

بررسی و مقایسه اثر ضد قارچی نانوامولسیون اسانس آویشن باغی در ترکیب با فلوکونازول علیه سویه استاندارد کاندیدا/آلبیکنس ATCC-10231 در شرایط برون تنی

مینا السادات محمدی^۱، آزاده غفاری^۲، سیما داراییان^۳، ثمینه جعفری^۴، سعید امانلو^۵

^۱کمپته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران، ^۲گروه کنترل غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران، ^۳گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران، ^۴گروه فارماکوکینزی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران، ^۵ایران.

تاریخ وصول: ۱۴۰۴/۰۷/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: گونه‌های کاندیدا/به ویژه کاندیدا/آلبیکنس به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های قارچی فرصت طلب، نقش مهمی در مرگ و میر ناشی از این عفونت‌ها دارند، با توجه به افزایش مقاومت به داروهای ضد قارچ هدف از این مطالعه تعیین و بررسی و مقایسه اثر ضد قارچی نانوامولسیون اسانس آویشن باغی در ترکیب با فلوکونازول علیه سویه استاندارد کاندیدا/آلبیکنس-ATCC 10231 در شرایط برون تنی بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۴۰۴ انجام شد. ابتدا نانوامولسیون اسانس تهیه و اندازه قطرات آن با استفاده از دستگاه DLS اندازه‌گیری و ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن باغی به وسیله GC-MS مشخص گردید. سپس با روش میکروبراث دایلوژن، MIC و MFC در برابر کاندیدا/آلبیکنس ATCC 10231 برای هر یک از ترکیبات تعیین گردید. همچنین برای بررسی نوع تعامل فلوکونازول و اسانس آویشن باغی از روش checkerboard استفاده شد و داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از شاخص ΣFIC برای هر نمونه محاسبه شد.

یافته‌ها: میانگین اندازه قطرات نانوامولسیون اسانس آویشن باغی ۴۳ نانومتر و پراکندگی آن برابر با ۰/۲۲ به دست آمد. عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شامل تیمول (۴۴/۷۹ درصد)، پارا ساین (۲۳/۲۵ درصد)، گاما ترپینن (۶/۵۵ درصد) و لینالول (۴/۵۵ درصد) بود. MIC فلوکونازول ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، MIC اسانس و نانوامولسیون آویشن باغی ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. اسانس آویشن با MFC، ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نانوامولسیون آویشن باغی با MFC، ۳۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر خاصیت *fungicide* دارند. ΣFIC ترکیب فلوکونازول با اسانس و با نانوامولسیون آویشن باغی، برابر با ۱/۵ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: اسانس و نانوامولسیون آویشن باغی، با ترکیب غالب تیمول، بر روی سویه استاندارد کاندیدا/آلبیکنس مؤثر بوده و اثرات ضد قارچی دارند، ولی نانوامولسیون اثر مهارکنندگی اسانس را تقویت نکرد. از طرفی ترکیب اسانس آویشن و فلوکونازول در بررسی تعامل دارویی در گروه بی تفاوت قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: نانوامولسیون، اسانس، آویشن باغی، فلوکونازول، کاندیدا/آلبیکنس، ضد قارچی.

*نویسنده مسئول: دکتر سعید امانلو، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

Email: s.amanloo@zums.ac.ir

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

گونه‌های *کاندیدا*، به ویژه *کاندیدا البیکنس* به طور طبیعی در سطوح مخاطی و پوست انسان زندگی می‌کنند (۱)، ولی در شرایط زمینه‌ای میزبان قابلیت ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های جلدی مخاطی تا تهاجمی منتشره را دارا می‌باشند (۲). *کاندیدا البیکنس* به عنوان مهم‌ترین گونه بیماری‌زا از جنس *کاندیدا* شناخته شده است و مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های کاندیدیازیس سطحی تا تهاجمی می‌باشد (۳ و ۴). در آخرین پژوهش‌های اپیدمیولوژیکی نیز *کاندیدا البیکنس* هم‌چنان عامل اصلی کاندیدیازیس تهاجمی معرفی شده، هرچند افزایش عفونت‌های غیرالبیکنس نظیر *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* در ده‌های اخیر گزارش شده است (۵ و ۶). فاکتورهای متعددی مانند تشکیل بیوفیلم و تغییر شکل هیفی (دی مورفیک) از عوامل اصلی پاتوژنز *کاندیدا البیکنس* می‌باشند (۶)، هم‌چنین استراتژی‌های فرار ایمنی می‌تواند در استقرار و انتشار عفونت‌های سیستمیک نقش داشته باشد (۷).

مقاومت به داروهای ضدقارچی یک چالش رو به رشد در مدیریت عفونت‌های *کاندیدا* می‌باشد. گزارش‌هایی از مقاومت چند دارویی در بین گونه‌های *کاندیدا* بویژه *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا اوریس* منتشر شده است (۸). افزایش شیوع عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میر بالا از پیامدهای بالینی مقاومت چند دارویی می‌باشد (۹). شیوع مقاومت دارویی عمدتاً به

دلیل استفاده زیاد از داروهای ضدقارچی می‌باشد طبق پژوهش‌های به عمل آمده شیوع مقاومت ضدقارچی در طول همه گیری COVID-19 بطور قابل توجهی افزایش یافته است (۱۰). مکانیسم‌های ژنتیکی پشتوانه مقاومت ضدقارچی متنوع است. تغییرات سازشی از جمله جهش‌های نقطه‌ای، افزایش فعالیت پمپ خروج و تشکیل بیوفیلم می‌توانند حساسیت ضدقارچی را کاهش دهند (۱۱). از طرفی چالش‌های درمانی به دلیل تنوع محدود داروهای ضدقارچی افزایش یافته است. مقاومت دارویی نسبت به درمان‌های رایج آزولی و پلی‌ان‌ها رو به افزایش است و منجر به نرخ مرگ و میر بالا و بستری طولانی مدت در بیمارستان می‌شود (۱۰).

گوودا و همکاران بر نقش محوری عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در توسعه داروهای ضدقارچی تأکید کردند (۱۲). با این وجود، مصرف مستقیم اسانس‌های گیاهی با محدودیت‌هایی از قبیل ماهیت هیدروفوبیک، واکنش‌پذیر و فرار بودن مولکول‌های بایواکتیو تشکیل دهنده اسانس را دارند. انکپسوله کردن اسانس‌های گیاهی در مقیاس نانو یک روش مناسب و کارا جهت افزایش پایداری فیزیکی ترکیبات بایواکتیو و محافظت آنها در واکنش با مواد دیگر است (۱۳). چراغی پور و همکاران گزارش کردند که فرمول‌های مبتنی بر فناوری‌های نانو به طور قابل توجهی فراهمی زیستی و اثر ضدقارچی کورکومین را بهبود می‌بخشد (۱۴).

آویشن باغی (*thymus vulgaris*) گیاهی چند ساله از خانواده Lamiaceae می باشد که در نقاط مختلف جهان رشد می کند (۱۵). این گیاه ترکیبات مختلف ضد میکروبی شناخته شده از جمله تیمول، کارواکرول و اوژنول دارد (۱۶). به طور سنتی از آویشن باغی در درمان سردرد، سرفه، اسهال، یبوست، ضد نفخ، درمان زگیل، درمان عفونت های انگلی و اختلالات عملکرد کلیه استفاده می شود (۱۷)، همچنین خاصیت ضد عفونی کننده، ضد میکروبی و خاصیت آنتی اکسیدان دارد (۱۸).

اثر ضدقارچی آویشن باغی به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است و در پژوهش های مختلف عصاره و اسانس آویشن باغی به عنوان یک ترکیب ضدقارچ طبیعی قوی گزارش شده است (۱۹).

الشهرانی و همکاران مطالعاتی در رابطه با خواص ضد میکروبی آویشن باغی در برابر هفت گونه از قارچ های پاتوژن و هم چنین اثر سیتوتوکسیک آن بر سلول های سرطانی پستان انسان انجام دادند. تمام سویه های قارچی مورد آزمایش به عصاره آویشن باغی حساس بودند. اثر مهاری این عصاره وابسته به دوز بوده و یک اثر مهاری قابل توجه ($p < 0.001$) در غلظت های ۲/۵-۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای همه قارچ های مورد آزمایش پیدا شد. در میان هفت گونه قارچی، کاندیدا بالاترین حساسیت را نشان داد. همچنین عصاره آویشن باغی، تکثیر سلول های سرطانی را به روشی وابسته به زمان و دوز مهار کرد (۲۰).

در مطالعه دیگری جفری و همکاران نشان دادند که آویشن باغی و تیمول منجر به کاهش معنی داری ($p < 0.05$) در تشکیل بیوفیلم کاندیدا می گردد. همچنین در پژوهش های میکروسکوپ نوری و SEM تیمول منجر به تجزیه و تغییر شکل سلول های بیوفیلم کاندیدا/البیکنس و کاهش تشکیل هایف در سلول های بیوفیلم کاندیدا/تروپیکالایس شد و اثر ضدقارچی قابل توجه آویشن باغی و تیمول بر روی بیوفیلم های ازپیش ساخته شده هر دو گونه کاندیدا/تروپیکالایس و کاندیدا/البیکنس ثبت شد. آویشن باغی و تیمول همچنین یک سینرژی آشکاری با فلوکونازول بر علیه رشد کاندیدا/البیکنس و کاندیدا/تروپیکالایس در هر دو حالت پلانکتونیک و بیوفیلم نشان دادند. با این حال، سینرژی با آمفوتریسین B به وضوح فقط در سلول های کاندیدا/پلانکتونیک دیده شد. عصاره آویشن باغی و تیمول به تنهایی یا در ترکیب با داروهای ضدقارچ می توانند به عنوان یک آنتی بیوفیلم امیدوار کننده در برابر سویه های مقاوم به داروی گونه های کاندیدا عمل کنند و در رابطه با اثر سینرژیکی آن به بررسی های بیشتری در محیط in vivo نیاز است (۲۱). با توجه به اثرات مطلوب ضدقارچی آویشن باغی و مزایای اثبات شده نانومولوسیون ها، لذا هدف از این مطالعه تعیین، بررسی و مقایسه اثر ضد قارچی نانومولوسیون اسانس آویشن باغی در ترکیب با فلوکونازول علیه سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC-10231 در شرایط برون تنی بود.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی می باشد که در سال ۱۴۰۴ انجام شد. جهت تهیه نانوامولسیون توئین ۸۰ از شرکت مرک آلمان و اسانس آویشن باغی از شرکت باریج اسانس تهیه شد. نانوامولسیون تهیه شده در این مطالعه حاوی ۲ درصد (W/V) از اسانس آویشن باغی، ۲ درصد (W/V) از توئین ۸۰ و ۹۶ درصد (V/V) آب بوده است. جهت تهیه نانوامولسیون، ۴۰۰ میلی گرم از توئین ۸۰ با استفاده از ترازو وزن شد و به ۲۰ میلی لیتر از آب دیونیزه اضافه شد و کاملاً حل شد. سپس این محلول به صورت آهسته و پیوسته به ۴۰۰ میلی گرم از اسانس در حین هم زدن با استفاده از استیرر اضافه شد تا امولسیون درشت تشکیل شود. سپس امولسیون درشت تهیه شده با استفاده از پروب سونیکاتور (Hielscher, UP200H, Germany) با فرکانس ۲۴ کیلوهرتز و شدت ۲۰۰ وات و توان ۱۰۰ درصد به مدت ۵ دقیقه در حمام یخ سونیکه، ریز شد.

به منظور بررسی پراکندگی و اندازه قطرات نانوامولسیون های تهیه شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد از دستگاه نانوسایزر (Malver Zetasizer, 2000 HS, Malvern, UK) مجهز به لیزر سبز با طول موج ۶۳۳ نانومتر به روش تفرق دینامیک نور استفاده شد. نانوامولسیون های روغن در آب قبل از اندازه گیری به نسبت ۱ به ۲۰۰ با آب مقطر رقیق شدند.

مهم ترین خروجی دستگاه مذکور، به صورت داده های Z-Average و PDI (polydispersity index) هستند که به ترتیب بیانگر میانگین اندازه قطرات و توزیع یا پراکندگی اندازه قطرات در نانوامولسیون هستند.

برای شناسایی اجزای تشکیل دهنده اسانس آویشن باغی از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی بر طیف سنجی جرمی (MS-GC) از نوع Agilent 7890A/5975C مجهز به ستون موئین نیمه قطبی دیگری HP ms-۵ به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. اسانس رقیق شده با نسبت ۱:۱۰ در هگزان با حجم ۰/۱ میکرولیتر با استفاده از روش اسپلیت (۵۰:۱) تزریق شد. هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. دمای محفظه تزریق و دمای کمی به ترتیب ۲۶۰ درجه سانتی گراد و ۲۷۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. برنامه دما از ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه شروع شد، با سرعت ۳ درجه سانتی گراد در دقیقه به ۱۰۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت و به مدت ۲ دقیقه به صورت همدا در ۱۰۰ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. سپس دما با سرعت ۴ درجه سانتی گراد در دقیقه به ۲۵۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد ثابت ماند. ترکیبات با مقایسه طیف آنها با داده های کتابخانه پایگاه داده Wiley و کتابخانه طیف جرمی موسسه ملی استاندارد و فناوری (NIST) شناسایی شدند. علاوه بر این،

شاخص بازداري (AI) اجزاء با استفاده از استانداردهای نرمال آلکان ۹ تا ۲۳ کربنه همان طور که در آدامز (۲۲) بیان شده است، تعیین شد و برای تأیید شناسایی ترکیبات استفاده شد.

آزمایش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) داروی فلوکونازول، اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی به روش براث میکرودايلوشن طبق استاندارد CLSI شماره M27-A3 و M27-S4 علیه سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC 10231 انجام شد (۲۴ و ۲۳).

آزمایش حداقل غلظت کشنده (MFC) داروی فلوکونازول، اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی علیه سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC 10231 انجام شد. به منظور تعیین MFC از محتویات چاهک مربوط به MIC و چاهک های قبل از آن (عدم رشد مخمر) به میزان ۱۰ میکرولیتر به پلیت ۸ سانتی متری حاوی محیط کشت (Sabouraud Dextrose Agar) در چند نقطه و دور از هم انتقال داده و پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری شد. پس از رشد قارچ ها، غلظتی که قارچ ها در آن رشد نکرده بود به عنوان MFC در نظر گرفته شد.

در این مطالعه برای تعیین نوع برهم کنش آویشن باغی و نانوامولسیون آن در ترکیب با داروی فلوکونازول، از روش چکربورد و با استاندارد

پیشنهادی M27-A3 استفاده شد (۲۵ و ۲۴). بدین منظور سریال رقت ۱/۲ با دامنه غلظتی ۰/۰۷۸-۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر برای اسانس و نانوامولسیون آویشن باغی و دامنه غلظتی ۰/۰۶۲۵-۰/۰۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر برای فلوکونازول در محیط RPMI 1640 (DNAbiotech) و در حجم بالا تهیه گردید. سپس طبق الگوی چکربورد به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای به نسبت ۵۰ درصد از هر دارو اضافه شد تا سریال رقت ترکیب دارویی چکربورد به دست آید. در مرحله بعدی سوسپانسیون قارچی با غلظت $10^3 \times 5/5 - 2/0$ CFU/ml تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک های حاوی دارو اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، نتایج به صورت چشمی قرائت شد. کلیه آزمایش ها با سه بار تکرار به انجام رسید و در هر پلیت کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد.

نتایج به دست آمده از آزمایش چکربورد برای تعیین نوع تعامل بین دو دارو و تعیین سینرژی مورد استفاده قرار گرفت. شاخص ΣFIC برای هر نمونه به طور مستقل و طبق معادله جبری مطابق با شکل ۱ به انجام رسید. سپس از طریق الگوی تفسیر FICI، نوع برهم کنش فلوکونازول - اسانس آویشن باغی و فلوکونازول - نانوامولسیون آویشن باغی به دست آمد (شکل ۱) (۲۵).

$$FIC^{(i)} = \frac{MIC(a) \text{ in combination with } (b)}{MIC(a) \text{ independently}}$$

$$FIC^{(ii)} = \frac{MIC(b) \text{ in combination with } (a)}{MIC(b) \text{ independently}}$$

The sum of the FIC or FIC index is thus calculated as:

$$\Sigma FIC = FIC^{(i)} + FIC^{(ii)}$$

شکل ۱: فرمول اندازه گیری شاخص ΣFIC

یافته‌ها

در این تحقیق، اندازه‌گیری اندازه قطرات نانوامولسیون اسانس آویشن انجام شد. نتایج آزمایش‌ها نشان‌دهنده اندازه‌گیری اندازه قطرات در نمونه نانوامولسیون اسانس آویشن به شرح زیر است: Z-Average اندازه قطرات نانوامولسیون آویشن برابر با 43 ± 37 (تعداد = ۳ و انحراف معیار $\pm$ میانگین) به دست آمد. شاخص توزیع اندازه قطرات (PDI) برای نانوامولسیون‌های تهیه شده (تعداد = ۳ و انحراف معیار $\pm$ میانگین) برابر با 0.22 ± 0.13 به دست آمد. مقدار PDI کمتر از ۰/۳ معمولاً نشان‌دهنده توزیع خوب اندازه قطرات در نانوامولسیون است، بنابراین مقدار PDI به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که قطرات نانوامولسیون آویشن به طور یکنواخت و با اندازه‌ای مناسب توزیع شده‌اند. شاخص پراکندگی یکی از نانوامولسیون‌های تهیه شده در شکل ۲ آورده شده است.

با بررسی طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداری ترکیبات جداشده به روش کروماتوگرافی گازی، ۲۹ ترکیب شناسایی شدند که در مجموع ۹۹/۹۶ درصد اجزای اسانس را تشکیل می‌دادند (جدول ۱)،

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس را به همراه شاخص بازداری و درصد نسبی آنها نشان می‌دهد. عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس عبارتند از: تیمول (۴۴/۷۶ درصد)، پارا ساین (۲۳/۲۵ درصد)، گاما ترپینن (۶/۵۵ درصد) و لینالول (۴/۵۵ درصد). با توجه به ترکیبات جدول، اسانس بررسی شده دارای درصد بالایی ترکیبات فنولی شامل تیمول و کارواکرول می‌باشد (۴۷/۸۵ درصد).

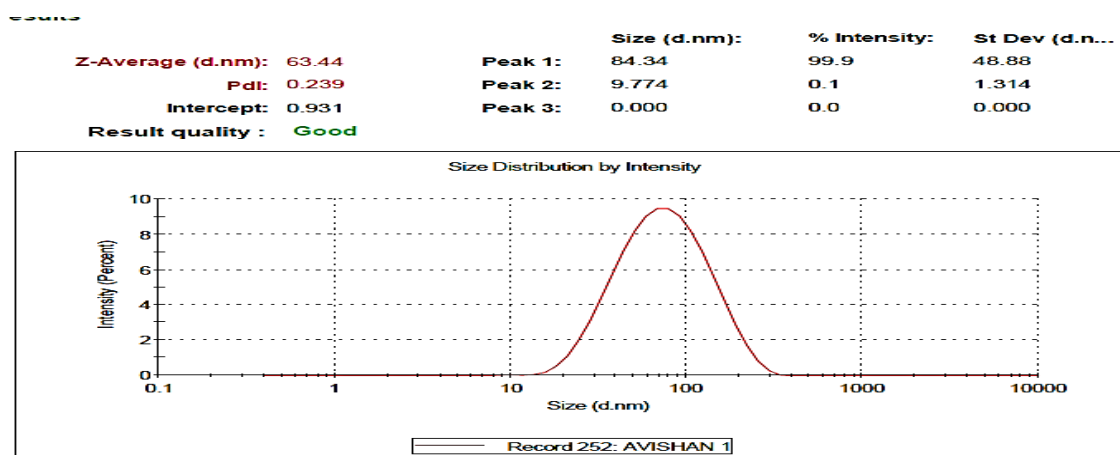
آزمایش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) داروی فلوکونازول، اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی به روش میکروبراث دایلوژن طبق استاندارد CLSI علیه سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC 10231 انجام شد. نتایج آزمایش MIC داروی ضد قارچی فلوکونازول، اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی در جدول ۲ نشان داده شده است. طبق این نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی فلوکونازول یک میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی با غلظت ۰/۱۵۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی کاندیدا/البیکنس اثر مهاری داشته است.

مدل ارایه شده، سینرژی با شاخص ($\Sigma FIC \leq 0.5$)، اثر افزایشی ($\Sigma FIC > 0.5-1$)، عدم اینتراکشن ($\Sigma FIC > 4$) و آنتاگونیسم ($\Sigma FIC > 0.5-4.0$) توصیف شده است. اثر ضدقارچی اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی به صورت مستقل و همچنین در ترکیب با داروی فلوکونازول در آزمایش چکربورد به صورت شاخص ΣFIC نشان داده شده است (جدول ۵ و ۴).

با توجه به نتایج به دست آمده در جداول ۴ و ۵ ترکیب دارویی فلوکونازول - اسانس آویشن باغی و همچنین فلوکونازول- نانوامولسیون اسانس آویشن باغی بر روی کاندیدا /آلبیکنس ATCC10231 اثر Indifference یا non-interactive داشت.

مقادیر MFC به دست آمده برای فلوکونازول، اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی نسبت به سویه استاندارد کاندیدا /آلبیکنس ATCC 10231 در جدول ۳ نشان داده شده است. همان گونه که انتظار می رفت باتوجه به ماهیت مهار کنندگی رشد (Fungistatic) داروی فلوکونازول، آزمایش MFC برای این دارو منفی بود.

به منظور بررسی نوع برهم کنش داروی فلوکونازول در ترکیب با اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی در برابر سویه استاندارد کاندیدا /آلبیکنس ATCC 10231، از آزمایش چکربورد استفاده شد و شاخص ΣFIC در تفسیر اثر متقابل داروهای ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت. طبق آخرین



شکل ۲: منحنی سایز و پراکندگی سایز نانوامولسیون تهیه شده با استفاده از دستگاه نانو سایزر (Malver Zetasizer, 2000 HS, Malvern, UK)

جدول ۱: ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن باغی به دست آمده از آزمایش کروماتوگرافی گازی

ردیف	ترکیب	شاخص بازداري	درصد
۱	Tricyclene	۹۲۵	۰/۱۶
۲	α -Pinene	۹۳۸	۱/۱۹
۳	Camphene	۹۵۰	۱/۸۵
۴	β -Pinene	۹۷۶	۰/۱۱
۵	p-Menth-4(8)-ene	۹۷۹	۰/۰۵
۶	trans- p -Menthane	۹۸۱	۰/۰۲
۷	Myrcene	۹۹۰	۱/۱۵
۸	cic- p -Menthane	۹۹۵	۰/۱۷
۹	δ -2-Carene	۱۰۰۶	۲/۶۲
۱۰	p-Cymene	۱۰۲۶	۲۳/۳۵
۱۱	Limonene	۱۰۳۱	۰/۴۵
۱۲	1,8-Cineole	۱۰۳۷	۳/۹۳
۱۳	γ -Terpinene	۱۰۵۹	۶/۵۵
۱۴	Terpinolene	۱۰۹۱	۰/۲۷
۱۵	Linalool	۱۰۹۷	۴/۵۵
۱۶	Isoborneol	۱۱۶۰	۰/۳۵
۱۷	Borneol	۱۱۷۱	۰/۵۹
۱۸	Terpinen-4-ol	۱۱۷۸	۰/۶۲
۱۹	α -Terpineol	۱۱۹۰	۰/۵۲
۲۰	γ -Terpineol	۱۲۰۳	۰/۱۷
۲۱	Nerol	۱۲۳۱	۰/۱۰
۲۲	linalool acetate	۱۲۶۲	۰/۳۴
۲۳	Geraniol	۱۲۶۹	۰/۳۰
۲۴	Thymol	۱۲۹۳	۴۴/۷۹
۲۵	Carvacrol	۱۳۰۲	۳/۰۹
۲۶	Unknown		۰/۰۴
۲۷	1S,2S,5R-1,4,4-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(2,5)]dodec-8(9)-ene	۱۳۹۰	۰/۰۵
۲۸	Caryophyllene <(E)->	۱۴۲۳	۲/۸۹
۲۹	Humulene	۱۴۷۰	۰/۰۲

جدول ۲: نتایج MIC داروی فلوکونازول، اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی به روش میکروبراث دایلوژن علیه

سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC 10231

حد اقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC)	حد اقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC)	حد اقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC)
فلوکونازول میکروگرم بر میلی لیتر	اسانس آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر	نانو امولسیون آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر
۱	۱۵۶/۲۵	۱۵۶/۲۵

جدول ۳: نتایج MFC داروی فلوکونازول، اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی به روش میکروبراث دایلوشن علیه سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC 10231

حداقل غلظت کشنده (MFC)	حداقل غلظت کشنده (MFC)	حداقل غلظت کشنده (MFC)
فلوکونازول میکروگرم بر میلی لیتر	اسانس آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر	نانو امولسیون آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر
N/A	۱۵۶/۲۵	۳۱۲/۵

N/A - not applicable

جدول ۴: نتایج برهم کنش ترکیب دارویی فلوکونازول و اسانس آویشن باغی بر روی سویه های استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC 10231 در آزمایش چکربورد

واکنش متقابل داروها	روش استاندارد (اثر مستقل)	روش ترکیبی (چکربورد)	FICI	تفسیر نتیجه
فلوکونازول میکروگرم بر میلی لیتر	اسانس آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر	فلوکونازول میکروگرم بر میلی لیتر	اسانس آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر	
۱	۱۵۶/۲۵	۰/۵	۱۵۶/۲۵	Indifference (noninteractive) ۱/۵

جدول ۵: نتایج برهم کنش ترکیب دارویی فلوکونازول و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی بر روی سویه های استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC 10231 در آزمایش چکربورد

واکنش متقابل داروها	حداقل غلظت مهار کننده رشد	روش استاندارد (اثر مستقل)	روش ترکیبی (چکربورد)	FICI	تفسیر نتیجه
فلوکونازول میکروگرم بر میلی لیتر	نانوامولسیون اسانس آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر	فلوکونازول میکروگرم بر میلی لیتر	نانوامولسیون اسانس آویشن باغی میکروگرم بر میلی لیتر		
۱	۳۱۲/۵	۰/۵	۳۱۲/۵	۱/۵	Indifference (noninteractive)

بحث

باتوجه به اثرات ضدقارچی اسانس آویشن باغی و مزایای اثبات شده استفاده از سیستم های دارورسانی نانوامولسیون (۱۹)، این مطالعه با هدف تعیین، بررسی و مقایسه اثر ضدقارچی نانوامولسیون اسانس آویشن باغی در ترکیب با فلوکونازول علیه سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ATCC-10231 در شرایط برون تنی به انجام رسید.

حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس آویشن باغی و نانوامولسیون آن بر روی سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس ۱۵۶/۲۵ میکرو گرم بر میلی لیتر به

دست آمد. بنابراین تهیه نانوامولسیون مانع اثربخشی اسانس آویشن باغی نشده است. از طرفی جدول ۳ نشان می دهد که حداقل غلظت کشنده (MFC) اسانس آویشن باغی ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی ۳۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد، به عبارت دیگر، سیستم نانوامولسیون تأثیر مثبتی بر اثر قارچ کشی اسانس آویشن باغی ایجاد نکرده است. با این وجود، مزایای دیگر این سیستم برای اسانس ها از قبیل ممانعت از فراریت، کاهش واکنش پذیری و بهبود پراکندگی در آب باید در نظر گرفته شود (۱۳). با توجه به این که در این

مطالعه مقدار Z-Average برابر ۴۳ نانومتر و PDI برابر با ۰/۲۲ به دست آمد. اندازه متوسط قطرات و توزیع مناسب اندازه قطرات در نانوامولسیون اسانس آویشن، آن را به یک سیستم مناسب جهت کاربردهای زیستی، از جمله در تهیه ترکیبات ضد قارچی تبدیل می‌کند.

همچنین طبق نتایج به دست آمده ترکیب دارویی فلوکونازول - اسانس آویشن باغی و همچنین فلوکونازول - نانوامولسیون اسانس آویشن باغی بر روی *کاندیدا/آلبیکنس* ATCC10231 اثر هم‌افزایی یا سینرژی نداشته و بی‌تأثیر (Indifference) بودند. با این توضیح که نتایج هر دو آزمایش اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی با داروی فلوکونازول بسیار نزدیک به دامنه additive می‌باشد.

در رابطه با اثر ضدقارچی اسانس آویشن باغی بررسی‌های متعددی انجام شده است؛ الشهرانی و همکاران بر روی اثرات ضدقارچی اسانس آویشن باغی، در برابر هفت گونه از قارچ‌های پاتوژن مطالعه کردند که در مطالعه آنها، تمامی گونه‌های قارچی مورد آزمایش به اسانس آویشن باغی حساس بودند که در میان هفت گونه قارچ آزمایش شده، گونه *کاندیدا* بیشترین حساسیت را نشان داد. همچنین در مطالعه آنها، اثر مهاري اسانس آویشن باغی وابسته به دوز بوده و این اسانس یک اثر مهاري قابل توجه در غلظت‌های ۱۰-۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر علیه گونه *کاندیدا* داشت (۲۰). در مطالعه حال حاضر نیز، اثر ضدقارچی اسانس آویشن باغی با MIC

برابر با ۰/۱۵۶ mg/ml مشهود است. این نتایج، در کنار نتایج مطالعه الشهرانی و همکاران، نشان دهنده پتانسیل بالای این اسانس در مهارکنندگی رشد قارچ می‌باشد. باج و همکاران به مطالعه اثرات ضدقارچی اسانس‌های گیاهی پرداختند (۲۶). اسانس‌های مورد آزمایش آنها، *Origanum vulgare*, *Satureja*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum* و *hortensis* بود و فعالیت ضدقارچی این اسانس‌ها علیه ایزوله‌های بالینی کاندیدای دهانی بررسی شد. و پس از تعیین MIC و MFC اسانس‌ها، مشخص شد که در میان اسانس‌های مورد مطالعه، اسانس آویشن باغی دارای بیشترین فعالیت مهارکنندگی و قارچ‌کشی علیه ایزوله بالینی *کاندیدا* دهانی است. نتایج این مطالعه نیز، مانند مطالعه حاضر، نشان دهنده اثر مهارکنندگی و قارچ‌کشی اسانس آویشن باغی در برابر *کاندیدا* می‌باشد، با این تفاوت که مطالعه باج و همکاران، بر روی نمونه‌های بالینی *کاندیدا* دهانی انجام شده است و این نکته می‌تواند امیدواری‌ها نسبت به اثربخشی بالقوه اسانس آویشن باغی در شرایط *in vivo* را تقویت نماید و زمینه‌ساز انجام پژوهش‌های بیشتر در مدل‌های حیوانی یا انسانی گردد. هادل سادون و همکاران به بررسی اثربخشی اسانس آویشن بر روی *کاندیدا/آلبیکنس* موجود در سیستم کانال ریشه دندان و مقایسه توانایی حذف *کاندیدا/آلبیکنس*، به وسیله این اسانس در مقایسه با خمیر آنتی‌بیوتیکی سه گانه پرداختند. در مطالعه آنها، ایزوله‌های *کاندیدا/آلبیکنس* از بیمارانی با نیاز به درمان‌های اندودنتیک، جمع‌آوری

شد. یافته‌های مطالعه آنها نیز نشان داد که اسانس آویشن با ترکیب غالب تیمول (۲۵/۴۸ درصد) دارای فعالیت ضدقارچی معنی‌دار و وابسته به دوز علیه کاندیدا/آلبیکنس بوده و این اسانس هم توانایی مهار رشد و هم توانایی کشتن قارچ کاندیدا/آلبیکنس را دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس آویشن باغی می‌تواند به عنوان یک گزینه مؤثر در درمان‌های اندودنتیک استفاده شود (۲۷). نتایج مطالعه حال حاضر که به بررسی اثر ضدقارچی اسانس آویشن باغی با ترکیب غالب تیمول ۴۴/۷۹ درصد، بر روی سویه استاندارد کاندیدا/آلبیکنس در محیط آزمایشگاهی پرداخت تا حد زیادی با نتایج مطالعه هادل سادون مطابقت دارد و هر دو اسانس آویشن باغی استفاده شده دارای ترکیب غالب تیمول و اثر ضدقارچی علیه کاندیدا/آلبیکنس هستند. عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن باغی استفاده شده در مطالعه حاضر تیمول (۴۴/۷۶ درصد)، پارا ساین (۲۳/۳۵ درصد)، گاما ترپینن (۶/۵۵ درصد) و لینالول (۴/۵۵ درصد) می‌باشد.

کومار و همکاران به بررسی اثر ضدقارچی اسانس آویشن و تیمول موجود در آن در برابر قارچ‌های کاندیدا و موکور پرداختند (۲۸). در مطالعه آن‌ها اسانس آویشن و تیمول موجود در آن، به طور قابل توجهی فاکتورهای بیماری‌زا (مانند پروتئاز و همولیز و آبگریزی) دو قارچ پاتوژن موکور و کاندیدا را کاهش داد. نتایج مطالعه حال حاضر نیز، اثر ضدقارچی آویشن باغی و تیمول موجود در آن را

تأیید می‌کند. الشیخ و همکاران تیمول را با ۶۸/۱ درصد ترکیب اصلی اسانس آویشن باغی معرفی کردند. هم‌چنین کارآیی آن را در برابر ایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول نشان دادند، به طوری که اسانس آویشن باغی در مقایسه با فلوکونازول دارای اثر ضدقارچی بارزتری بوده و در غلظت پایین (۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کاهش قابل توجه در رشد و تشکیل لوله زایا در کاندیدا/آلبیکنس را نشان داد (۲۹). اثر ترکیبی اسانس آویشن باغی و فلوکونازول نسبت به کاندیدا/آلبیکنس در پژوهش‌های متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. پروسکووکا و همکاران قدرت مهارتی (MIC) اسانس آویشن باغی را ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند که در مقایسه با سایر اسانس‌های مورد مطالعه، *Hyssopus officinalis* (۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و *Rosmarinus officinalis* (۲۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و *Salvia officinalis* (۶۰۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اثر ضدقارچی بهتری داشت. با این وجود، آویشن باغی در ترکیب با فلوکونازول بر روی ایزوله‌های بالینی کاندیدا/آلبیکنس اثر سینرژیسیم (FICI=۰/۸۱) نشان نداد (۳۰). این نتایج با یافته‌های مطالعه اخیر از نظر MIC و سینرژیسیم تا حد زیادی مطابقت دارد.

در مقابل نفیس و کارآیی آویشن باغی استخراج شده از مراکش (*Thymus atlanticus*) را در ترکیب با فلوکونازول نسبت به کاندیدا/آلبیکنس، کاندیدا/گلبراتا، کاندیدا/کروزه‌ای و کاندیدا/پاراپسیلوزیس ارزیابی نموده و به مقادیر پایین تری

از ۲۸/۰/۲۵-۰ FICI=۰ دست یافتند که نشان دهنده سینرژیسم بالای آویشن با فلوکونازول می‌باشد (۳۱). البته باید در نظر گرفت که ترکیبات فعال و غلظت آنها ممکن است به طور قابل توجهی در بین آماده‌سازی‌های مختلف اسانس‌های گیاهی متفاوت باشد و بر تعامل آنها با داروهای ضدقارچی استاندارد تأثیر بگذارد. طبق آنالیز نتایج MS-GC انجام شده در مطالعه نفیس و همکاران، ترکیبات فعال اصلی آویشن atlanticus استخراج شده از مراکش، شامل ۲۱/۶۲ درصد کارواکرول و ۲۱/۱۳ درصد بورنتول بوده است در حالیکه ترکیبات فعال اسانس آویشن استفاده شده در مطالعه حاضر شامل ۴۴/۷۶ درصد Thymol، ۲۲/۳۵ درصد p-Cymene و ۳/۰۹ درصد Carvacrol بوده است که همین تفاوت‌ها می‌تواند از علل تفاوت در نوع تعامل با فلوکونازول باشد. همچنین عوامل مختلفی از جمله موقعیت جغرافیایی، آب و هوا، بخش‌های مختلف گیاه و حتی فصل جمع‌آوری گیاه می‌تواند در اجزا و غلظت ترکیبات استخراج شده از گیاه مؤثر باشد (۳۲).

ارمنلیوا و همکاران به بررسی اثر ضدقارچی آویشن و پونه کوهی و ارزیابی سینرژی آنها با داروهای سنتزی فلوکونازول و نیستاتین در برابر قارچ *کاندیدا* پرداختند (۳۳). نتایج مطالعه آنها نشان داد که تعامل فلوکونازول با اسانس آویشن باغی، در ترکیب ۹/۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فلوکونازول با ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس، با $FICI = 0/49$ از نوع سینریژیک بوده است. در سایر غلظت‌های مختلف

از عوامل ضد میکروبی، تعامل از نوع افزایشی یا تداخلی است. نتایج این مطالعه نیز با نتایج مطالعه حاضر تفاوت داشته است که علت این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در غلظت دارو اسانس و روش آماده‌سازی مواد باشد.

دوگیش و همکاران اثر ضدقارچی اسانس و نانوامولسیون تیموس و لگاریس را بر روی سه گونه *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس برازیلینسیس* و *کاندیدا البیکنس* مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد که نانوامولسیون تیموس و لگاریس فعالیت ضدقارچی امیدوار کننده‌ای در برابر قارچ‌های رشته‌ای داشت، درحالی که فعالیت ضدقارچی ضعیف تری نسبت به *کاندیدا البیکنس* نشان داد (۳۴). همچنین ساختار نانوامولسیون تیموس و لگاریس اثرات ضدقارچی بهتری نسبت به اسانس آن داشت. در حالی که در مطالعه حاضر فرمولاسیون نانوامولسیون تأثیر مثبتی بر اثر قارچ‌کشی آویشن باغی ایجاد نکرده بود. البته بررسی ویژگی‌های ساختار نانو در شرایط *in vivo* ضرورت دارد، زیرا رویکرد نانو فرمولاسیون به طور بالقوه فراهمی زیستی و پایداری اسانس را افزایش می‌دهد و در نتیجه خواص ضد قارچی نانوامولسیون ممکن است در شرایط *in vivo* بهبود یابد.

هوروات و همکاران خواص ضدقارچی آویشن باغی را به طور مستقل و هم در ترکیب با اسانس‌های مختلف دیگر بر روی *کاندیدا البیکنس* بررسی و حداقل غلظت مهاری کمتر از یک میلی‌گرم

بر میلی به دست آوردند. این مطالعه نشان داد در حالی که آویشن باغی فعالیت ضدقارچی مؤثری علیه کاندیدا دارد، ولی ترکیب آن با سایر اسانس‌های گیاهی از جمله Citronella، Cinnamon و Spearmint تا حد زیادی اثر بی‌تفاوت (indifference) نشان داد (۳۵).

در این مطالعه اثر ضدقارچی و اثر سینرژی اسانس و نانوامولسیون آویشن باغی بر روی سویه استاندارد کاندیدا /البیکنس ATCC 10231 مورد ارزیابی قرار گرفت. هرچند استفاده از روش استاندارد CLSI و همچنین سویه استاندارد قارچی قابلیت تکرارپذیری مطالعه را افزایش می‌دهد، ولی عدم بررسی ایزوله‌های بالینی کاندیدا اصلی‌ترین محدودیت این مطالعه می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود اثر ضدقارچی و اثر سینرژیسیم اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن باغی بر روی ایزوله‌های بالینی حساس و مقاوم به داروهای ضدقارچی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد اگرچه آویشن باغی دارای برخی ترکیبات ضدقارچی ذاتی بوده و اثر مهارتی قابل قبولی در برابر کاندیدا /البیکنس دارد، ولی اثر فلوکونازول را به طور قابل توجهی بر ضد کاندیدا /البیکنس تقویت نکرد. هرچند این مطالعه در شرایط برون تنی انجام شده است و نیاز به آزمایش‌های

حیوانی و ارزیابی قابلیت کاربرد آن در شرایط بالینی را دارد. از طرفی اختلاف نظر در اثربخشی فلوکونازول - اسانس آویشن باغی در بررسی‌ها نیاز به رویکرد سیستماتیک برای روشن کردن مکانیسم اثر، غلظت بهینه و فرمولاسیون مورد نیاز برای کاربردهای بالینی مؤثر دارد. با توجه به شیوع روزافزون مقاومت ضدقارچی، پژوهش‌های آینده بر روی ترکیبات زیست تخریب‌پذیر و طبیعی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از جمله تیموس و لگاریس ضروری است، این تحقیقات باید در مسیر کارآزمایی بالینی برای اثبات و انتقال یافته‌های آزمایشگاهی به استراتژی‌های درمانی قابل اجرا در اولویت قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مساعدت و حمایت‌های مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زنجان تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکترای پزشکی عمومی با کد اخلاق IR.ZUMS.BLC.1401.029 از دانشگاه علوم پزشکی زنجان می باشد.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان این مقاله در تمامی مراحل همکاری و مشارکت داشته‌اند؛ طراحی مطالعه: سعید امانلو، آزاده غفاری. آزمایش‌های میکروبی: سعید امانلو، مینا محمدی. تفسیر نتایج میکروبی: سعید امانلو، دکتر سیما دارابی‌ان. تهیه نانوامولسیون: آزاده غفاری. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن باغی: ثمینه جعفری. نوشتن مقاله: سعید امانلو، دکتر آزاده غفاری.

REFERENCES

1. Pfaller MA, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20(1): 133-63.
2. Pankhurst CL. Candidiasis (oropharyngeal). *BMJ Clinical Evidence* 2012; 2012: 1304.
3. Hsu H, Sheth CC, Veses V. Herbal extracts with antifungal activity against *Candida albicans*: A systematic review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2021; 21(1): 90-117.
4. del Rocío Reyes-Montes M, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías-De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología* 2017; 34(4): 203-10.
5. Asogan M, Kim HY, Kidd S, Alastruey-Izquierdo A, Govender NP, Dao A, Shin JH, Heim J, Ford NP, Gigante V, Sati H. *Candida parapsilosis*: A systematic review to inform the World Health Organization fungal priority pathogens list. *Medical Mycology* 2024; 62(6): 131.
6. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology* 2015; 41(2): 208-17.
7. Strickland AB, Shi M. Mechanisms of fungal dissemination. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021; 78(7): 3219-38.
8. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of Infectious Diseases* 2017; 216(suppl_3): S445-51.
9. Spivak ES, Hanson KE. *Candida auris*: an emerging fungal pathogen. *Journal of Clinical Microbiology* 2018; 56(2): 10-128.
10. Kariyawasam RM, Julien DA, Jelinski DC, Larose SL, Rennert-May E, Conly JM, et al. Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019–June 2021). *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2022; 11(1): 45.
11. Zhao Y, Ye L, Zhao F, Zhang L, Lu Z, Chu T, et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. *Infectious Diseases of Poverty* 2023; 12(02): 1-8.
12. Gowda DV, Afrasim M, Meenakshi SI, Manohar M, Hemalatha S, Siddaramaiah H, et al. A paradigm shift in the development of anti-*Candida* drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2019; 19(28): 2610-28.
13. Donsì F, Annunziata M, Vincenzi M, Ferrari G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology* 2012; 159(4): 342-50.
14. Cheraghpour K, Ezatpour B, Masoori L, Marzban A, Sepahvand A, Rouzbahani AK, et al. Anti-*Candida* activity of curcumin: A systematic review. *Current Drug Discovery Technologies* 2021; 18(3): 379-90.
15. Shabnum S, Wagay MG. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *J Res Dev* 2011; 11: 83-94.
16. Ozcan M, Chalchat JC. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. Growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 2004; 30(3-4): 68-73.
17. Simon JE, Morales MR, Phippen WB, Vieira RF, Hao Z. Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. *Perspectives on new Crops and New Uses* 1999; 16: 499-505.
18. Baranauskienė R, Venskutonis PR, Viškelis P, Dambrauskienė E. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food chemistry* 2003; 51(26): 7751-8.
19. Kohiyama CY, Ribeiro MM, Mossini SA, Bando E, da Silva Bomfim N, Nerilo SB, et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry* 2015; 173: 1006-10.
20. Al-Shahrani MH, Mahfoud M, Anvarbatcha R, Athar MT, Al Asmari A. Evaluation of antifungal activity and cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil. *Pharmacogn Commun* 2017; 7: 34-40.
21. Jafri H, Ahmad I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de Mycologie Medicale* 2020; 30(1): 100911.
22. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, 2001.
23. CaLSI (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts asm-aclsi. 2nd ed. USA: wayne Ind; 2008.
24. CaLSI (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts AsM-SCLSI. Wayne, Ind, USA: Fourth informational supplement; 2012.

- 25.Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52(1): 1-1.
- 26.Baj T, Biernasiuk A, Wróbel R, Malm A. Chemical composition and in vitro activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils towards oral isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Open Chemistry* 2020; 18(1): 108-18.
- 27.Sadoon Abd H, Al Haidar AH. Comparison of antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil and triple antibiotic paste against *Candida albicans* isolated from root canal (In Vitro Study). *F1000Research* 2024; 13: 381.
- 28.Kumar D, Ansari A, Bajpai AB, Rai N, Kumar N. *Thymus vulgaris* L.(Thyme): A herbal remedy against fungal infections. *Environment Conservation Journal* 2025; 26(1): 219-25.
- 29.Alshaikh NA, Perveen K. Susceptibility of fluconazole-resistant *Candida albicans* to thyme essential oil. *Microorganisms* 2021; 9(12): 2454.
- 30.Proškovcová M, Čonková E, Váczi P, Marcinčáková D, Harčárová M. Efficacy of Lamiaceae essential oils with selected azoles against *Candida albicans* clinical isolates. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2022; 25(2): 279-85.
- 31.Nafis A, Iriti M, Ouchari L, El Otmani F, Marraiki N, Elgorban AM, et al. New insight into the chemical composition, antimicrobial and synergistic effects of the Moroccan endemic *Thymus atlanticus* (Ball) Roussine essential oil in combination with conventional antibiotics. *Molecules* 2021; 26(19): 5850.
- 32.Zarshenas MM, Krenn L. A critical overview on *Thymus daenensis* Celak.: phytochemical and pharmacological investigations. *Journal of Integrative Medicine* 2015; 13(2): 91-8.
- 33.Ermenlieva N, Georgieva E, Mihaylova S, Stamova S, Laleva K, Tsankova G, et al. Synergistic interaction between Lamiaceae essential oils and antifungal drugs against *Candida albicans* ATCC 10231. *Farm J* 2022; 70: 720-72.
- 34.Doghish AS, Shehabeldine AM, El-Mahdy HA, Hassanin MM, Al-Askar AA, Marey SA, AbdElgawad H, Hashem AH. *Thymus vulgaris* oil nanoemulsion: synthesis, characterization, antimicrobial and anticancer activities. *Molecules* 2023; 28(19): 6910.
- 35.Horváth G, Jenei JT, Vágvölgyi C, Böszörményi A, Krisch J. Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. *Acta Biologica Hungarica* 2016; 67(2): 205-14.

In Vitro Antifungal Evaluation of Thymus Vulgaris Essential Oil Nanoemulsion Alone and in Combination with Fluconazole Against Candida Albicans

Mohammadi MS¹, Ghaffari A², Darabian S³, Jafari S⁴, Amanloo S³

¹Student Research Committee, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran, ²Department of Food and Drug Control, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran, ³Department of Parasitology and Mycology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran, ⁴Department of Pharmacognosy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Received Date: 24 Sep 2025 Accepted Date: 02 Feb 2026

Abstract

Background & aim: Candida species, particularly Candida albicans, are primary agents of opportunistic fungal infections, contributing significantly to mortality rates among immunocompromised patients. In response to the global rise in antifungal resistance, this study aimed to investigate the antifungal properties and synergistic potential of Thymus vulgaris (thyme) essential oil nanoemulsion in combination with fluconazole against C. albicans.

Methods: The thyme essential oil nanoemulsion was synthesized, and its droplet size was characterized using Dynamic Light Scattering (DLS). The chemical profile of the oil was determined via Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of each agent were determined using the broth microdilution method according to CLSI guidelines. The interaction between fluconazole and the essential oil/nanoemulsion was evaluated using the checkerboard technique, with results interpreted through the Fractional Inhibitory Concentration Index ($\Sigma FICI$).

Results: The mean droplet size of the nanoemulsion was 43 nm. GC-MS analysis identified thymol (44.79%), p-cymene (23.35%), γ -terpinene (6.55%), and linalool (4.55%) as the primary constituents. The MIC for fluconazole was 1 $\mu\text{g/mL}$, while both the essential oil and its nanoemulsion yielded an MIC of 156.25 $\mu\text{g/mL}$. Fluconazole demonstrated strictly fungistatic activity, as its MFC exceeded the tested concentrations. In contrast, the essential oil exhibited fungicidal effects with an MFC of 156.25 $\mu\text{g/mL}$, and the nanoemulsion showed an MFC of 312.5 $\mu\text{g/mL}$. The $\Sigma FICI$ for the combinations of fluconazole with either the oil or the nanoemulsion was 1.5, indicating an indifferent interaction.

Conclusion: Although Thymus vulgaris essential oil and its nanoemulsion demonstrated potent antifungal activity against C. albicans, nanoemulsification did not enhance the inhibitory efficacy of the oil. Furthermore, the combination of thyme-based agents with fluconazole resulted in an indifferent interaction, suggesting no synergistic benefit for this specific combination against the standard strain.

Keywords: Nanoemulsion, Essential oil, Thymus vulgaris, Fluconazole, Candida albicans, Antifungal activity, Synergism.

***Corresponding author:** Amanloo S, Department of Parasitology and Mycology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Email: s.amanloo@zums.ac.ir

Please cite this article as follows: Mohammadi MS, Ghaffari A, Darabian S, Jafari S, Amanloo S. In Vitro Antifungal Evaluation of Thymus Vulgaris Essential Oil Nanoemulsion Alone and in Combination with Fluconazole Against Candida Albicans. Armaghane-danesh 2026; 31(1): 1-17.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal