Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وپنجم-شماره ۱۳۴
اردیبهشت ۱۳۹۷

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

نویسندگان: رضا محمدصالحی[۱]، منصور بیات[۱]، پرویز اولیاء[۲*]، سیدلطیف موسوی[۳]، سید جمال هاشمی[٤]

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
٤. دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: پرویز اولیا E-mail:powlia@gmail.com

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

چکیده

مقدمه و هدف: استفاده از انواع داروهای ضد قارچی به ویژه در مقادیر بالا در درمان عفونت‌های ناشی از کاندیدا آلبیکنس، 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 آلبیکنس وجود دارد.

مواد و روش‌ها: عصاره ساکارومایسس بولاردی از کشت فیلتر شده در محیط‌های YNB و PDB به دست آمد. حساسیت مخمر کاندیداآلبیکنس (سویه استاندارد ATCC10231 و ۱۴ جدایه بالینی) به عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش میکرو دایلوشن براث 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 جدایه های کاندیدا البیکنس 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 در صد 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 در صد) و Phenylethyl Alcohol (۲۶.۷۵ درصد) بود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد عصاره ساکارومایسس بولاردی اثرات مهارکنندگی رشد و کشندگی بر مخمر کاندیدا آلبیکنس ندارد.

واژگان کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، ترکیب شیمیایی، ساکارومایسس بولاردی

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

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 وکورتیکوستروئیدها، موارد زیادی مبنی برافزایش 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 پروبیوتیک های 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 سرویسیه است اما فاقد توانایی نفوذ به بافت و تهاجم است (۲-٤). ساکارومایسس بولاردی همچنین ناتوان از تشکیل اسپور است. از این رو فرصت انتقال آن به سایر قسمت‌های بدن کاهش می‌یابد (۵).

قابل‌توجه‌ترین تفاوت بین این مخمرها رشد فوق‌العاده بالا *S.boulardii* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است که متناسب با دمای بدن انسان است (٦).

ساکارومایسس بولاردی موکوس روده را به‌منظور 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 البیکنس 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 پلی آمین ها تحریک می‌کند که منجر به افزایش ایمنی میزبان می‌شود. مصرف خوراکی سلول‌های زنده ساکارومایسس بولاردی از انتقال کاندیدا آلبیکنس به گره‌های لنفاوی 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.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

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 میلی‌لیتر از محیط YNB(Yeast Nitrogen Base) با pH=5.5 و حاوی ۲٪ د- گلوکز تلقیح شده و برای یک‌شب (۱۸ ساعت) در شیکر انکوباتور با دور ۲۳۰ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سوسپانسیون حاصل در ارلن های حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط YNB تلقیح و برای ۲٤ ساعت در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد و در دور ۱۲۰ در شیکر انکوباتور قرار گرفت. برای آماده‌سازی محیط کشت ،٦.٨ گرم از پودر YNB (Sigma,USA) به همراه ۲ گرم D-Glocose را در ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر به‌وسیله حرارت غیرمستقیم حل کرده تا استوک x ۱۰ تهیه شود.pH محیط بر روی ۵/۵ تنظیم شد و با فیلتر ۰.۲۲ استریل گردید. یک لیتر از کشت ۲٤ ساعته ساکارومایسس بولاردی آماده‌شده به روش فوق در دور g ۳۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل با فیلتر ۰.۲۲ فیلتر شد و سپس برای ۳ ساعت با اتیل استات (با تغییرات نیم‌ساعته اتیل استات به‌عنوان حلال) در دکانتور استخراج گردید. سپس ماده خشک توسط روتاری ایوپوریتور از حلال جداسازی شد و با مقدار مناسب از متانول ، استوک با غلظت ٤٨ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده گردید.عصاره گیری از ساکارومایسس بولاردی با استفاده از محیط کشت PDB (Potato dextrose broth,Ibresco,I.R.Iran) نیز انجام شد که از یک لیتر کشت ۲٤ ساعته در محیط PDB، ۵۰ میلی‌گرم ماده خشک به دست آمد. برای آماده‌سازی این محیط ۲٤ گرم از پودرPDB 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 ^{0C}
دمای نهایی ستون	۳۰۰ ^{0C}
نوع گاز حامل	He
دتکتور	Mass

عصاره ساکارومایسس بولاردی پس از آماده‌سازی، به دستگاه GC/MS تزریق گردید تا نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده آن مشخص شود. دستگاه GC استفاده شده از نوع *Agilent 6890* با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع *BPX5* بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید: دمای ابتدائی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه توقف در این دما. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۸ میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد بود. محدوده اسکن مس‌ها از ۵۰ تا ۵۵۰ تنظیم گردید. نرم‌افزار مورد استفاده *Chemstation* بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت. نرمال الکان‌ها از شرکت فلوکا با آرت ۰٤۰۷۰ تهیه شد.

نمونه‌های مورد بررسی

الف-نمونه های مورد بررسی در این تحقیق، سویه استاندارد ۱۰۲۳۱ *ATCC* و ١٤ جدایه بالینی مخمر کاندیدا آلبیکنس اخذ شده از مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران است که قبلاً از نظر تست‌های استاندارد قارچ‌شناسی، بررسی و استخراج *DNA* نمونه‌ها انجام و آلبیکنس بودن نمونه‌ها با یک جفت پرایمر اختصاصی تائید شده بود. تعداد نمونه‌ها 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 براث:

برای تعیین حساسیت ضد قارچی جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس به عصاره ساکارومایسس بولاردی، از روش میکرودایلوشن براث و مطابق پروتکل استاندارد *M27-A3* استفاده گردید(۱۱). ١٠/٤ گرم پودر *RPMI1640* در ۹۰۰ سی‌سی آب مقطر استریل حل‌شده و ۳٤/۵۳ 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 ۷/۲-۷ 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 ۱۰۰۰-۵۰۰ سی‌سی منتقل گردید. استریل بودن محیط فوق با انکوبه کردن ۵ لوله حاوی ۲ سی‌سی به ازای هر یک لیتر محلول، در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت بررسی شد.

برای رقت‌سازی از غلظت ١٠٢٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان بالاترین غلظت عصاره ساکارومایسس بولاردی استفاده شد. غلظت‌های بعدی ٥١٢-٢٥٦-١٢٨-٦٤-٣٢-١٦- ٨ -٤ و۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. برای رقت‌سازی از محیط *RPMI* استفاده شد.

سوسپانسیون استاندارد مخمری از کشت شبانه (*Overnight*) به مدت ۱۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۲۰ با غلظت 10^6 *cfu/ml* در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی با استفاده از روش اسپکتروفوتومتریک تهیه گردید. سوسپانسیون تلقیحی از طریق برداشت ۵ کلنی (با قطری حدود ۱ میلی‌متر) از کشت تازه در داخل ۱۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی (سالین ۰/۸۵ درصد) آماده شد. سوسپانسیون فوق به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شده و میزان تراکم سلولی از طریق روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر تعیین تراکم گردید، به طوری که در نهایت مقدار سلول‌های مخمری 5×10^6 - 1×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر شد. سپس از سوسپانسیون فوق به ترتیب رقت‌های ۱/۱۰۰ و سپس ۱/۲۰ تهیه گردید به نحوی که تراکم نهایی سلول‌های مخمری در هر میلی‌لیتر *CFU/ml* $2/5\times10^3$-۵/. شد.

در هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت‌های اسانس تهیه‌شده 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 ٢٤ ساعت انکوبه کردن میکروپلیت ها در ۳۰ درجه سانتی‌گراد هم به روش ماکروسکوپی و هم اندازه‌گیری *OD* به‌وسیله الیزا بررسی گردید.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

نتایج

از یک لیتر کشت ۲٤ ساعته در محیط *YNB*، ۲۰ میلی‌گرم ماده خشک به دست آمده است. در حالی که از یک لیتر کشت ۲٤ ساعته در محیط *PDB*، ۵۰ میلی‌گرم ماده خشک به دست آمده است. هردو عصاره به دست آمده از محیط‌های کشت *PDB* و *YNB* اثرات مشابه داشتند.

نتایج تعیین حساسیت جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس به عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش میکرودایلوشن براث:

این آزمون در میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای انجام گرفت و نمونه‌ها بعد از ٤۸ 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 آلبیکنس بود. نتایج حاصل به این ترتیب بود که همه نمونه‌های مورد بررسی بعد از ٤۸ ساعت انکوباسیون، رشد داشته و کدورت ایجاد کرده بودند. به عبارتی، عصاره ساکارومایسس بولاردی اثر کشندگی و مهارکنندگی بر رشد جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس 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 ۱۰۲٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

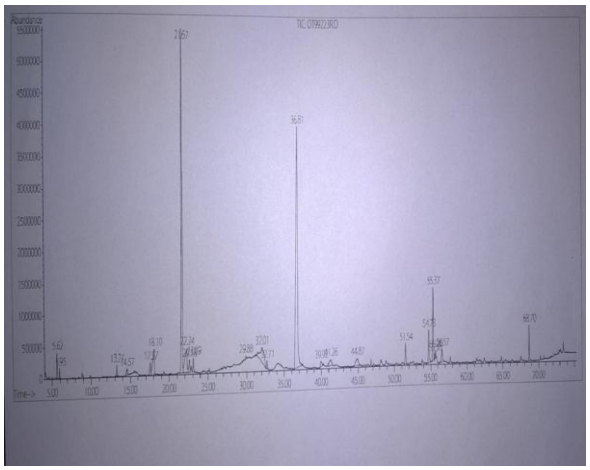
آنالیز ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی

۸٦.۱۸ 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 در صد، *Phenylethyl Alcohol* با ۲٦.۷۵ درصد، ۷٤ درصد ترکیبات شناسایی‌شده 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	Butanedioc acid
36.81	37.08	Tyrosol
41.25	1.29	Octanedioc 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

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

بحث

عصاره ساکارومایسس بولاردی از سویه تجاری ساکارومایسس بولاردی *(Biocodex)* به دست آمد. از یک لیتر کشت ۲٤ ساعته در محیط *YNB*،۲۰ میلی‌گرم ماده خشک به دست آمده است. در حالی که از یک لیتر کشت ۲٤ ساعته در محیط *PDB*، ۵۰ میلی‌گرم ماده خشک به دست آمده است. ماده خشک حاصل در این تحقیق بیشتر از گزارش قبلی است که ۲۵ تا ۳۵ میلی‌گرم از ۲ لیتر کشت ۲٤ ساعته در محیط *YNB* به دست آمده است (۱۰). عصاره ساکارومایسس بولاردی اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی بر جدایه های کاندیدا البیکنس 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 محیط‌های 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، کاپروییک ،کاپرولیک و کاپرولیک اسید بود.

نتایج حاصل از تعیین ترکیب شیمیایی عصاره ساکارومایسس بولاردی در مطالعه حاضر بدین شرح بود که ۸٦.۱۸ درصد از ترکیبات عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش *GC/MS* شناسایی شد. بر اساس این آنالیز*Tyrosol* با ۳۷.۰۸ در صد، *Phenylethyl Alcohol* با ۲٦.۷۵ درصد، ۷٤ درصد ترکیبات شناسایی‌شده را تشکیل داده‌اند. تفاوت ترکیبات در آنالیز عصاره حاصل از این تحقیق و مطالعه‌ای که قبلاً ذکر شد می‌تواند 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 کاندیدایی 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 سینرژیسمی 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 ٪٤۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر الگوی حساسیت دارویی این مخمر را در برابر داروهای آزولی تغییر می‌دهد. همچنین نتایج بررسی آن‌ها نشان داد بیان ژن *SAP2* (از ویرولانس فاکتورهای مهم کاندیدا آلبیکنس) در مخمرهای تیمار شده با غلظت.٤۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره ساکارومایسس بولاردی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت(۱٤). انا کرازوسکا و همکاران در سال ۲۰۰۹، اثر انتاگونیستی ساکارومایسس بولاردی بر تولید هایف، چسبندگی و تولید بیوفیلم کاندیدا البیکنس را بررسی کردند. این مطالعه نشان داد سلول‌های زنده و عصاره کشت ساکارومایسس بولاردی اثر مهاری بر تشکیل هایف و سودوهایف کاندیدا البیکنس داشته است. سلول‌های زنده و عصاره کشت فیلترشده ساکارومایسس بولاردی موجب کاهش چسبندگی و تشکیل بیوفیلم کاندیدا البیکنس 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، کاپروییک ،کاپرولیک و کاپرولیک اسید بود.این مطالعه اثر کاهش دهندگی ترشحات مخمر ساکارومایسس بولاردی در محیط کشت را بر فاکتورهای ویرولانس کاندیدا آلبیکنس نشان داده است. بیان ژن‌های *HWP1-INO1,CSH1* نمونه‌های مجاورت داده‌شده با عصاره ساکارومایسس بولاردی به روش *Realtime PCR* در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش داشته است (۱۵). اناموزین و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر سلول‌ها و عصاره ساکارومایسس

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

بولاردی را بر اتصال کاندیدا البیکنس به رده های سلولی CaCo-2 و ٤٠٧ روده ای بررسی نمودند. نتایج این بررسی نشان داد که هم سلول‌ها و هم عصاره ساکارومایسس بولاردی اتصال کاندیدا البیکنس به رده‌های سلولی را مهار نمودند. همچنین در این بررسی مشخص شد بیان ژن *IL8* در رده سلولی *CaCo2* عفونی‌شده 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 کاهش سایتوکاین های واسط التهاب مؤثر است(١٦) .

نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات دیگری که ذکر شد نشان می‌دهد عصاره ساکارومایسس بولاردی اثرات مهارکنندگی رشد و کشندگی بر مخمر کاندیدا آلبیکنس ندارد اما برخی از ویرولانس فاکتورهای مهم این مخمر را مهار می‌کند. این موضوع می‌تواند به‌عنوان مزیت این عصاره تلقی شود چراکه بدون تأثیر بر رشد سلول‌های یوکاریوت مخمری، بر مهار فاکتورهای بیماری‌زایی 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.
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, Brilhante 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.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 12:28 IRST on Friday February 22nd 2019

Daneshvar

Medicine

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

Daneshvar(medicine) shahed University/ 25th year/2018 /NO.134

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 Salehi[1], Mansour Bayat[1], Parviz Owlia[2]*, Seyed Latif Mousavi Gargari[3], Seyed Jamal Hashemi[4]

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 C*andida 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 C*andida 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*