC of *C. glabrata* was 1250-5000 µg/ml for anethole (3375±1375 µg/ml). The percentages of CSH were significantly in groups treated with MIC/2 (24.73±6.37%) and MIC/4 (29.01±6.61%) concentrations of anethole. Also, the percentage changes in membrane ergosterol were 23.35% at 0.125 µg/ml, 46.46% at 0.25 µg/ml, and 73.92% at 0.5 µg/ml of anethole, compared to the control that wasn't treated.

**Conclusion:** The results showed the effectiveness of anethole against planktonic and sessile cells of *C. glabrata* isolates and the interference with ergosterol content, CSH, and biofilm formation, reinforcing the potential of this natural compound as a natural antifungal.

**Keywords:** *Candida glabrata*, Anethole, Biofilm, Ergosterol, Hydrophobicity

**How to cite this paper:** Haji Gholamreza H, Sharifzadeh A, Shokri H, Hasan J. Efficacy of Anethole on Biofilm Formation, Ergosterol Content, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida Glabrata* Isolated from Urinary System. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;32(6):27-45.

## Introduction

*Candida* is a yeast organism that naturally exists in the surface epithelium of the gastrointestinal and genitourinary tracts of healthy individuals as part of the normal flora (1). However, if there is a disturbance in local or systemic immune function, *Candida* may overgrow, ultimately leading to candidiasis (2). Hospitalized patients commonly experience candiduria, a form of candidiasis. The presence of yeast (*Candida* species) in the urine may indicate that the patient is suffering from pyelonephritis or cystitis (3). It could also

signify involvement of the renal cortex due to disseminated candidiasis (3). However, candiduria might simply reflect colonization of yeast in the bladder, perineum, or an indwelling urinary catheter (3). The development of new pharmaceuticals derived from natural compounds to combat infections resistant to common antifungals, which exhibit fewer side effects, has garnered significant attention in recent times (4). Anethole (1-methoxy-4-isopropenylbenzene) is a phenylpropanoid that comes from plants (4). It is a main part of essential oils from plants like anise, fennel, and star anise (5). Previous studies have



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences, Volume 32, Issue 6, 2025

demonstrated the antifungal properties of anethole (13). The point of this study was to look into how anethole affects the growth, surface hydrophobicity, ergosterol content of the membrane, and biofilm formation by isolates of *Candida glabrata*.

## Methods

The study used a number of methods to look at how anethole affected *C. glabrata* isolates. These included the disc diffusion method to test resistance to synthetic antifungals, the broth micro-dilution method to test resistance to anethole, the MTT reduction assay to check biofilm formation, the HPLC method to check ergosterol levels, and adherence to n-hexadecane to check the hydrophobicity of the cell surface (CSH). Data analysis was conducted using GraphPad Prism V.9, applying the one-way ANOVA test along with pairwise comparisons through the Tukey test/post-hoc ANOVA, with a significance threshold set at 0.05.

## Results

The minimum inhibitory concentration (MIC) of *C. glabrata* for anethole ranged from 1250 to 5000 µg/ml, with an average of  $3375 \pm 1375$  µg/ml. The amount of CSH was much higher in the groups that were given anethole at half the MIC concentration ( $24.73 \pm 6.37\%$ ) and a quarter of the MIC concentration ( $29.01 \pm 6.61\%$ ). Additionally, the alterations in membrane ergosterol levels were recorded at 23.35%, 46.46%, and 73.92% for anethole concentrations of 0.125, 0.25, and 0.5 µg/ml, respectively, when compared to the untreated control group.

## Conclusion

It can be inferred that anethole demonstrates antifungal properties against *C. glabrata* strains and also has the capacity to diminish the surface hydrophobicity of *Candida* cells.

## Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology: Validation, Formal Analysis, Software, Investigation, Resources, Data Curation, Writing—Original Draft Preparation, Writing—Review & Editing, Visualization, Supervision, Project Administration: HH, AS, HS, JH.

## Ethical Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Tehran (300511/6/4). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

This research has been financially supported by the Research Vice Presidency at the University of Tehran.

## Acknowledgment

The authors of the article express their utmost gratitude to the esteemed experts of the Mycology Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, for their efforts in conducting the sampling.

## تأثیر آنتول روی تشکیل بیوفیلم، میزان ارگوسترول و آب‌گریزی سطح سلولی کاندیدا گلابراتای جدا شده از دستگاه ادراری

حمید حاجی غلامرضا<sup>۱</sup>، عقیل شریف‌زاده<sup>۱</sup>، حجت اله شکر<sup>۲\*</sup>، جلال حسن<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

<sup>۳</sup> گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**مقدمه:** در حال حاضر، مقاومت به داروهای ضدقارچی شیمیایی مشکل بهداشتی بزرگی است؛ بنابراین، شناسایی مولکول‌های جدید ضدقارچی مانند فرآورده‌های طبیعی برای ایجاد راهبردهای جدید درمانی به منظور پیشگیری و حذف کاندیدازایس ضروری است. اهداف این کار شامل مطالعه تأثیر آنتول روی رشد، آب‌گریزی سطح سلولی، میزان ارگوسترول و تشکیل بیوفیلم کاندیدا گلابراتای جدا شده از دستگاه ادراری است.

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۷

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

**مواد و روش‌ها:** روش انتشار دیسک (حساسیت به داروهای ضدقارچی شیمیایی)، روش میکرودايلوشن برات (حساسیت به آنتول)، سنجش کاهش MTT (تشکیل بیوفیلم)، تکنیک HPLC (میزان ارگوسترول) و اتصال به n-هگزادکان (آب‌گریزی سطح سلولی) برای تعیین تأثیر آنتول برابر جدایه‌های کاندیدا گلابراتا به کار گرفته شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism vol.9.0.0.121 و آزمون One-Way ANOVA و آزمون‌های دوتایی Tukey Test / Post-hoc ANOVA در سطح معنادار ۰/۰۵ انجام گرفت.

نویسنده مسئول:

حجت اله شکر

**یافته‌های پژوهش:** دامنه حداقل غلظت مهارکنندگی کاندیدا گلابراتا حدود ۱۲۵۰-۳۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برای آنتول بود (MIC/۷۵±۳۴۳/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر). درصدهای آب‌گریزی سطح سلولی به‌طور معناداری در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های MIC/2 (۲۴/۷۳±۶/۳۷ درصد) و MIC/4 (۲۹/۰۱±۶/۶۱ درصد) آنتول بودند؛ همچنین تغییرات درصدی در میزان ارگوسترول غشایی حدود ۲۳/۳۵، ۴۶/۴۶ و ۷۳/۹۲ درصد در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتول در مقایسه با گروه شاهد غیرتیمار بود.

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

Email:

hshokri@ausmt.ac.ir

**بحث و نتیجه‌گیری:** این نتایج اثربخشی آنتول برابر سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلمی جدایه‌های کاندیدا گلابراتا و تداخل با میزان ارگوسترول، آب‌گریزی سطح سلولی و تشکیل بیوفیلم را نشان دادند که بیان‌کننده توانایی بالقوه این ترکیب به‌عنوان یک ضدقارچ طبیعی است.

**واژه‌های کلیدی:** کاندیدا گلابراتا، آنتول، بیوفیلم، ارگوسترول، آب‌گریزی سطح سلولی

**استناد:** حاجی غلامرضا حمید، شریف‌زاده عقیل، شکر حجت اله، حسن جلال. تأثیر آنتول روی تشکیل بیوفیلم، میزان ارگوسترول و آب‌گریزی سطح سلولی کاندیدا گلابراتای جدا شده از دستگاه ادراری. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۳؛ ۳۲(۶): ۴۵-۲۷.

## مقدمه

عفونتهای قارچی به عنوان یک مشکل بهداشتی جدی در نظر گرفته میشوند، به ویژه در افرادی که دارای نقص در دستگاه ایمنی بدن هستند. در دو دهه گذشته، عفونتهای قارچی به ویژه کاندیدیازیس افزایش فراوانی داشته است. این فراوانی بالا به عواملی از جمله افزایش تعداد بیماران مبتلا به ایدز، دیابت و سرطان مرتبط است (۱).

کاندیدا ارگانیسم مخمری است که در اپیتلیوم سطحی دستگاه گوارش و دستگاه ادراری- تناسلی انسانهای سالم به عنوان فلور طبیعی وجود دارد. در صورت اختلال در دستگاه ایمنی موضعی یا سیستمیک، ممکن است کاندیدا رشد بیش از حد داشته باشد که در نهایت، به کاندیدیازیس منجر شود. بیش از ۱۵ گونه کاندیدای بیماری‌زا شناخته شده است که شایعترین آنها شامل *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* هستند (۲).

کاندیدوریا شکلی از کاندیدیازیس است که اغلب در بیماران بستری مشاهده میگردد. یافتن مخمر (گونه‌های کاندیدا) در ادرار می‌تواند به معنای ابتلای بیمار به پیلونفریت یا سیستیت باشد؛ همچنین میتواند به معنی درگیری قشر کلیه به علت کاندیدیازیس منتشر باشد. البته وجود کاندیدوریا ممکن است تنها نشان‌دهنده کلونیزاسیون مخمر در مثانه، پرینه یا کاتتر ثابت ادراری باشد. بیشتر قریب به اتفاق بیماران مبتلا به کاندیدوریا هیچ علامتی را نشان نمیدهند که می‌تواند نشان‌دهنده وجود عفونت دستگاه ادراری باشد (۳).

به طور کلی، میزان بروز کاندیدوریا با توجه به سن بیمار و شرایط بیمارستان متفاوت است، به طوری که در واحدهای مراقبت ویژه و سوختگی و در میان افراد مسن رایجتر است. از عوامل اثرگذار در ابتلا به کاندیدوریا در بزرگسالان می‌توان جنسیت زن، استفاده از دستگاههای ادراری ثابت، ناهنجاریهای مادرزادی دستگاه ادراری، جراحی محوطه شکمی، درمان با آنتیبیوتیکهای وسیع‌الطیف و دیابت را نام برد (۴).

چسبندگی مخمر به سلول‌ها و بافتهای میزبان اولین رویداد برای شروع عفونت است. علاوه بر این، تماس سطحی

قارچ میتواند رفتارهای مختلف سلولی از جمله تشکیل بیوفیلم را تحریک کند که به طور قوی با کاندیدیازیس مرتبط است (۵). یک بیوفیلم اغلب از سلول‌های چسبنده و ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده است و تشکیل آن با پیوستن سلول‌های پلانکتونی متحرک به سطوح اندوتلیوم انسان یا ایمپلنتهای پزشکی آغاز میشود (۶). تشکیل بیوفیلم یک عامل حداث قارچ محسوب میگردد؛ زیرا ممکن است به مقاومت ضدقارچی و محافظت از سلول‌های قارچی در برابر پاسخهای ایمنی منجر شود. تشکیل بیوفیلم توسط گونه‌های کاندیدا میتواند مسئول کلونیزاسیون بهتر میکروارگانیسم در بدن و وسایل پزشکی باشد که ممکن است به مشکلاتی در ریشه‌کنی این میکروارگانیسمها از خون منجر گردد (۷).

فرایند چسبندگی کاندیدا نسبتاً پیچیده و وابسته به هردو عامل بیولوژیکی و غیربیولوژیکی است. آب‌گریزی (هیدروفوبیسیته) که مربوط به دیواره سلولی است، یک عامل غیر بیولوژیکی حیاتی در چسبندگی کاندیدا در نظر گرفته میشود (۴). اپولا و سامارانایاک (۸) نشان دادند که مخمرهای آب‌گریز، نسبت به آب‌دوست‌ها، حداث بیشتری دارند. کلوتر و همکاران (۹) رابطه‌ای میان افزایش چسبندگی به سطوح پلاستیکی و آب‌گریزی گزارش کردند. پژوهشگران همبستگی آماری مثبت معناداری میان آب‌گریزی و چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال میزبان و سطح آکرلیک پروتز گزارش کرده‌اند (۱۰).

امروزه با توجه به شیوع بیشتر عفونت‌های کاندیدایی غیر آلیکسنی و بروز مقاومت‌های اکتسابی در گونه‌هایی مانند *کاندیدا گلابراتا*، پژوهشگران به دنبال یافتن راهکارهای درمانی جدید برای غلبه بر عفونت‌ها و مقاومت‌های ناشی از آنها هستند. به این منظور، یکی از روش‌های درمانی مورد توجه پژوهشگران استفاده از ترکیبات گیاهی با خواص ضد میکروبی مانند ترکیبات فنلی و ترپنوئیدها است (۱۱). برخی پژوهشگران توانایی ضد بیوفیلم کاندیدایی توسط ترکیبات گیاهی مانند فلاونوئیدها و عطرماه‌ها (۱۲) را نشان داده‌اند. تولید داروهای جدید از ترکیبات طبیعی برای کنترل عفونتهای مقاوم در برابر ضدقارچهای رایج که عوارض جانبی

میکرودایلوشن انجام گرفته است.

الف. انتشار دیسک: آزمایش حساسیت ضدقارچی جدایه‌های *کاندیدا گلابراتا* در برابر دیسک‌های فلوکونازول، وریکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول و پوساکونازول (شرکت روسکو، دانمارک) به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعمل استاندارد CLSI-M44-A2 انجام شد (۱۴). بدین منظور، ابتدا جدایه‌های *کاندیدا گلابراتا* روی محیط سابورو دکستروز آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت گردید؛ سپس مخمرها به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک استریل انتقال و به‌طور کامل ورتکس شد تا سوسپانسیونی یکنواخت به‌دست آمد. جذب نوری (OD) سوسپانسیون بالا در طول موج ۶۲۵ نانومتر به ۰/۰۸ تا ۰/۱ رسانده شد تا کدورت برابر با استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (cfu/ml 106) به‌دست آید. در ادامه، یک سواب پنبه‌ای استریل در سوسپانسیون مخمری غوطه‌ور گردید و روی سطح پلیت با قطر ۹۰ میلی‌متر حاوی مولر هیتون آگار حاوی ۲ درصد گلوکز و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر متیلن بلو (به‌منظور مشخص شدن بهتر هاله‌ی ممانعت از رشد)، به‌صورت خطی در همه‌ی جهات کشت داده و بدون حرکت در دمای اتاق به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا سوسپانسیون به‌طور کامل جذب محیط کشت گردد.

به‌منظور تعیین الگوهای حساسیت جدایه‌های *کاندیدا گلابراتا*ی مطالعه‌شده، دیسک‌های استاندارد داروهای ذکر شده روی محیط مولر هیتون قرار داده شدند و هاله‌ی مهار رشد اطراف دیسک‌ها به دنبال آنکوباسیون پلیتها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردیدند. حساسیت جدایه‌های *کاندیدا گلابراتا*ی مطالعه‌شده بر اساس معیارهای تفسیری هاله‌ی ممانعت از رشد ارزیابی شدند.

ب. براث میکرودایلوشن: تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MFC) برای جدایه‌های *کاندیدا گلابراتا* در برابر آنتول به روش رقت‌سازی در حجم کم (براث میکرودایلوشن)، مطابق با دستورالعمل استاندارد CLSI- M27-A3 انجام گردید (۱۵). بدین منظور، سوسپانسیون همگنی از مخمر (یک میلیون سلول در میلی‌لیتر)

کمتری دارند، در حال حاضر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آنتول (۱-متوکسی-۴-ایزوپروپینیل-بزن) یک فنیل پروپانویید گیاهی است که یکی از اجزای اصلی عطرهای گیاهی مانند آیسون، رازیانه و بادیان رومی را تشکیل می‌دهد. آثار ضدقارچی آنتول در مطالعات پیشین ثابت شده است (۱۳). هدف این مطالعه بررسی اثر آنتول بر رشد، آب‌گریزی سطح سلولی، میزان ارگوسترول غشایی و تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های *کاندیدا گلابراتا* است.

## مواد و روش‌ها

سویه‌های مخمری: در این مطالعه (با کد اخلاق ۳۰۰۵۱۱/۶/۴)، از ۱۰ جدایه‌ی *کاندیدا گلابراتا*ی ذخیره‌شده در بانک قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (۹) جدایه‌ی ادراری و ۱ جدایه‌ی استاندارد (ATCC 90030) استفاده گردید. همه‌ی جدایه‌های مطالعه‌شده با استفاده از کیت RapID TMYeast Plus System (رمل، آمریکا) تشخیص داده شد و توالی ژنتیکی آن‌ها تعیین و کد ژنتیکی برای آن‌ها در سامانه NCBI تعیین گردید. این جدایه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در محیط عصاره‌ی مخمر حاوی پپتون و دکستروز (YPD) (سیگما، آمریکا)، حاوی ۲۰ درصد گلیسرول نگهداری شدند. برای استخراج سلول و آماده‌سازی برای کشت، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از هر جدایه به ۵ میلی‌لیتر محیط مایع YPD اضافه گردید. برای فعال‌سازی مجدد و تأیید زنده ماندن، سلول‌های *کاندیدا گلابراتا* در یک شیکر در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلول در سطح محیط کشت سابورو دکستروز آگار (مرک، آلمان) تلقیح گردید.

ترکیبات دارویی: دیسک‌های فلوکونازول، ایتراکونازول، وریکونازول، کتوکونازول و پوساکونازول (روسکو، دانمارک) برای این مطالعه انتخاب شدند. آنتول (سیگما، آمریکا) به‌عنوان ترکیب طبیعی در اتانول ۷۰ درجه حل گردید.

آزمایش‌های حساسیت ضدقارچی: آزمایش‌های حساسیت ضدقارچی به دو روش انتشار دیسک و براث

با جذب نوری ۰/۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر به عنوان محلول استوک تهیه شد. بر اساس دستورالعمل CLSI، برای رسیدن به سوسپانسیونی با غلظت ۲۵۰۰ سلول مخمر در میلی لیتر به منظور تلقیح به گودها، از محلول استوک به دست آمده در محیط RPMI 1640 حاوی بافر MOPS، ابتدا رقت ۱۰۰/۱ و سپس از این محلول رقت ۲۰/۱ تهیه گردید. برای تهیه رقت سریالی آنتول، ابتدا بیشترین رقت آنتول (۲۰۰۰۰ پی پی ام) با استفاده از حلال اتانول (حجم نهایی اتانول در محلول ۱۰ درصد بود) در محیط RPMI 1640 تهیه و در ادامه، رقت های متوالی دو برابر آنتول در گودهای پلیت ۹۶ خانه تهیه شد؛ سپس ۲۰۰ میکرولیتر از رقت ۲۰۰۰۰ پی پی ام به گوده های ستون اول پلیت ۹۶ خانه منتقل و در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به گودهای ستون دوم منتقل گردید که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI 1640 بود و به خوبی مخلوط شد. این عمل رقیق کردن به شکل متوالی تا ستون ۱۰ پلیت ۹۶ خانه ادامه یافت و سپس از ستون ۱۰ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بیرون ریخته شد، بدین ترتیب رقت های متوالی دو برابر بین ۳۹/۰۵ و ۲۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتول تهیه گردید. گفتنی است، ستون ۱۱ به عنوان کنترل مثبت و عاری از ماده مؤثر گیاهی و ستون ۱۲ به عنوان کنترل منفی و عاری از مخمر در نظر گرفته شدند؛ سپس به هر گوده ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری با غلظت ۲۵۰۰ سلول مخمر در میلی لیتر اضافه گردید، به طوری که در پایان، هر گوده پلیت ۹۶ خانه حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آنتول و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری بود. پلیتها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و پس از آن، MIC آنتول به صورت چشمی (گوده بدون کدورت با توجه به کنترل) و MFC آنتول از طریق کشت گودهای MIC و دو رقت بالاتر از آن در محیط سابورو دکستروز آگار و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت تعیین گردید.

ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه های *کاندیدا گلابراتا*: برای آماده سازی سوسپانسیون استاندارد مخمری در مرحله فاز نمایی رشد به منظور تشکیل بیوفیلم، ابتدا سلول های *کاندیدا گلابراتا* روی محیط سابورو دکستروز

آگار (SDA) به صورت خطی کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند؛ سپس یک کلنی کامل از مخمر رشد یافته به داخل محیط کشت یست نیتروژن بیس (YNB) (حاوی ۵۰ تا ۱۰۰ میلی مول گلوکز و pH=7) انتقال داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در روتاری شیکر با دور 75 rpm در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا همه مخمرها در فاز رشد نمایی قرار گیرند. در ادامه، محیط بالا در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و در دور 3000 g سانتریفیوژ گردید؛ سپس محیط رویی رسوب مخمری خالی و ۲ مرتبه با فسفات بافر استریل شستشو داده شد. هر بار روی رسوب حدود ۲۰ میلی لیتر فسفات بافر با دمای ۴ درجه سانتی گراد ریخته و خوب ورتکس گردید. این مرحله ۲ مرتبه تکرار شد تا سلول های مخمری به خوبی شستشو داده شوند؛ سپس روی رسوب محیط YNB که به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رسیده بود، ریخته شد و غلظت نهایی با استفاده از لام هماسیتومتر معادل  $2/5 \times 10^6$  سلول در هر میلی لیتر تنظیم گردید. گودهای مدنظر از پلیتهای ۹۶ خانهای کشت سلول به منظور آماده سازی برای تشکیل بیوفیلم، به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، با ۱۰۰ میکرولیتر فسفات بافر (۵۰ درصد در فسفات بافر) پوشانده شد و پس از آن گوده ها یک مرتبه با ۲۰۰ میکرولیتر فسفات بافر استریل شستشو گردید.

ارزیابی تشکیل بیوفیلم و اثر آنتول بر آن به روش MTT Reduction assay انجام شد (۱۶). در این روش، نمک قابل حل و زرد رنگ ترازولیوم به وسیله سلول هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند، بر اساس میزان فعالیت آنزیم های دهیدروژناز میتوکندریایی این سلول ها مانند NADH و NADPH احیا می گردند و به کریستالهای بنفش فورمازان تبدیل میشوند که نامحلول در آب هستند. در مرحله بعد، این کریستالها توسط ترکیبات خاصی به صورت محلول در می آید و رنگ ایجاد شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده میشود. مقدار کریستالهای فورمازان و در نتیجه، مقدار رنگ خوانده شده توسط دستگاه به عنوان مقیاسی از تعداد میتوکندریها است و بنابراین، مشخص کننده تعداد سلول های

گردید و نمونه‌ها رسوب داده شدند و وزن رسوب ارگانیک برای هر نمونه محاسبه گردید. در ادامه، به فالكونها ۱۰ میلی لیتر هیدرواکسید پتاسیم ۰/۵ مولار اضافه شد. درب لوله‌ها محکم بسته شد و به مدت ۴۵ دقیقه در یک حمام آب ۷۵ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردیدند. پس از آن، لوله‌ها با آب خنک شدند و سپس ۲ میلی‌لیتر آب و به دنبال آن ۲ میلی‌لیتر هگزان اضافه گردید. فالكونهاى حاوی نمونه، آب و هگزان به مدت ۵ دقیقه تحت امواج فراصوت (سونیکه) قرار گرفتند و سپس به مدت چند دقیقه، به صورت دستی به شدت تکان داده شدند. فالكونها ۲۰ دقیقه به صورت ثابت در دمای آزمایشگاه برای جدا شدن فازهای مختلف قرار گرفتند و پس از آن، فاز بالایی را که حاوی ارگوسترول استخراجی بود، به دقت جمع‌آوری و حجم جدا شده یادداشت گردید و این فاز وارد لوله‌های مخصوص دستگاه HPLC شد؛ سپس مخلوط استخراج شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک گردد. نمونه‌های خشک شده برای ارزیابی در ۱ میلی لیتر متانول حل شد و در نهایت، نمونه‌ها به دستگاه تزریق گردید. میزان ارگوسترول در نمونه‌ها و کنترل با استفاده از دستگاه HPLC (UV) با مشخصات ستون C18 5µm, 25 x 4.6mm و فاز متحرک شامل ۷۰ درصد استونیتریل و ۳۰ درصد متانول و به صورت ایزوکراتیک، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارساز مرئی-فرابنفش و در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همه آزمونهای بالا سه مرتبه به شکل مستقل تکرار گردید (۱۷).

برای اعتبارسنجی ارگوسترول سنجش شده، منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظتهای بین صفر تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) از ارگوسترول در متانول رسم شد و معادله کالیبراسیون با فرمول  $\text{Area}=80.1\text{C}-30$  و ضریب خطی بودن  $r^2=0.9998$  به دست آمد. به منظور ارزیابی کارایی روش بالا، مؤلفه‌های درصد خطا (صحت)، درصد انحراف استاندارد (دقت) و حد تشخیص ارزیابی گردیدند و به ترتیب مقادیر ۵ درصد، ۳ درصد و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. در نهایت، با استفاده

زنده در نمونه است. بر اساس این، در این روش میزان احیای نمک تترازولیوم متناسب با وزن خشک مخمرهاست. به منظور انجام آزمایش، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون prewarmed MTT (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پودر MTT در فسفات بافر حاوی ۰/۱ درصد گلوکز که به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود) به هریک از گوده‌های پلیتهای تیمار شده با غلظتهای متوالی دو برابر ۴۰۰۰۰- ۳۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتول و پلیتهای کنترل (برای ارزیابی قدرت تشکیل بیوفیلم) اضافه شد؛ سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و پس از آن محلول MTT آسپیره گردید و گوده‌ها دو مرتبه به آرامی با فسفات بافر استریل شستشو شد؛ سپس به منظور حل کردن کریستالهای فورمازان ایجاد شده، ۲۰۰ میکرولیتر اسید ایزوپروپیل الکل به گوده‌ها اضافه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بالا به پلیت ۹۶ خانه‌ای جدید منتقل و در نهایت، جذب نوری در Microplate Readers و طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد (برای هر نمونه ۳ تکرار مستقل در نظر گرفته شد). در پایان، درصد اثر مهارى آنتول بر تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های کاندیدا گلابراتا از رابطه زیر به دست آمد:

درصد اثر مهار کنندگی = (جذب نوری نمونه تقسیم بر جذب نوری کنترل - ۱) × ۱۰۰ درصد

تعیین میزان ارگوسترول غشایی در جدایه‌های کاندیدا گلابراتای تیمار شده با آنتول: به منظور ارزیابی اثر آنتول بر ارگوسترول غشایی جدایه‌های کاندیدا گلابراتا، ابتدا یک کلنی منفرد از کشت ۱۸ ساعته جدایه‌ها به فالكونهاى حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط سابورو دکستروز آگار منتقل گردید. برای هر جدایه یک فالكون به عنوان کنترل بدون آنتول و سه فالكون برای تیمار غلظتهای MIC/2, MIC/4 و MIC/8 آنتول و یک فالكون برای تیمار با فلوکونازول در نظر گرفته شد. نمونه‌های بالا به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور 150 rpm قرار گرفتند و پس از آن با سانتریفیوژ در دور ۲۷۰۰ دور در دقیقه (g 856) به مدت پنج دقیقه نمونه‌ها رسوب داده شدند و پس از یک بار شستشو با فسفات بافر، مجدداً سانتریفیوژ انجام

از رابطه زیر غلظت ارگسترول در نمونه محاسبه شد:

$$C_f = \frac{C_m V_m}{V_H m}$$

که  $C_f$  غلظت نهایی ارگسترول غشایی برحسب میلی گرم بر گرم،  $C_m$  غلظت ارگسترول در محلول متانولی برحسب میکروگرم در میلیلیتر،  $V_m$  حجم متانول (یک میلی لیتر) و  $V_H$  حجم هگزان جداشده برحسب میلی لیتر و  $m$  جرم نمونه برحسب گرم هستند.

تعیین آب گریزی (هیدروفوبیسیته) سطحی در جدایه های *کاندیدا گلابراتا* تیمار شده با آنتول: هیدروفوبیسیته سطحی سلول های پلانکتونی تیمار شده با آنتول و تیمار نشده بر اساس روش آیل و همکاران (۱۸) و با استفاده از روش biphasic hydrocarbon/aqueous تعیین شد. بدین منظور، ابتدا جدایه های *کاندیدا گلابراتا* در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط ساپورو دکستروز آگار، به مدت ۲۴ ساعت کشت گردیدند و در ادامه، سوسپانسیون مخمری در فسفات بافر با جذب نوری معادل ۰/۶-۰/۴ در طول موج ۶۰۰ نانومتر که شامل ۱۰۷ سلول در هر میلی لیتر بود، تهیه و به عنوان A0 در

نظر گرفته شد. برای هر جدایه ۳ لوله برای غلظتهای MIC/4، MIC/2 و MIC/8 آنتول و یک لوله به عنوان کنترل (بدون تیمار) در نظر گرفته شدند. هر لوله حاوی ۴ میلیلیتر سوسپانسیون مخمری با غلظت ۱۰۷ سلول در هر میلیلیتر در محیط YNB حاوی ۵۰ میلی مول گلوکز و غلظتهای MIC/4، MIC/2 و MIC/8 آنتول بود. لوله ها یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، روی انکوباتور شیکر با دور ۱۵۰ گذاشته شدند و پس از آن، در دور g12000 سانتریفیوژ گردیدند و یک بار با فسفات بافر شستشو داده شدند؛ سپس به هر لوله ۳ میلی لیتر فسفات بافر و ۲۵۰ میکرو لیتر n-hexadecane اضافه گردید. لوله ها خوب ورتکس شدند و ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از آن، لوله ها دو مرتبه به مدت ۴۰ ثانیه ورتکس گردیدند و بین هر ورتکس پنج دقیقه فاصله داده شد. لوله ها ۱۵ دقیقه بدون حرکت در دمای آزمایشگاه گذاشته شدند تا دو فاز جدا گردد؛ سپس جذب نوری فاز آبی (فاز زیرین) در ۶۰۰ نانومتر خوانده و اعداد حاصله به عنوان A1 در نظر گرفته شد. در پایان، هیدروفوبیسیته سطحی در گروه های تیمار و کنترل بر اساس رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{CHS } \% = 1 - \frac{A_1}{A_0} \times 100 \text{ (درصد هیدروفوبیسیته سطحی)}$$

گردید. همان گونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، ۳۰ درصد از جدایه های *کاندیدا گلابراتا* نسبت به داروهای فلوکونازول، کتوکونازول و پوساکونازول مقاوم بودند و سایر آنها الگوی حساس یا حساس وابسته به دوز را از خود نشان دادند. بیشترین و کمترین میزان مقاومت در جدایه های مطالعه شده به ترتیب نسبت به داروهای ایتراکونازول (۴۰ درصد) و وریکونازول (۲۰ درصد) مشاهده گردید. حساسیت، حساسیت وابسته به دوز و مقاومت جدایه های مختلف *کاندیدا گلابراتا* و سویه استاندارد بر اساس دستورالعمل CLSI- M44-A2 مشخص شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با نرم افزار GraphPad Prism vol.9.0.0.121 و آزمون One-Way ANOVA و آزمون های دوتایی Tukey Test / Post-hoc ANOVA در سطح معنادار ۰/۰۵ انجام گرفت.

### یافته های پژوهش

الگوی حساسیت جدایه های *کاندیدا گلابراتا* نسبت به داروهای ضدقارچی استاندارد: در این مطالعه، ابتدا الگوی حساسیت جدایه های ادراری *کاندیدا گلابراتا* نسبت به داروهای ضدقارچی استاندارد به روش انتشار دیسک ارزیابی

جدول شماره ۱. الگوهای حساسیت ضدقارچی جدایه های *کاندیدا گلابراتا*

الگوی حساسیت ضدقارچی			جدایه های
مقاوم	حساس وابسته به دوز	حساس	<i>کاندیدا گلابراتا</i>



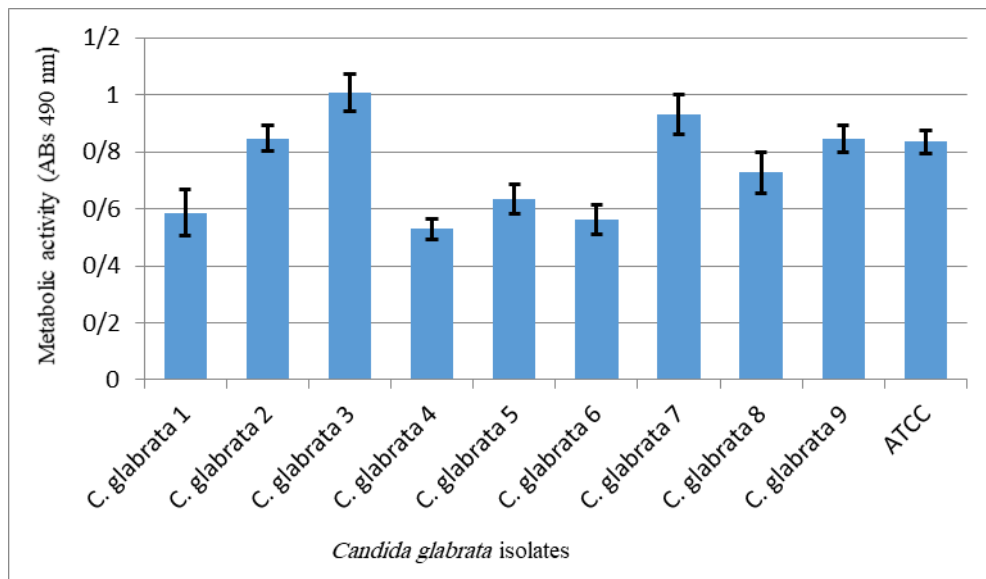
فلوکونازول، وریکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	-	-	کاندیدایا گلابراتا ۱
-	-	فلوکونازول، وریکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	کاندیدایا گلابراتا ۲
فلوکونازول، وریکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	-	-	کاندیدایا گلابراتا ۳
ایتراکونازول	-	فلوکونازول، وریکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	کاندیدایا گلابراتا ۴
-	فلوکونازول، پوساکونازول، ایتراکونازول	وریکونازول، کتوکونازول	کاندیدایا گلابراتا ۵
فلوکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	-	وریکونازول	کاندیدایا گلابراتا ۶
-	فلوکونازول، کتوکونازول، ایتراکونازول	وریکونازول، پوساکونازول	کاندیدایا گلابراتا ۷
-	ایتراکونازول	فلوکونازول، وریکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	کاندیدایا گلابراتا ۸
-	فلوکونازول، ایتراکونازول	وریکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	کاندیدایا گلابراتا ۹
-	-	فلوکونازول، وریکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول، پوساکونازول	ATCC

جدایه‌های کاندیدایا گلابراتا با استفاده از روش احیای نمک تترازولیوم ارزیابی گردید. همان گونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، همه جدایه‌های کاندیدایا گلابراتا در شرایط برون‌تنی، توانایی تشکیل بیوفیلم را از خود نشان دادند؛ اما توده بیوفیلم ایجاد شده وابسته به نوع جدایه است، به طوری که جدایه شماره ۳ (میانگین جذب نوری  $0.064 \pm 0.01$ ) و جدایه شماره ۷ (میانگین جذب نوری  $0.072 \pm 0.009$ ) بیشترین توده بیوفیلم را تشکیل دادند و جدایه‌های شماره ۴ و ۵ (میانگین جذب نوری به ترتیب  $0.037 \pm 0.005$  و

در میان جدایه‌های کاندیدایا گلابراتا، جدایه‌های یک و سه نسبت به همه داروها مقاوم بودند، در حالی که جدایه‌های دو و استاندارد نسبت به همه داروهای مطالعه شده حساس ارزیابی شدند؛ همچنین نتایج نشان داد که ۶۰ درصد از جدایه‌ها هیچ گونه مقاومتی به داروهای مطالعه شده نداشتند و همگی الگوی حساس یا حساس وابسته به دوز را از خود نشان دادند. در این مطالعه، حساسیت متوسط (حساس وابسته به دوز) به ویژه برای داروهای ایتراکونازول و فلوکونازول دیده شد. توانایی تشکیل بیوفیلم: توانایی تشکیل بیوفیلم در

مقاومت جدایه‌ها و قدرت آن‌ها در تشکیل بیوفیلم مشاهده نشد.

کمترین توانایی تشکیل بیوفیلم را از خود نشان دادند. در این مطالعه، توانایی معناداری میان الگوی



شکل شماره ۱. تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های کاندیدا گلابراتا

میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. از سویی، حداقل غلظت کشته‌آنتول نیز بین ۱۲۵۰-۲۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود (میانگین ۲۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر). میانگین حداقل غلظت مهارکننده سلول‌های بیوفیلمی (SMIC) آنتول علیه جدایه‌های کاندیدا گلابراتا معادل ۲۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در دامنه بین ۱۲۵۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (جدول شماره ۲).

فعالیت ضدقارچی علیه مخمرهای پلانکتونی و بیوفیلمی: حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC)، حداقل غلظت کشته‌کننده (MFC) و حداقل غلظت مهارکننده سلول‌های بیوفیلمی (SMIC) ترکیب مونوترپنی آنتول علیه جدایه‌های کاندیدا گلابراتا ارزیابی گردید. همان‌گونه که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است، حداقل غلظت ممانعت از رشد آنتول در میان جدایه‌های کاندیدا گلابراتا بین ۱۲۵۰-۳۱۲/۵

جدول شماره ۲. حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشته‌آنتول در سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلمی کاندیدا گلابراتا

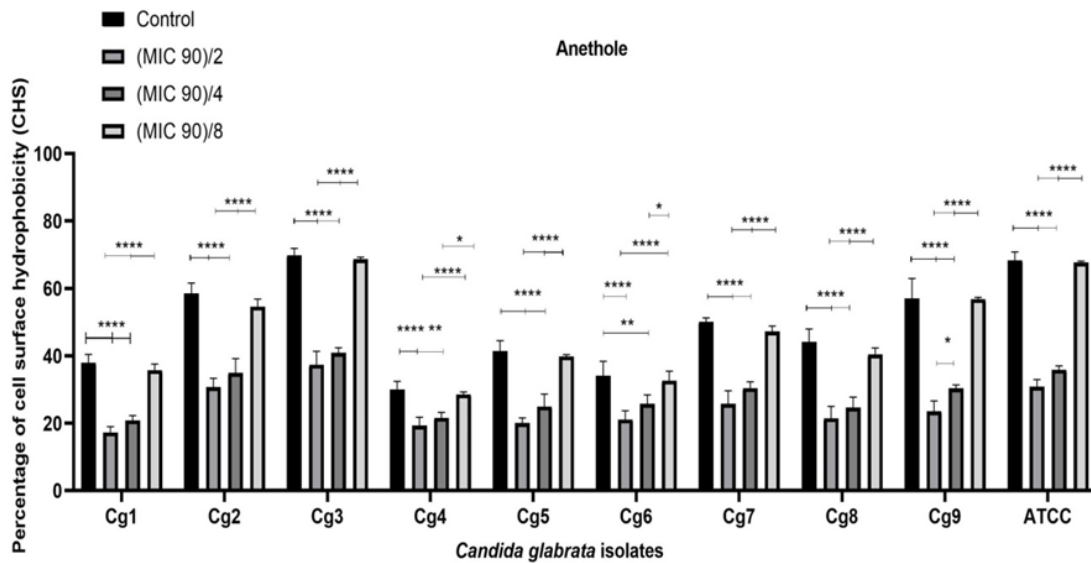
آنتول			جدایه‌های کاندیدا گلابراتا
میکروگرم در میلی‌لیتر			
MIC <sup>a</sup>	MFC <sup>b</sup>	SMIC <sup>c</sup>	
۶۲۵	۲۵۰۰	۱۲۵۰	کاندیدا گلابراتا ۱
۶۲۵	۲۵۰۰	۲۵۰۰	کاندیدا گلابراتا ۲
۶۲۵	۲۵۰۰	۵۰۰۰	کاندیدا گلابراتا ۳
۱۲۵۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	کاندیدا گلابراتا ۴
۱۲۵۰	۲۵۰۰	۵۰۰۰	کاندیدا گلابراتا ۵
۶۲۵	۱۲۵۰	۱۲۵۰	کاندیدا گلابراتا ۶
۱۲۵۰	۲۵۰۰	۵۰۰۰	کاندیدا گلابراتا ۷
۳۱۲/۵	۱۲۵۰	۱۲۵۰	کاندیدا گلابراتا ۸
۱۲۵۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	کاندیدا گلابراتا ۹

۶۲۵	۱۲۵۰	۱۲۵۰	ATCC
-----	------	------	------

حداقل غلظت ممانعت از رشد آنتول روی سلول‌های پلانکتونیک؛ b. حداقل غلظت کشنده آنتول روی سلول‌های پلانکتونیک؛ c. حداقل غلظت ممانعت از رشد آنتول بر سلول‌های بیوفیلمی (ارزیابی از طریق MTT Reduction assay)

های کاندیدا گلابراتا معادل  $49/11 \pm 13/96$  درصد محاسبه گردید (میانگین درصد هیدروفوبیسیته در گروه کنترل). مقادیر  $29/96 \pm 2/5$  و  $69/81 \pm 2/07$  درصد به ترتیب کمترین و بیشترین میزان هیدروفوبیسیته سطحی در گروه کنترل بودند.

اثر آنتول بر آبگریزی سطحی جدایه‌های کاندیدا گلابراتای تیمار شده با آنتول: درصد هیدروفوبیسیته سطحی جدایه‌های کاندیدا گلابراتا در مواجهه با آنتول با استفاده از روش چسبندگی به هیدروکربن‌ها (ان هگزادکان) محاسبه گردید. همان‌گونه که در شکل شماره ۲ و جدول شماره ۳ نشان داده شده است، میانگین هیدروفوبیسیته سطحی جدایه



شکل شماره ۲. اثر غلظتهای subMIC آنتول بر درصد آبگریزی سطحی سلول‌های کاندیدا گلابراتا در مقایسه با گروه کنترل

جدول شماره ۳. میانگین درصد آبگریزی سطحی سلول‌های کاندیدا گلابراتا در تیمار با غلظتهای subMIC آنتول در مقایسه با گروه کنترل

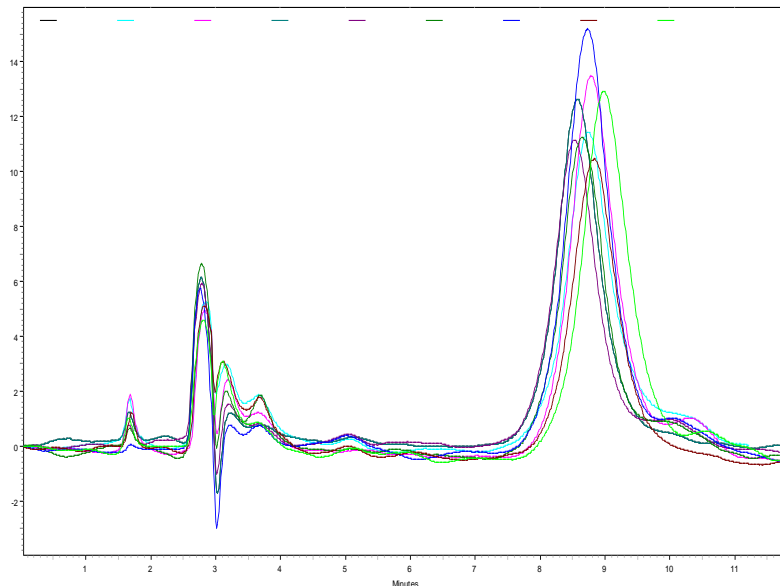
آب‌گریزی $\pm$ انحراف معیار	آنتول			جدایه‌های کاندیدا گلابراتا
	کنترل	MIC/8	MIC/4	
$37/90 \pm 2/54$	$35/72 \pm 1/88$	$20/82 \pm 1/44$	$17/27 \pm 1/71$	کاندیدای گلابراتا ۱
$58/54 \pm 3/04$	$54/56 \pm 2/3$	$34/89 \pm 4/3$	$30/73 \pm 2/6$	کاندیدای گلابراتا ۲
$69/81 \pm 2/07$	$68/70 \pm 0/61$	$40/83 \pm 1/58$	$37/34 \pm 4/01$	کاندیدای گلابراتا ۳
$29/96 \pm 2/5$	$28/54 \pm 0/73$	$21/62 \pm 1/56$	$19/3 \pm 2/5$	کاندیدای گلابراتا ۴
$41/34 \pm 3/15$	$39/80 \pm 0/56$	$24/95 \pm 3/71$	$20/04 \pm 1/55$	کاندیدای گلابراتا ۵
$34/13 \pm 4/24$	$32/64 \pm 2/81$	$25/73 \pm 2/65$	$21/12 \pm 2/59$	کاندیدای گلابراتا ۶
$50/04 \pm 1/21$	$47/16 \pm 1/72$	$30/38 \pm 1/90$	$25/77 \pm 3/86$	کاندیدای گلابراتا ۷
$44/06 \pm 3/93$	$40/34 \pm 2$	$24/65 \pm 3/06$	$21/45 \pm 3/52$	کاندیدای گلابراتا ۸
$57/03 \pm 5/64$	$56/78 \pm 0/58$	$30/35 \pm 0/01$	$23/48 \pm 3/12$	کاندیدای گلابراتا ۹

ATCC	۳۰/۸±۲/۱۸	۳۵/۸۷±۱/۱۳	۶۷/۶۶±۰/۴۶	۶۸/۳۱±۲/۵۵
میانگین	۲۴/۷۳±۶/۳۷	۲۹/۰۱±۶/۶۱	۴۷/۱۹±۱۴/۲۲	۴۹/۱۱±۱۳/۹۶

مشاهده نگردید.

اثر آنتول بر ارگوسترول غشایی جدایه‌های کاندیدا/گلایراتای تیمار شده با آنتول: اثر غلظت‌های مختلف آنتول بر ارگوسترول غشایی جدایه‌های کاندیدا/گلایراتا با روش HPLC ارزیابی شد. غلظت ارگوسترول بر اساس میلی‌گرم در گرم توده مخمری بر اساس سطح زیر پیک مربوط به کروماتوگرام ارگوسترول محاسبه گردید (شکل شماره ۳).

پس از قرارگیری سلول‌های پلانکتونیک در معرض غلظت‌های MIC/2 و MIC/4 آنتول، میانگین میزان هیدروفوبیسیته سطحی در جدایه‌های مطالعه شده در مقایسه با گروه کنترل، به شکل معناداری کاهش یافت ( $P<0.05$ )، به طوری که درصد هیدروفوبیسیته سطحی در گروه تیمار شده با MIC/2 آنتول معادل  $24/73 \pm 6/37$  و در گروه تیمار شده با MIC/4 آنتول معادل  $29/01 \pm 6/61$  تعیین شد. تفاوت معناداری میان گروه کنترل و گروه تیمار شده با غلظت MIC/8 آنتول



شکل شماره ۳. روماتوگرام‌های HPLC مربوط به ارگوسترول استخراج شده از سلول‌های کاندیدا/گلایراتای تیمار با غلظت‌های مختلف آنتول.

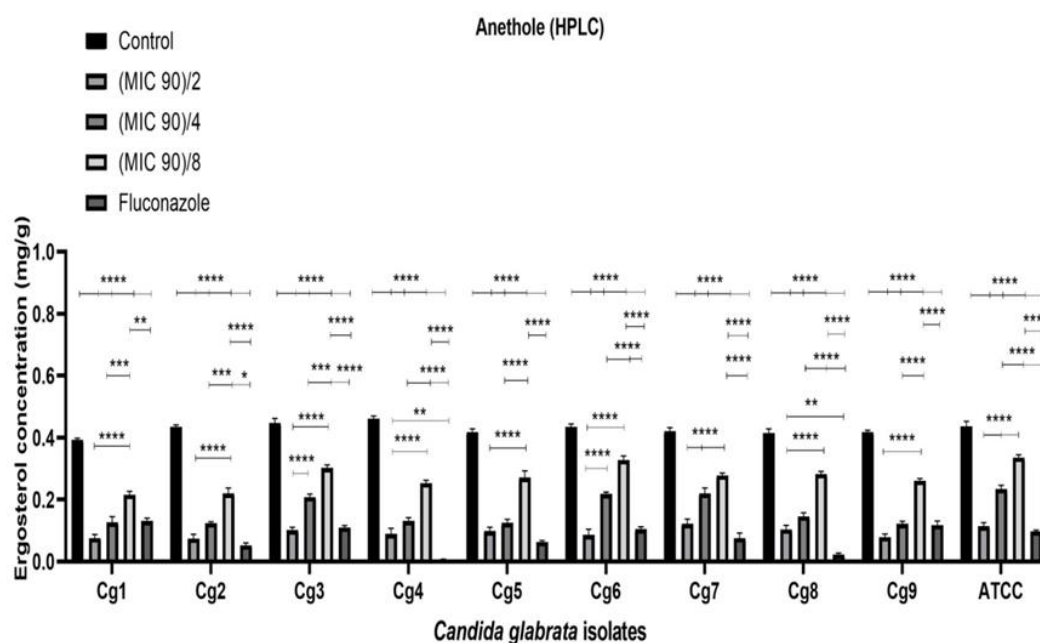
گلایراتای ATCC، آنتول در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل، به ترتیب باعث کاهش ۷۳/۹۲، ۴۶/۴۶ و ۲۳/۳۵ درصدی ارگوسترول غشایی شد (جدول شماره ۴). آنتول در همه غلظت‌های مطالعه شده باعث کاهش معنادار و وابسته به دوز ارگوسترول غشایی گردید (شکل شماره ۴).

آنتول در همه غلظت‌های sub MIC باعث تغییر در میزان ارگوسترولی غشای سلولی جدایه‌های کاندیدا/گلایراتای مطالعه شده گردید. نتایج نشان داد که کاهش ارگوسترول غشایی درباره آنتول الگویی وابسته به دوز دارد. در واقع، با افزایش غلظت آنتول، میزان ارگوسترول غشایی کاهش بیشتری را از خود نشان می‌دهد. در ارتباط با کاندیدا/

جدول شماره ۴. میانگین غلظت ارگوسترول (میلی‌گرم در گرم) سلول‌های کاندیدا/گلایراتا در تیمار با غلظت‌های subMIC آنتول در مقایسه با گروه کنترل

غلظت ارگوسترول (میلی‌گرم در گرم) ± انحراف معیار	جدایه‌های کاندیدا/گلایراتا
آنتول	
کنترل	

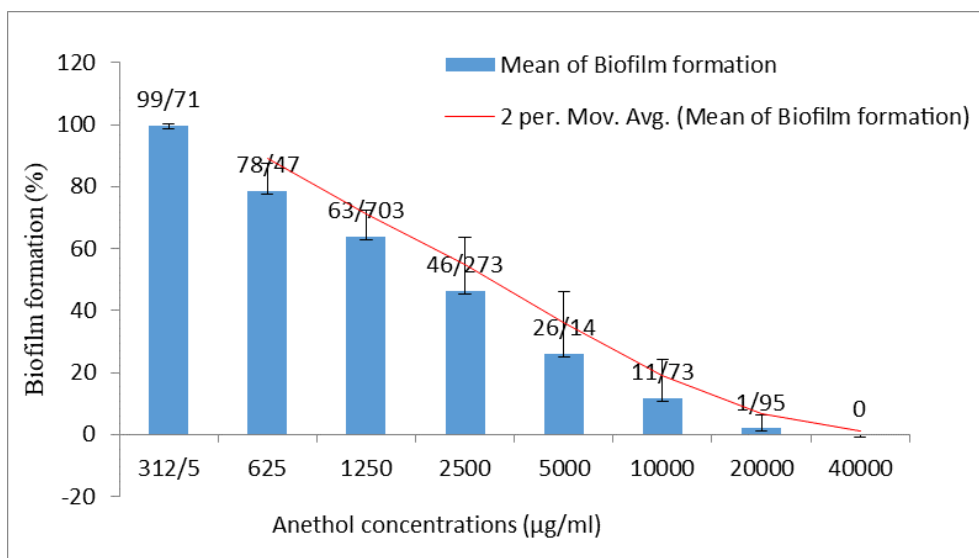
	MIC/8	MIC/4	MIC/2	
۰/۳۹۲±۰/۰۱۱	۰/۲۱۶±۰/۰۱۸	۰/۱۲۷±۰/۰۳۲	۰/۰۲۰±۰/۰۷۶	کاندیدا گلابراتا ۱
۰/۴۳۴±۰/۰۱۲	۰/۲۱۹±۰/۰۱۱	۰/۱۲۴±۰/۰۰۸	۰/۰۷۴±۰/۰۲۴	کاندیدا گلابراتا ۲
۰/۴۴۷±۰/۰۲۶	۰/۳۰۲±۰/۰۱۷	۰/۲۰۸±۰/۰۱۸	۰/۱۰۱±۰/۰۱۶	کاندیدا گلابراتا ۳
۰/۴۶۱±۰/۰۱۶	۰/۲۵۳±۰/۰۱۶	۰/۱۳۱±۰/۰۱۹	۰/۰۸۹±۰/۰۳۲	کاندیدا گلابراتا ۴
۰/۴۱۸±۰/۰۱۹	۰/۲۷۱±۰/۰۱۳	۰/۱۲۵±۰/۰۲۰	۰/۰۹۹±۰/۰۲۱	کاندیدا گلابراتا ۵
۰/۴۳۴±۰/۰۱۷	۰/۳۲۷±۰/۰۱۰	۰/۲۱۸±۰/۰۱۰	۰/۰۸۶±۰/۰۳۳	کاندیدا گلابراتا ۶
۰/۴۲۱±۰/۰۱۹	۰/۲۷۸±۰/۰۰۶	۰/۲۲۰±۰/۰۳۱	۰/۱۲۱±۰/۰۲۷	کاندیدا گلابراتا ۷
۰/۴۱۴±۰/۰۲۵	۰/۲۸۲±۰/۰۰۸	۰/۱۴۶±۰/۰۲۰	۰/۱۰۴±۰/۰۲۳	کاندیدا گلابراتا ۸
۰/۴۱۸±۰/۰۱۰	۰/۲۶۰±۰/۰۰۷	۰/۱۲۱±۰/۰۱۵	۰/۰۷۹±۰/۰۱۷	کاندیدا گلابراتا ۹
۰/۴۳۷±۰/۰۲۸	۰/۳۳۵±۰/۰۱۷	۰/۲۳۴±۰/۰۲۰	۰/۱۱۴±۰/۰۲۰	ATCC



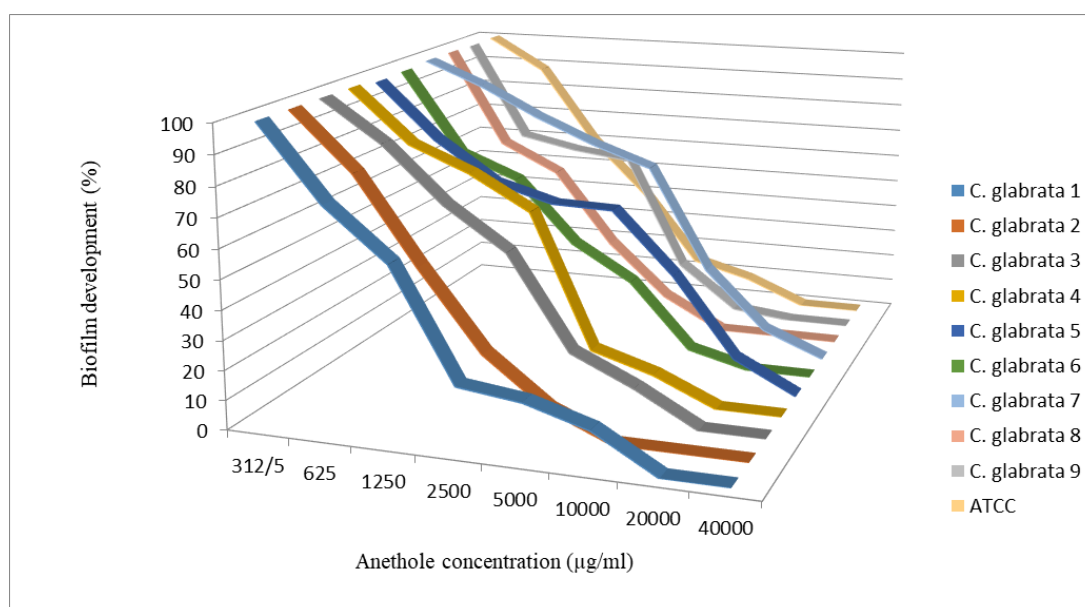
شکل شماره ۴. اثر غلظتهای subMIC آنتول بر ارگوسترول غشایی سلولهای کاندیدا گلابراتا در مقایسه با گروه کنترل.

الگوی وابسته به دوز روند تشکیل بیوفیلمهای کاندیدا گلابراتا را مهار میکند. در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم در میلیلیتر آنتول، کاهش بیش از ۵۰ درصدی در شکلگیری بیوفیلمهای کاندیدا گلابراتا (۵۳/۷ درصد) دیده می شود.

اثر آنتول بر فعالیت متابولیکی تودههای بیوفیلمی: همان گونه که در شکل شماره ۵ نشان داده شده است، اثر غلظتهای متوالی آنتول بر فعالیت متابولیکی تودههای بیوفیلمی در حال تشکیل کاندیدا گلابراتا ارزیابی گردید. نتایج نشان دادند که آنتول با



a



b

**شکل شماره ۵.** میانگین درصد تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های *کاندیدا گلابراتا* در سه بار تکرار مجزا و در حضور غلظت‌های مختلف آنتول. خط روند (Trend line) به رنگ قرمز نشان‌دهنده الگوی وابسته به دوز اثر آنتول بر شکلگیری بیوفیل‌های *کاندیدا گلابراتا* است؛ b. فعالیت متابولیکی بیوفیل‌های ۲۴ ساعته *کاندیدا گلابراتا* در حضور غلظت‌های مختلف آنتول

### بحث و نتیجه‌گیری

مخمر *کاندیدا آلیکسیس* اغلب به‌عنوان شایع‌ترین علت کاندیدیازیس در انسان و حیوانات شناخته شده است، هرچند در سراسر جهان، عفونت‌های ناشی از سویه‌های غیر آلیکسیسی مانند *کاندیدا گلابراتا*، به‌ویژه به دنبال استفاده پیشگیری‌کننده از داروهای ضدقارچی در حال افزایش است که به ایجاد مقاومت اکتسابی به این داروها منجر می‌شود.

در این مطالعه، در بیشترین غلظت استفاده شده از آنتول (۴۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، هیچ‌گونه فعالیت متابولیکی مربوط به توده‌های بیوفیل‌های *کاندیدا گلابراتا* قابل‌ردیابی نبود و آنتول در این غلظت باعث مهار کامل بیوفیل‌های *کاندیدا گلابراتا* شد (میزان مهار شکلگیری بیوفیلم در غلظت ۴۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتول معادل ۱۰۰ درصد محاسبه گردید).

توانایی بیشتری را نسبت به *کاندیدای آلیکنس* برای تشکیل بیوفیلم از خود نشان می‌دهند؛ اما در محیط شبیه‌سازی‌شده ادرار، توانایی آن‌ها در شکل‌گیری بیوفیلم همانند جدایه‌های *کاندیدای آلیکنس* است. پژوهشگران دیگر نیز گزارش کردند که همه جدایه‌های *کاندیدای گلابراتا* مانند *کاندیدای آلیکنس*، توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند که بر نتایج ما منطبق است؛ اما به علت تشکیل نشدن هایف حقیقی در *کاندیدای گلابراتا*، سازوکار استحکام و بقای توده بیوفیلمی کماکان در هاله‌ای از ابهام قرار دارد. تصور می‌شود که کربوهیدرات‌های ماتریکس خارج سلولی به‌ویژه بتا ۱ و ۳ گلوکان، در بقا و استحکام بیوفیلم‌های *کاندیدای گلابراتا* نقش اصلی را ایفا کنند (۲۳).

مطالعات مختلف نشان دادند که بیوفیلم‌های *کاندیدای گلابراتا* در شرایط بروتنتی و حتی نمونه‌های حیوانی، نسبت به داروهای گروه آزول و حتی پلینها مقاومت نشان می‌دهند؛ اما نسبت به اکینوکاندینها همچنان حساس هستند (۲۳). ریشه‌کن کردن بیوفیلم‌های *کاندیدای* به علت تحمل ذاتی یا اکتسابی به ضدقارچ‌ها، بسیار دشوار است. در حقیقت، مقاومت به آزولها در میان گونه‌های *کاندیدای* به‌ویژه *کاندیدای گلابراتا*، در حال حاضر یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های بالینی است؛ از این رو، یافتن راهکارهای درمانی با ترکیبات طبیعی اهمیت فراوانی دارد.

آنتول (۱-متوکسی-۴-ایزوپروپینیل-بزن) یک فیل پروپانویید گیاهی است که یکی از اجزای اصلی عطرمایه‌های گیاهی مانند آنیسون، رازیانه و بادیان رومی را تشکیل می‌دهد. مطالعات نشان داده‌اند که آنتول آثار ضدباکتریایی و ضدقارچی فراوانی را از خود نشان می‌دهد (۱۳). در مطالعه‌ای، آثار ضدقارچی عصاره و عطرمایه آنیسون در برابر ۷ مخمر و ۴ درماتوفیت ارزیابی شد. نتایج فعالیت ضدقارچی قوی در برابر *کاندیدای گلابراتا* و میکروسپوروم کنیس را نشان داد. در مطالعه حاضر، میانگین MIC و MFC آنتول علیه جدایه‌های مطالعه‌شده به ترتیب ۸۴۳/۷۵ و ۲۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. فوجیتا و همکاران (۲۴) در سال ۲۰۰۷، به بررسی اثر سینرژیستی آنتول با دودکانول علیه گونه‌های مختلف قارچی پرداختند و نشان

*کاندیدای گلابراتا* توانایی چسبیدن و تشکیل بیوفیلم روی هر دو سطح زنده و غیرزنده، مانند بافت‌های میزبان و دستگاه‌های پزشکی ایمپلنتی را دارد (۱۹)؛ از این رو، امروزه *کاندیدای گلابراتا* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های *کاندیدایی* غیر آلیکنسی شناخته می‌شود. شیوع عفونت‌های ادراری و تناسلی با این قارچ امروزه رو به افزایش است و با توجه به مقاومت اکتسابی *کاندیدای گلابراتا* به آزولها، کنترل عفونت‌های ناشی از آن به‌عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات درمانی در عفونت‌های *کاندیدایی* مطرح است؛ بنابراین، در این مطالعه، ابتدا الگوی حساسیت جدایه‌های *کاندیدای گلابراتا* به داروهای ضدقارچی رایج و همچنین توانایی آن‌ها در ایجاد توده‌های بیوفیلمی ارزیابی گردید و پس از آن، به بررسی اثر آنتول بر حساسیت ضدقارچی سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلمی، آبگریزی سطحی و تغییر در ارگوسترول غشایی پرداخته شد.

در مطالعه حاضر، حساسیت متوسط (حساس وابسته به دوز) در ۴۰ درصد از جدایه‌های *کاندیدای گلابراتا*، به‌ویژه در ارتباط با فلوکونازول و ایتراکونازول دیده شد. این یافته با مطالعات انجام‌شده پیشین در این زمینه مطابقت دارد (۲۱، ۲۰). پژوهش‌های مختلف در ایران حساسیت جدایه‌های بالینی *کاندیدای* نسبت به داروهای ضدقارچی را مطالعه کردند و بسته به محل جداسازی و درگیری بالینی، میزان مقاومت گونه‌های مختلف *کاندیدای* نسبت به فلوکونازول ۰ تا ۴۰ درصد گزارش شده است (۲۱). همسو با مطالعات پیشین، در این مطالعه، از ۱۰ نمونه *کاندیدای گلابراتای* ادراری، ۳ نمونه (۳۰ درصد نمونه‌ها) نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند.

توانایی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های *کاندیدای گلابراتا* در مطالعات مختلف ارزیابی گردیده است، به طوری که در مطالعه جین و همکاران (۲۲)، در ارتباط با توانایی تشکیل بیوفیلم و همچنین حساسیت جدایه‌های ادراری *کاندیدای* نسبت به داروهای ضدقارچی مشخص شد که همه نمونه‌های ادراری *کاندیدای گلابراتا* در شرایط بروتنتی، توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند. این پژوهشگران اظهار داشتند که نمونه‌های ادراری *کاندیدای گلابراتا* در محیط RPMI1640

دادند که حداقل غلظت ممانعت کننده آنتول علیه *کاندیدا* / *آلیکسس* و *ساکارومایسس سروسیه* به ترتیب ۴۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر است. این پژوهشگران نشان دادند که آنتول در ترکیب با دود کائول می تواند توانایی مهار رشد قارچی دود کائول را به قابلیت قارچکشی ارتقا دهد. محمدزاده و همکاران (۲۵) نیز در سال ۲۰۲۰، به بررسی اثر آنتول بر بیوفیلماهای دوگانه *استافیلوکوکوس اورئوس* / *اکانیدیا* / *آلیکسس* پرداختند. این پژوهشگران نشان دادند که آنتول علاوه بر مهار تشکیل بیوفیلماهای دوگانه، بسته به نوع جدایه، در غلظت های ۷۵۰ تا ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث مهار رشد سلول های پلانکتونیک *کاندیدا* / *آلیکسس* می شود که با نتایج این مطالعه قرابت دارد. در مطالعه دیگری، اثر مهارکنندگی آنتول بر گونه های *کاندیدا* در غلظت ۶۲۰ میکروگرم در میلی لیتر نشان داده شد (۲۶). دابروسکا و همکاران (۲۷) در سال ۲۰۲۱، به بررسی اثر آنتول بر جدایه های *کاندیدا* / *آلیکسس* پرداختند. نتایج نشان داد که همه جدایه های مخمر به آنتول حساس هستند. حداقل غلظت مهارکنندگی حدود ۶۱/۷۵ تا ۲۴۷ میلی گرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی حدود ۲۴۷ تا ۴۹۴ میلی گرم در میلی لیتر بود. تفاوت در غلظت های مؤثر آنتول در مطالعات مختلف می تواند ناشی از تفاوت در گونه کاندیدایی مطالعه شده باشد، هرچند اثر آنتول بر جدایه های *کاندیدا* / *گلابراتا* تاکنون گزارش نشده است. علاوه بر این، مخزن جدایه های مطالعه شده، الگوی حساسیت آن ها با داروهای ضدقارچی استاندارد، تفاوت در متغیرهای آزمون حساسیت و یا ایزومر استفاده شده از آنتول و درصد خلوص آن نیز می تواند در این امر تأثیر گذار باشد.

چسبندگی میکروبی روی سطح بسترها اولین مرحله تشکیل بیوفیلم است و پوشش سلولی و ویژگی های آن اولین واسطه تعامل میان میکروارگانیسم و محیط است. آب گریزی سطحی (هیدروفوبیسیته) یک ویژگی مهم اما غیر اختصاصی است که به اتصال گونه های مختلف *کاندیدا* روی سطوح مخاطی بدن میزبان کمک می کند. همسو با نتایج مطالعه حاضر، نشان داده شده است که آب گریزی سطحی سلول های

پلانکتونی کاندیدایی جدا شده از منابع مختلف با تشکیل بیوفیلم روی این سطوح ارتباط مستقیم دارد (۲۸). در مطالعه سیلوا دیاس و همکاران (۲۹)، رابطه مثبتی میان توده بیوفیلم و آب گریزی سطحی سویه های *کاندیدا* / *گلابراتا* و *کاندیدا* / *پاراپیزیلوزیس* مشخص گردید؛ همچنین همبستگی میان فعالیت متابولیکی و آب گریزی سطحی تنها برای *کاندیدا* / *آلیکسس* و *کاندیدا* / *تروپیکالیس* یافت شد. اثر ترکیبات ترپنوئیدی طبیعی بر آب گریزی سطحی جدایه های مختلف *کاندیدا* در مطالعات مختلف ارزیابی گردیده است. پائولو و همکاران (۳۰) نشان دادند که اوژنول به شکل معناداری آب گریزی سطحی و به دنبال آن، اتصال و تشکیل بیوفیلم در جدایه های دهانی *کاندیدا* / *تروپیکالیس* و *کاندیدا* / *دابلینسیس* مربوط به افراد ایدزی را کاهش می دهد. کاهش آب گریزی سطحی و تشکیل بیوفیلم در گونه های مختلف *کاندیدا* از جمله *کاندیدا* / *گلابراتا* در تیمار با غلظت های subMIC عطر مایه گیاهان غنی از تیمول در مطالعه خان و همکاران (۳۱) نیز نشان داده شده است.

در این مطالعه، آنتول میزان آبگریزی سطحی در جدایه های مطالعه شده در غلظت های MIC/2 و MIC/4 در مقایسه با گروه کنترل را به شکل معناداری کاهش داد ( $P < 0.05$ ). تفاوت معناداری میان گروه کنترل و گروه تیمار شده با غلظت MIC/8 آنتول مشاهده نشد. غلظت های subMIC استفاده شده به صورت چشمگیری آب گریزی سطحی و به دنبال آن، تشکیل بیوفیلم را در جدایه های *کاندیدا* / *گلابراتا* کاهش دادند. همسو با آن، ترکیباتی همچون آلفا توجون، کارون، متول، ایزوپولگون، نرول و لینالول فعالیت آنتی بیوفیلم را در غلظتهایی بسیار کمتر از غلظت های مهارکننده رشد نشان دادند (۳۲). سلول های آب گریز چسبندگی و مقاومت بیشتری در برابر فاگوسیتوز دارند و در نتیجه، نسبت به سلول های آب دوست از حدت بیشتری برخوردارند؛ بنابراین، کاهش آب گریزی سطحی توسط آنتول می تواند با جلوگیری از اتصال و در ادامه، کلنیزاسیون *کاندیدا* / *گلابراتا* روی سطوح زیستی و صناعی از یک سو و جلوگیری از تشکیل توده های بیوفیلمی و مقاومت ناشی از آن ها از سوی دیگر، به اختلال در



روند بیماری‌زایی *کاندیدا* گلابراتا منجر شود.

ارگوسترول خاص قارچ‌ها و مهم‌ترین ترکیب استرولی در غشای سلولی قارچ‌ها است که مسئول حفظ عملکرد و یکپارچگی سلول است. سازوکار اولیه عملکردی که داروهای ضدقارچی گروه آزول از رشد سلول‌های قارچی جلوگیری می‌کنند، ایجاد اختلال در مسیرهای بیوستتر پیش‌سازهای استرول‌های غشایی است که به کاهش بیوستتر ارگوسترول منجر می‌گردد؛ بنابراین، در این مطالعه، اثر آنتول بر ارگوسترول غشایی به روش HPLC ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ارگوسترول غشایی در تیمار با آنتول، الگویی وابسته به دوز دارد؛ همچنین در همه غلظت‌های مطالعه‌شده، آنتول به شکل معناداری باعث کاهش میزان ارگوسترول غشایی گردید. مطابق با نتایج مطالعه ما، سامبر و همکاران (۳۳) نشان دادند که عطر مایه گیاه نعناع با کاهش بسیار فراوان در محتوای ارگوسترولی سلول‌های *کاندیدا آلیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس*، به شکستگی غشای سلولی و تغییرات در مورفولوژی آن‌ها منجر می‌شود؛ همچنین علیزاده و همکاران (۳۴) در سال ۲۰۱۸، به بررسی اثر مونوترپن گیاهی کارواکرول بر ارگوسترول غشایی و ژن‌های مربوط به سنتز ارگوسترول در جدایه‌های *کاندیدا آلیکنس* پرداختند. این پژوهشگران نشان دادند که کارواکرول با اتصال به ارگوسترول غشای قارچ، باعث کاهش ۵۲ درصدی در محتوای ارگوسترول و کاهش بیان ژن‌های ERG3 و ERG11 در مقایسه با کنترل می‌گردد. در مطالعات دیگر، اثر ساختارهای ترپنوئیدی گیاهی مانند ژرانیول، ایزومرهای سیترال و اوژنول بر ارگوسترول غشایی نشان داده شده است و به احتمال فراوان، اختلال در سنتز و ساختار ارگوسترول یکی از سازوکارهای ضدقارچی این ترکیبات است (۳۵). بر اساس بررسی ما، تاکنون مطالعه مدونی روی اثر آنتول بر ارگوسترول غشای سلول‌های *کاندیدای* گزارش نشده است و این مطالعه برای اولین بار اثر آنتول بر ارگوسترول غشای سلول‌های *کاندیدا* گلابراتا را نشان داد. در مطالعه ما مشخص گردید که آنتول هم روی خصوصیات دیواره سلولی (آبگریزی سطحی) و هم بر غشای سلولی (تغییر میزان ارگوسترولی غشا) تأثیر می

گذارد و به عبارتی، دیواره و غشای سلولی مخمرهای *کاندیدا* گلابراتا می‌تواند محل هدف آنتول باشد.

با توجه به یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که آنتول علاوه بر اثر ضدقارچی علیه جدایه‌های *کاندیدا* گلابراتا، توانایی کاهش آبگریزی سطحی سلول‌های *کاندیدای* را دارد. این خاصیت تغییر کاهشی آب‌گریزی سطحی به کاهش توانایی اتصال این سلول‌ها به سطوح و در نتیجه آن، جلوگیری از تشکیل توده‌های بیوفلمی منجر می‌گردد. با توجه به عملکرد آنتول علیه جدایه‌های با الگوی متفاوت حساسیت، استفاده از آن در کنار داروهای ضدقارچی استاندارد نیازمند بررسی‌های فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک این ماده طبیعی است. با توجه به یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد که عملکرد ضد *کاندیدای* آنتول ترکیبی از اثر بر دیواره سلولی و غشای پلاسمایی است. این در حالی است که روشن تر شدن این ادعا نیاز به مطالعات بیشتر و گسترده‌تر در این زمینه دارد.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در انجام نمونه‌برداری نهایت تشکر را دارند.

### تعارض منافع

نویسندگان این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی برای نویسندگان ندارد.

### کد اخلاق

برای این پژوهش شناسه اخلاقی به شماره ۳۰۰۵۱۱/۶/۴ در معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ثبت شده است.

### حمایت مالی

این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تهران حمایت مالی شده است.

### مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان در نوشتن و تایید نهایی مقاله و جمع‌آوری داده‌ها و آنالیز آن مشارکت داشته‌اند.

## References

- de Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartágenes MdS, Filho AKDB, do Nascimento FRF, et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol* 2018; 3:1351. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351.
- Mohamed AA, Lu XL, Mounmin FA. Diagnosis and treatment of esophageal candidiasis: current updates. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2019; 1:3585136. doi: 10.1155/2019/3585136.
- García-Agudo L, Rodríguez-Iglesias M. Nosocomial candiduria in the elderly: microbiological diagnosis. *Mycopathologia* 2017; 1:1-6. doi: 10.1007/s11046-017-0232-7.
- Pemán J, Ruiz-Gaitán A. Candidemia from urinary tract source: the challenge of candiduria. *Hosp Pract* 2018; 46:243-5. doi: 10.1080/21548331.2018.1538623.
- de Paula SB, Bartelli TF, Di Raimo V, Santos JP, Morey AT, Bosini MA, et al. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. *Evidence-Based Alt Med* 2014; 2014:505204. doi:10.1155/2014/505204.
- Li WS, Chen YC, Kuo SF, Chen FJ, Lee CH. The impact of biofilm formation on the persistence of candidemia. *Front Microbiol* 2018; 4:1196. doi: 10.3389/fmicb.2018.01196.
- Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol* 2013; 8:1325-37. doi: 10.2217/fmb.13.101.
- Ellepola AN, Samaranayake LP. Investigative methods for studying the adhesion and cell surface hydrophobicity of andida species: an overview. *Microb Ecol Health Dis* 2001; 13:46-54. doi: 10.1080/089106001750071708.
- Clotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun* 1985; 50:97-101. doi: 10.1128/iai.50.1.97-101.1985.
- Panagoda GJ, Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida* parapsilosis to epithelial and acrylic surfaces corre lates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001; 44:29-35. doi: 10.1046/j.1439-0507.2001.00611. x.
- Pinheiro PF, Menini LAP, Bernardes PC, Saraiva SRH, Carneiro JWM, Costa AV, et al. Semisynthetic phenol derivatives obtained from natural phenols: antimicrobial activity and molecular properties. *J Agri Food Chem* 2018; 66:323-30. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04418.
- Khan MS, Ahmad I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:618-21. doi: 10.1093/jac/dkr512.
- Kubo I, Fujita KI, Nihei KI. Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed. *J Sci Food Agri* 2008; 88:242-7. doi: 10.1002/jsfa.3079.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Disk Diffusion Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guidelinessecond Edition. CLSI document M44-A2, Clinical and Laboratory StandardsInstitute, Wayne PA, 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guidelinessecond Edition. CLSI document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 2008.
- Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* 2008; 3:1494-500. doi: 10.1038/nport.2008.141.
- Álvarez M, Rodríguez A, Bermúdez E, Roncero E, Andrade MJ. Development of a methodology for estimating the ergosterol in meat product-borne toxigenic moulds to evaluate antifungal agents. *Foods* 2021; 10:438. doi: 10.3390/foods10020438.
- Anil S, Ellepola ANB, Samaranayake LP. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis* 2001; 7:119-22.
- Kucharíková S, Neirinck B, Sharma N, Vleugels J, Lagrou K, Van Dijck P. In vivo *Candida glabrata* biofilm development on foreign bodies in a rat subcutaneous model. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70:846-56. doi: 10.1093/jac/dku447.
- Hitkova HY, Georgieva DS, Hristova PM, Marinova-Bulgaranova TV, Kirilov Borisov B, Georgiev Popov V. Antifungal susceptibility of non-albicans *Candida* species in a tertiary care hospital, Bulgaria. *Jundishapur J Microbiol* 2020;13: e101767. doi: 10.5812/jjm.101767.
- Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E, Alirezaee M, Shams-Ghahfarokhi M, Amani A, et al. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *J Mycol Med* 2014;24: e43-e50. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.004.

22. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries B. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:1697-703. doi: 10.1128/AEM.02439-06.
23. d'Enfert C, Janbon G. Biofilm formation in *Candida glabrata*: What have we learnt from functional genomics approaches? *FEMS yeast Res* 2016; 16:111. doi: 10.1093/femsyr/fov111.
24. Fujita KI, Fujita T, Kubo I. Anethole, a potential antimicrobial synergist, converts a fungistatic dodecanol to a fungicidal agent. *Phytother Res* 2007; 21:47-51. doi: 10.1002/ptr.2016.
25. Mohammadzadeh F, Yahyaraeiyaat R, Sharifzadeh A. Evaluation of the effect of anethole against dual biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* in vitro. *Mycoses* 2020.
26. Vieira Priscila RN, de Morais, Selene M, Bezerra, Francisco HQ, Augusto TFP, Írville R, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. *Industr Crops Prod* 2014; 55:267-71. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.02.032.
27. Dąbrowska M, Zielińska-Bliźniewska H, Kwiatkowski P, Łopusiewicz Ł, Pruss A, Kostek M, et al. Inhibitory effect of eugenol and trans-anethole alone and in combination with antifungal medicines on *Candida albicans* clinical isolates. *Chem Biodivers* 2021;18: e2000843. doi: 10.1002/cbdv.202000843.
28. Borghi E, Sciota R, Biassoni C, Cirasola D, Cappelletti L, Vizzini L, et al. Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates? *J Med Microbiol* 2011; 60:689-90. doi: 10.1099/jmm.0.026898-0.
29. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol* 2015;12:205. doi: 10.3389/fmicb.2015.00205.
30. de Paula SB, Bartelli TF, Di Raimo V, Santos JP, Morey AT, Bosini MA, et al. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014:505204. doi: 10.1155/2014/505204.
31. Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS, Botha F. Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complement Alternat Med* 2014;14:1-14. doi: 10.1186/1472-6882-14-337.
32. Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling* 2013; 29:87-96. doi: 10.1080/08927014.2012.749398.
33. Samber N, Khan A, Varma A, Manzoor N. Synergistic anti-*candidal* activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. *Pharma Biol* 2015; 53:1496-504. doi: 10.3109/13880209.2014.989623.
34. Alizadeh F, Khodavandi A, Esfandyari S, Nouripour-Sisakht S. Analysis of ergosterol and gene expression profiles of sterol $\Delta$  5, 6-desaturase (ERG3) and lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (ERG11) in *Candida albicans* treated with carvacrol. *J Herbmed Pharmacol* 2018; 7:79-87. doi: 10.15171/jhp.2018.14.
35. Lone SA, Khan S, Ahmad A. Inhibition of ergosterol synthesis in *Candida albicans* by novel eugenol tosylate congeners targeting sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) enzyme. *Arch Microbiol* 2020; 202:711-26. doi: 10.1007/s00203-019-01781-2.