

ترکیب شیمیایی و اثر ضد قارچی عصاره ساکارومایسس بولاردی بر جدایه‌های بالینی کاندیدا آلیکنس

نویسندگان: رضا محمدصالحی^۱، منصور بیات^۱، پرویز اولیاء^{۲*}، سیدلطیف موسوی^۳، سید جمال هاشمی^۴

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴. دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

E-mail: powlia@gmail.com

*نویسنده مسئول: پرویز اولیا

چکیده

مقدمه و هدف: استفاده از انواع داروهای ضد قارچی به ویژه در مقادیر بالا در درمان عفونت‌های ناشی از کاندیدا آلیکنس، با ایجاد مقاومت نسبت به داروهای مذکور همراه بوده است. ساکارومایسس بولاردی مخمری غیر پاتوژن است که در پیشگیری و درمان عفونت‌های روده‌ای ایجادشده در اثر باکتری‌های بیماری‌زا مؤثر است. همچنین شواهدی از اثر این مخمر بر مهار بیماری‌زایی کاندیدا آلیکنس وجود دارد.

مواد و روش‌ها: عصاره ساکارومایسس بولاردی از کشت فیلتر شده در محیط‌های YNB و PDB به دست آمد. حساسیت مخمر کاندیدا آلیکنس (سویه استاندارد ATCC10231 و ۱۴ جدایه بالینی) به عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش میکرو دایلوژن برات و مطابق پروتکل استاندارد CISI-M27-A3 انجام شد. ترکیب شیمیایی عصاره به روش GC/MS تعیین شد.

نتایج: از یک لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط YNB، ۲۰ میلی‌گرم ماده خشک و از یک لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط PDB، ۵۰ میلی‌گرم ماده خشک به دست آمد. عصاره ساکارومایسس بولاردی اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی بر جدایه‌های کاندیدا آلیکنس نداشت. هردو عصاره به دست آمده از محیط‌های کشت YNB و PDB اثرات مشابه داشتند. آنالیز عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش GC/MS منجر به شناسایی ۱۱ ترکیب شد که شامل ۸۶.۱۸ درصد ترکیبات عصاره بوده است. Tyrosol با ۳۷.۰۸ درصد و Phenylethyl Alcohol با ۲۶.۷۵ درصد، بیشترین مقادیر شناسایی‌شده را داشته و ۷۴ درصد ترکیبات این عصاره را تشکیل داده‌اند.

نتیجه‌گیری: ترکیبات اصلی عصاره ساکارومایسس بولاردی، Tyrosol (۳۷.۰۸ درصد) و Phenylethyl Alcohol (۲۶.۷۵ درصد) بود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد عصاره ساکارومایسس بولاردی اثرات مهارکنندگی رشد و کشندگی بر مخمر کاندیدا آلیکنس ندارد.

واژگان کلیدی: کاندیدا آلیکنس، ترکیب شیمیایی، ساکارومایسس بولاردی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۴
اردیبهشت ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۰۲/۱۵
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۹

مقدمه

گونه‌های کاندیدا شایع‌ترین علل عفونت قارچی در گیرندگان عضو پیوندی، افراد با ضعف سیستم ایمنی و ایدزی‌ها است که دامنه وسیعی از عفونت‌های گذرا تا کشنده را ایجاد می‌کند. به دلایل مختلف نظیر ایدز، انواع بدخیمی‌ها و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و کورتیکواستروئیدها، موارد زیادی مبنی بر افزایش عفونت‌های کاندیدایی گزارش شده است. از سوی دیگر استفاده از انواع داروهای ضد قارچی در مقادیر بالا در درمان عفونت‌های سیستمیک و به ویژه در عفونت‌های ناشی از کاندیدا آلبیکنس، با ایجاد مقاومت نسبت به داروهای مذکور همراه بوده است. در سال ۱۹۲۰ زمانی که هند و چین درگیر اپیدمی وبا بود، هانری بولارد متوجه شد که برخی از ساکنان با جویدن پوسته *lychee* و *mangosteen* نشانه‌ای از بیماری وبا را تجربه نمی‌کنند. این موضوع منجر به جداسازی سویه‌ای مخمری از این میوه‌ها شد که *Saccharomyces boulardii* نام گرفت و در حال حاضر یکی از مهمترین پروبیوتیک‌های مخمری تجاری است (۱). در قرن گذشته، بیش از نیمی از نسخه‌های پیشنهادشده پروبیوتیکی نشان می‌دهد که ساکارومایسس بولاردی ممکن است در حفظ سلامت انسان سودمند باشد. ساکارومایسس بولاردی به عنوان یک دارو برای اولین بار در سال ۱۹۵۳ ثبت شد و تا به حال تنها پروبیوتیک یوکاریوتیک ثبت شده است. خصوصیات ساکارومایسس بولاردی مشابه ساکارومایسس سروسیه است اما فاقد توانایی نفوذ به بافت و تهاجم است (۲-۴). ساکارومایسس بولاردی همچنین ناتوان از تشکیل اسپور است. از این رو فرصت انتقال آن به سایر قسمت‌های بدن کاهش می‌یابد (۵).

قابل توجه‌ترین تفاوت بین این مخمرها رشد فوق‌العاده بالا *S. boulardii* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است که متناسب با دمای بدن انسان است (۶). ساکارومایسس بولاردی موکوس روده را به منظور مشارکت در افزایش دفاع ایمنی میزبان با عوامل مغذی ترش‌حی و پلی‌آمین‌ها تحریک می‌کند (۷). همچنین تجویز خوراکی ساکارومایسس بولاردی، مانع انتقال کاندیدا آلبیکنس از دستگاه گوارش موش به گره‌های لنفی مزانتریک، خون و ارگانهایی مانند طحال- کبد و کلیه می‌شود (۸). ساکارومایسس بولاردی همچنین التهاب و کلونیزاسیون روده‌ای کاندیدا آلبیکنس در موش را کاهش می‌دهد (۹). ساکارومایسس بولاردی به‌عنوان پروبیوتیک در پیشگیری و درمان بیماری‌های اسهالی استفاده می‌شود. فعالیت مخمر از چند طریق اتفاق می‌افتد: تحریک فعالیت آنزیمی و پاسخ‌های ایمنی در موکوس روده، تنظیم سیگنال‌های سلولی و بیان ژن پیش التهابی. ساکارومایسس بولاردی موکوس روده را با ترشح مواد غذایی و پلی‌آمین‌ها تحریک می‌کند که منجر به افزایش ایمنی میزبان می‌شود. مصرف خوراکی سلول‌های زنده ساکارومایسس بولاردی از انتقال کاندیدا آلبیکنس به گره‌های لنفوی مزانتریک و بعضی ارگان‌ها از جمله معده و کلیه‌ها جلوگیری می‌کند. هدف از این مطالعه تعیین اثر ضد قارچی عصاره ساکارومایسس بولاردی بر جدایه های کاندیدا آلبیکنس و نیز تعیین ترکیب شیمیایی این عصاره است.

روش کار

تهیه عصاره ساکارومایسس بولاردی

برای تهیه عصاره خشک ساکارومایسس بولاردی از روش Krasowska و همکاران استفاده شد (۱۰). به این منظور چند کلونی از کشت تازه ساکارومایسس بولاردی به ۵ میلی لیتر از محیط YNB (Yeast Nitrogen Base) با pH=5.5 و حاوی ۲٪ د-گلوکز تلقیح شده و برای یک شب (۱۸ ساعت) در شیکر انکوباتور با دور ۲۳۰ و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس سوسپانسیون حاصل در ارلن های حاوی ۲۵۰ میلی لیتر محیط YNB تلقیح و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در دور ۱۲۰ در شیکر انکوباتور قرار گرفت. برای آماده سازی محیط کشت، ۶.۸ گرم از پودر YNB (Sigma, USA) به همراه ۲ گرم D-Glucose را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به وسیله حرارت غیرمستقیم حل کرده تا استوک ۱۰ x تهیه شود. pH محیط بر روی ۵/۵ تنظیم شد و با فیلتر ۰.۲۲ استریل گردید. یک لیتر از کشت ۲۴ ساعته ساکارومایسس بولاردی آماده شده به روش فوق در دور ۳۰۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل با فیلتر ۰.۲۲ فیلتر شد و سپس برای ۳ ساعت با اتیل استات (با تغییرات نیم ساعته اتیل استات به عنوان حلال) در دکانتور استخراج گردید. سپس ماده خشک توسط روتاری ایوپوریتور از حلال جداسازی شد و با مقدار مناسب از متانول، استوک با غلظت ۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر آماده گردید. عصاره گیری از ساکارومایسس بولاردی با استفاده از محیط کشت PDB (Potato dextrose broth, I.R. Iran) نیز انجام شد که از یک لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط PDB، ۵۰ میلی گرم ماده خشک به دست آمد. برای آماده سازی این محیط ۲۴ گرم از پودر PDB در یک لیتر آب مقطر استریل حل و اتوکلاو شد.

بررسی ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی با استفاده از دستگاه GC/MS:

ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش گاز کروماتوگرافی (GC/MS) در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تعیین شد. مشخصات دستگاه

مورد استفاده در جدول ۱ آمده است:

جدول ۱. مشخصات دستگاه GC/MS مورد استفاده

مدل دستگاه GC	Agilent 6890
مدل دستگاه Mass	Agilent 5973N
نوع ستون	BPX5
طول ستون	۳۰ m
قطر داخلی ستون	۰/۲۵ mm
دمای اولیه ستون	۵۰ °C
دمای نهایی ستون	۳۰۰ °C
نوع گاز حامل	He
دکتور	Mass

عصاره ساکارومایسس بولاردی پس از آماده سازی، به دستگاه GC/MS تزریق گردید تا نوع ترکیب های تشکیل دهنده آن مشخص شود. دستگاه GC استفاده شده از نوع Agilent 6890 با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد و سه دقیقه توقف در این دما. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی گراد بود. محدوده اسکن مسها از ۵۰ تا ۵۵۰ تنظیم گردید. نرم افزار مورد استفاده Chemstation بود. شناسایی طیفها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف های جرمی

برای رقت سازی از غلظت ۱۰۲۴ میلی گرم بر میلی لیتر به عنوان بالاترین غلظت عصاره ساکارومایسس بولاردی استفاده شد. غلظت های بعدی ۵۱۲-۲۵۶-۱۲۸-۶۴-۳۲-۱۶-۸-۴ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود. برای رقت سازی از محیط RPMI استفاده شد.

سوسپانسیون استاندارد مخمری از کشت شبانه (Overnight) به مدت ۱۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۲۰ با غلظت 10^7 cfu/ml در لوله های استریل حاوی سرم فیزیولوژی با استفاده از روش اسپکتروفوتومتریک تهیه گردید. سوسپانسیون تلقیحی از طریق برداشت ۵ کلنی (با قطری حدود ۱ میلی متر) از کشت تازه در داخل ۱۰ سی سی سرم فیزیولوژی (سالین ۰/۸۵ درصد) آماده شد. سوسپانسیون فوق به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شده و میزان تراکم سلولی از طریق روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۵۳۰ نانومتر تعیین تراکم گردید، به طوری که در نهایت مقدار سلول های مخمری $5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$ سلول در هر میلی لیتر شد. سپس از سوسپانسیون فوق به ترتیب رقت های ۱/۱۰۰ و سپس ۱/۲۰ تهیه گردید به نحوی که تراکم نهایی سلول های مخمری در هر میلی لیتر CFU/ml $10^3 \times 2/5 - 5/5$ شد.

در هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت های اسانس تهیه شده و ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون مخمری استاندارد اضافه گردید. برای هر مخمر دو چاهک جهت جلوگیری از خطا و به همراه کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شده بود. نتایج پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن میکروپلیت ها در ۳۰ درجه سانتی گراد هم به روش ماکروسکوپی و هم اندازه گیری OD به وسیله الیزا بررسی گردید.

ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت. نرمال الکان ها از شرکت فلوکا با آرت ۰۴۰۷۰ تهیه شد.

نمونه های مورد بررسی

الف- نمونه های مورد بررسی در این تحقیق، سویه استاندارد ۱۰۲۳۱ ATCC و ۱۴ جدایه بالینی مخمر کاندیدا آلبیکنس اخذ شده از مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران است که قبلاً از نظر تست های استاندارد قارچ شناسی، بررسی و استخراج DNA نمونه ها انجام و آلیکنس بودن نمونه ها با یک جفت پرایمر اختصاصی تأیید شده بود. تعداد نمونه ها پس از مشاوره با مشاور آماری انتخاب گردید.

ب- سویه تجاری ساکارومایسس بولاردی (Biocodex, France)

تعیین حساسیت جدایه های کاندیدا آلبیکنس به عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش میکرودایلوشن برات:

برای تعیین حساسیت ضد قارچی جدایه های کاندیدا آلبیکنس به عصاره ساکارومایسس بولاردی، از روش میکرودایلوشن برات و مطابق پروتکل استاندارد M27-A3 استفاده گردید (۱۱). ۱۰/۴ گرم پودر RPMI1640 در ۹۰۰ سی سی آب مقطر استریل حل شده و ۳۴/۵۳ گرم بافر MOPS به همراه گلوکز ۲ درصد به آن اضافه گردید و خوب مخلوط شده تا به طور کامل حل شود و سپس pH محلول با استفاده از NaOH ۱۰ مولار در هر لیتر به ۷-۷/۲ رسانده شد. در نهایت به منظور رسیدن حجم نهایی محلول به ۱ لیتر به آن آب مقطر استریل اضافه گردید. به منظور حذف آلودگی، محلول فوق با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شده و به ظروف درب دار ۵۰۰-۱۰۰۰ سی سی منتقل گردید. استریل بودن محیط فوق با انکوبه کردن ۵ لوله حاوی ۲ سی سی به ازای هر یک لیتر محلول، در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت بررسی شد.

نتایج

از یک لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط *YNB*، ۲۰ میلی گرم ماده خشک به دست آمده است. در حالی که از یک لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط *PDB*، ۵۰ میلی گرم ماده خشک به دست آمده است. هردو عصاره به دست آمده از محیط‌های کشت *YNB* و *PDB* اثرات مشابه داشتند.

نتایج تعیین حساسیت جدایه‌های کاندیدا آلیکنس به عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش میکرودايلوشن برات:

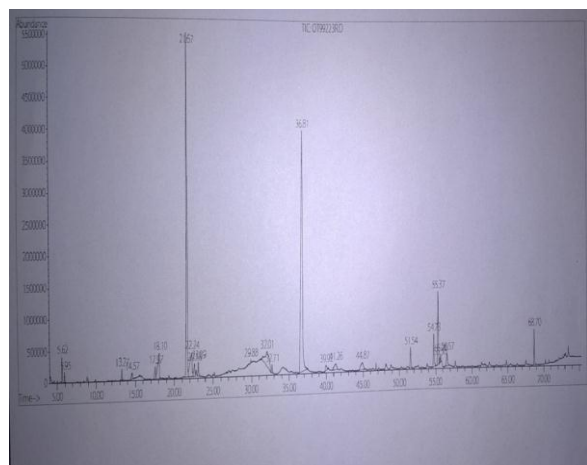
این آزمون در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام گرفت و نمونه‌ها بعد از ۴۸ ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۰ درجه، بصورت ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. در تمام میکروپلیت‌ها کنترل مثبت فقط حاوی محیط کشت *RPMI-1640* به همراه کاندیدا آلیکنس بود. نتایج حاصل به این ترتیب بود که همه نمونه‌های مورد بررسی بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، رشد داشته و کدورت ایجاد کرده بودند. به عبارتی، عصاره ساکارومایسس بولاردی اثر کشندگی و مهارکنندگی بر رشد جدایه‌های کاندیدا آلیکنس نداشته است. در چاهک‌های کنترل منفی که حاوی محیط کشت *RPMI-1640* به همراه عصاره ساکارومایسس بولاردی بود رشد و کدورتی مشاهده نشد. بالاترین غلظت مورد استفاده ۱۰۲۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

آنالیز ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی ۸۶.۱۸ درصد از ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش *GC/MS* (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱) شناسایی شد. بر اساس این آنالیز *Tyrosol* با ۳۷.۰۸ درصد، *Phenylethyl Alcohol* با ۲۶.۷۵ درصد، ۷۴ درصد ترکیبات شناسایی شده را تشکیل داده‌اند.

جدول شماره ۲. ترکیب شیمیایی عصاره ساکارومایسس بولاردی

RT	درصد	نام ترکیب
5.95	0.38	2,3-Butanediol
17.58	0.99	Dihydro-2.5-furandione
18.10	3.87	2-Hydroxy-3-methylbutanoic acid
21.67	26.75	Phenylethyl Alcohol
23.09	0.84	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one
32.01	5.44	Butanedioic acid
36.81	37.08	Tyrosol
41.25	1.29	Octanedioic acid
44.88	1.59	Azelaic acid
55.73	2.61	L-Phe-D-Pro lactam
55.37	5.36	Cyclo-Phe-Pro-diketopiperazine
	86.18	Total Identified

*Retention Time



شکل شماره ۱. آنالیز ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی

بحث

عصاره ساکارومایسس بولاردی از سویه تجاری ساکارومایسس بولاردی (*Biocodex*) به دست آمد. از یک لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط *YNB*، ۲۰ میلی گرم ماده خشک به دست آمده است. در حالی که از یک لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط *PDB*، ۵۰ میلی گرم ماده خشک به دست آمده است. ماده خشک حاصل در این تحقیق بیشتر از گزارش قبلی است که ۲۵ تا ۳۵ میلی گرم از ۲ لیتر کشت ۲۴ ساعته در محیط *YNB* به دست آمده است (۱۰). عصاره ساکارومایسس بولاردی اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی بر جدایه های کاندیدا آلبیکنس نداشت. این نتیجه مشابه نتایج مطالعات قبلی است که عدم توانایی عصاره ساکارومایسس بولاردی بر محدودیت رشد و کشندگی کاندیدا را نشان داده بود (۱۰). هردو عصاره به دست آمده از محیط های کشت *YNB* و *PDB* اثرات مشابه داشتند. در مطالعه سال ۲۰۱۰ (*Murzyn, Krasowska et al. 2010*) عصاره حاصل از کشت فیلتر شده ساکارومایسس بولاردی از لحاظ ترکیب شیمیایی بررسی شد. ابتدا ترکیبات فعال این عصاره به روش کروماتوگرافی جداسازی گردید و سپس این ترکیبات فعال به روش *GC/MS* آنالیز شد که شامل: ۲- فنیل اتانول، کاپروئیک، کاپرولیک و کاپرولیک اسید بود.

نتایج حاصل از تعیین ترکیب شیمیایی عصاره ساکارومایسس بولاردی در مطالعه حاضر بدین شرح بود که ۸۶.۱۸ درصد از ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش *GC/MS* شناسایی شد. بر اساس این آنالیز *Tyrosol* با ۳۷.۰۸ درصد، *Phenylethyl Alcohol* با ۲۶.۷۵ درصد، ۷۴ درصد ترکیبات شناسایی شده را تشکیل داده اند. تفاوت ترکیبات در آنالیز عصاره حاصل از این تحقیق و مطالعه ای که قبلاً ذکر شد می تواند مربوط به روش انجام شده در دو مطالعه باشد همچنین محیط کشت مطالعه اول *YNB* بوده است در حالی که در تحقیق حاضر از محیط کشت *PDB* استفاده گردید. مطالعه *Monterio* و همکاران اثرات ضد کاندیدیایی

تیروزول و فارنسول و مهارکنندگی تشکیل بیوفیلم را نشان داده و احتمال سودمندی این ترکیبات در ضایعات دهانی کاندیدا آلبیکنس را مطرح نموده است (۱۲). مطالعه *Corderio* و همکاران اثر سینترژیسمی تیروزول و آزول ها و نیز مهارکنندگی آن بر تشکیل بیوفیلم را نشان داده است (۱۳). محمد صالحی و همکاران نشان دادند عصاره ساکارومایسس بولاردی، در غلظت ۴۸٪ میلی گرم بر میلی لیتر الگوی حساسیت دارویی این مخمر را در برابر داروهای آزولی تغییر می دهد. همچنین نتایج بررسی آن ها نشان داد بیان ژن *SAP2* (از ویروالانس فاکتورهای مهم کاندیدا آلبیکنس) در مخمرهای تیمار شده با غلظت ۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ساکارومایسس بولاردی به طور معنی داری کاهش یافت (۱۴). انا کرازوسکا و همکاران در سال ۲۰۰۹، اثر انتاگونیستی ساکارومایسس بولاردی بر تولید هایف، چسبندگی و تولید بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس را بررسی کردند. این مطالعه نشان داد سلول های زنده و عصاره کشت ساکارومایسس بولاردی اثر مهاری بر تشکیل هایف و سودوهایف کاندیدا آلبیکنس داشته است. سلول های زنده و عصاره کشت فیلتر شده ساکارومایسس بولاردی موجب کاهش چسبندگی و تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس روی صفحات پلی استرن شده است (۱۰). آنا مورزین و همکاران در سال ۲۰۱۰ عصاره حاصل از کشت فیلتر شده ساکارومایسس بولاردی را از لحاظ ترکیب شیمیایی بررسی نمودند. ترکیبات فعال این عصاره شامل: ۲- فنیل اتانول، کاپروئیک، کاپرولیک و کاپرولیک اسید بود. این مطالعه اثر کاهش دهندگی ترشحات مخمر ساکارومایسس بولاردی در محیط کشت را بر فاکتورهای ویروالانس کاندیدا آلبیکنس نشان داده است. بیان ژن های *HWP1-INOL*، *CSHI* نمونه های مجاورت داده شده با عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش *Realtime PCR* در مقایسه با نمونه های شاهد کاهش داشته است (۱۵). انامورزین و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر سلول ها و عصاره ساکارومایسس

کاهش سایتوکاین های واسط التهاب مؤثر است (۱۶).
 نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات دیگری که ذکر شد نشان می دهد عصاره ساکارومایسس بولاردی اثرات مهارکنندگی رشد و کشندگی بر مخمر کاندیدا آلیکنس ندارد اما برخی از ویروالانس فاکتورهای مهم این مخمر را مهار می کند. این موضوع می تواند به عنوان مزیت این عصاره تلقی شود چراکه بدون تأثیر بر رشد سلول های یوکاریوت مخمری، بر مهار فاکتورهای بیماری زایی آن مؤثر است.

منابع

1. Czerucka D, Piche T, Rampal P. Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2007;26(6):767-78.
2. Buts JP, De Keyser N. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with intestinal brush border membranes: key to probiotic effects? *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 2010; 51(4):532-3.
3. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 2001;9(7):327-35.
4. L M, P B. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1993; 6:157-71.
5. Zaouche A, Loukil C, De Lagausie P, Peuchmaur M, Macry J, Fitoussi F, et al. Effects of oral *Saccharomyces boulardii* on bacterial overgrowth, translocation, and intestinal adaptation after small-bowel resection in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2000;35(2):160-5.
6. Edwards-Ingram L, Gitsham P, Burton N, Warhurst G, Clarke I, Hoyle D, et al. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 2007;73(8):2458-67.
7. J B, N dK. Effect of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Digestive Diseases and Sciences* 2006;51:1485-92.
8. Berg R, Bernasconi P, Fowler D, Gautreaux M. Inhibition of *Candida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *The Journal of Infectious Diseases* 1993;168(5):1314-8.

بولاردی را بر اتصال کاندیدا البیکنس به رده های سلولی CaCo-2 و ۴۰۷ روده ای بررسی نمودند. نتایج این بررسی نشان داد که هم سلول ها و هم عصاره ساکارومایسس بولاردی اتصال کاندیدا البیکنس به رده های سلولی را مهار نمودند. همچنین در این بررسی مشخص شد بیان ژن *IL8* در رده سلولی *CaCo2* عفونی شده با کاندیدا البیکنس پس از اضافه نمودن عصاره ساکارومایسس بولاردی نسبت به شاهد مهار شده است. در این تحقیق نشان داده شد که ساکارومایسس بولاردی بر اتصال کاندیدا البیکنس و نیز

9. Jawhara S, Poulain D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Medical Mycology* 2007;45(8):691-700.
10. Krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, Lukaszewicz M, Dziadkowiec D. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Research* 2009;9(8):1312-21.
11. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-; . The Clinical and Laboratory Standards Institute 2008a, 28 (2008).
12. Monteiro DR, Arias LS, Fernandes RA, Deszo da Silva LF, de Castilho M, da Rosa TO, et al. Antifungal activity of tyrosol and farnesol used in combination against *Candida* species in the planktonic state or forming biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 2017;123(2):392-400.
13. Cordeiro Rde A, Teixeira CE, Brillhante RS, Castelo-Branco DS, Alencar LP, de Oliveira JS, et al. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Research* 2015;15(4):fov012.
14. MohammadSalehi R, Bayat M, Owlia P, Mousavi Gargari L, Hashemi J. Effect of *Saccharomyces Boulardii* Extract on SAP2 Gene Expression and Antifungal Susceptibility of *Candida Albicans*. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2018;11(3).

15. Murzyn A, Krasowska A, Stefanowicz P, Dziadkowiec D, Lukaszewicz M. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS One* 2010;5(8):e12050.
16. Murzyn A, Krasowska A, Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Lukaszewicz M, Dziadkowiec D. The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans*-infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestin 407. *FEMS Microbiology Letters* 2010;310(1):17-23.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
25th Year, No.134
April- May 2018*

Received: 24/02/2018

Last revised: 05/03/2018

Accepted: 09/03/2018

Chemical composition and antifungal effect of *Saccharomyces boulardii* extract against *Candida albicans* clinical isolates

Reza Mohammad Salehi¹, Mansour Bayat¹, Parviz Owlia^{2*}, Seyed Latif Mousavi Gargari³, Seyed Jamal Hashemi⁴

1. Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Molecular Microbiology Research Center (MMRC), Shahed University, Tehran, Iran.
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author e-mail: powlia@gmail.com

Abstract

Background and Objective: The use of high amounts of a variety of antifungal drugs for treatment of *Candida albicans* infections is effective in inducing resistance to these drugs. *Saccharomyces boulardii* is a non-pathogenic yeast used as a probiotic in prevention and treatment of diarrhea diseases. There is evidence of the inhibitory effect of this yeast on *Candida albicans* virulence factors.

Materials and Methods: *Saccharomyces boulardii* extract was obtained from filtered culture in YNB and PDB culture media. Antifungal activity of *S. boulardii* extract against *C. albicans* (fourteen clinical isolates and standard strain ATCC10231) was performed by the micro broth dilution method according to M27-A3 CLSI. The chemical composition of the extract was determined by the GC/MS method.

Results: Dry substance obtained from 1 liter of YNB culture was 20 mg/ml whereas that of PDB culture was 50 mg/ml. *S. boulardii* extract did not show any fungicidal and inhibitory effect against *C. albicans* isolates. Substances obtained from PDB and YNB cultures and used in this experiment showed similar results. Eleven compounds representing 86.18 % of the extract were identified. The major constituents of yeast extract were Tyrosol (37.08%) and Phenylethyl Alcohol (26.75%).

Conclusion: The major constituents of yeast extract were Tyrosol (37.08%) and Phenylethyl Alcohol (26.75%). This study confirms that *S. boulardii* extract did not show any fungicidal and inhibitory effect against *C. albicans* isolates.

Key words: Chemical composition, *Saccharomyces boulardii*, *Candida albicans*