Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2026; Vol. 50; No. 1

Evaluation of the Antifungal and Antibiofilm Effects of Hyde C1 Peptide on *Candida albicans*

Atefeh Nikzad Alamshiri[1], Sima Sadat Seyedjavadi[2]*, Fatemeh Peyravii Ghadikolaii[1*], Mehdi Goudarzi[3]

1. Department of Biology, QaS.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.
2. Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: May 10, 2026; Accepted: July 01, 2026

Abstract

Background and Aim: The increasing resistance of *Candida albicans* to commonly used antifungal agents has highlighted the need to identify new antifungal compounds. Hyde C1 peptide, derived from chicory, has previously been reported to possess antibacterial activity; however, its antifungal effects and possible mechanisms of action against *C. albicans* have been less investigated. This study aimed to evaluate the antifungal and antibiofilm effects of Hyde C1 peptide and investigate the potential roles of membrane damage and reactive oxygen species production.

Methods: This was an experimental, laboratory- based *in vitro* study. The antifungal activity of the peptide against the standard strain *C. albicans* ATCC 10231 and five clinical isolates was evaluated using the broth microdilution method. To assess its mechanism of action, protein leakage assay, propidium iodide staining followed by flow cytometry, ROS measurement using DCFH-DA, and biofilm inhibition assay using the crystal violet method were performed. Data were analyzed using GraphPad Prism version 8 and one-way ANOVA.

Results: Hyde C1 peptide showed antifungal activity against all tested *C. albicans* strains. The MIC values ranged from 8 to 32 µg/ mL, and the MFC values ranged from 16 to 64 µg/ mL. Treatment of *C. albicans* cells with the peptide caused a concentration- and time- dependent increase in intracellular protein leakage; protein leakage was significantly increased at 1×MIC and 2×MIC compared with the untreated control group ($P < 0.001$). Propidium iodide staining showed that the percentage of membrane- damaged cells reached 22.6% and 48.5% following treatment with 1×MIC and 2×MIC, respectively. Moreover, Hyde C1 increased intracellular reactive oxygen species production, with ROS-positive cells increasing to 44% and 68.2% at 1×MIC and 2×MIC, respectively. The peptide also inhibited *C. albicans* biofilm formation in a concentration-dependent manner. Biofilm inhibition was 34.6% at 8 µg/ mL ($P < 0.05$), increasing to 62.3%, 81.5%, and 87.2% at 16, 32, and 64 µg/ mL, respectively ($P < 0.001$).

Conclusion: Hyde C1 peptide exhibits antifungal and antibiofilm activity against *C. albicans* and may exert its effects through membrane damage and induction of oxidative stress.

Keywords: Hyde C1 peptide; Antifungal activity; *Candida albicans*; Reactive oxygen species; Biofilm; Drug resistance; Oxidative stress; Antimicrobial peptide

Please cite this article as: Nikzad Alamshiri A, Seyedjavadi SS, Peyravii Ghadikolaii F, Mehdi Goudarzi M. Evaluation of the Antifungal and Antibiofilm Effects of Hyde C1 Peptide on *Candida albicans*. Pejouhesh dar Pezeshki. 2026;50(1):1-12.

*Corresponding Author: Sima Sadat Seyedjavadi; **Email:** sima_seyedjavadi@yahoo.com
Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

*Co-Corresponding Author: Fatemeh Peyravii Ghadikolaii; **Email:** peyravii57@iau.ac.ir
Department of Biology, QaS.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۵۰، شماره ۱، سال ۱۴۰۵ شمسی، صفحات ۱ تا ۱۲

ارزیابی اثرات ضد قارچی و ضدبیوفیلمی پپتید Hyde C1 بر *کاندیدا آلبیکنس*

عاطفه نیکزاد المشیری[۱]، سیما السادات سیدجوادی[۲*]، فاطمه پیروی قادیکلایی[۱*]، مهدی گودرزی[۳]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران.
۲- گروه قارچ‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: افزایش مقاومت دارویی *کاندیدا آلبیکنس* به داروهای رایج، ضرورت شناسایی ترکیبات ضدقارچی جدید را افزایش داده است. پپتید Hyde C1 مشتق از گیاه کاسنی، پیش‌تر دارای فعالیت ضدباکتریایی گزارش شده است، اما اثر ضدقارچی و مکانیسم احتمالی آن علیه *کاندیدا آلبیکنس* کمتر بررسی شده است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر ضدقارچی و ضدبیوفیلمی پپتید Hyde C1 و بررسی نقش آسیب غشایی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن انجام شد.

روش کار: این پژوهش یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی از نوع *in vitro* بود. فعالیت ضدقارچی پپتید علیه سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231 و پنج سویه بالینی با روش رقت در محیط مایع بررسی شد. برای ارزیابی مکانیسم اثر، آزمون‌های نشت پروتئین، رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیوداید همراه با فلوسایتومتری، سنجش ROS با DCFH-DA و مهار بیوفیلم به روش کریستال ویوله انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار Prism GraphPad نسخه ۸ و آزمون ANOVA یک‌طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: پپتید Hyde C1 علیه تمامی سویه‌های مورد بررسی فعالیت ضدقارچی نشان داد. مقادیر MIC در محدوده ۸ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر MFC در محدوده ۱۶ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت. تیمار سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* با پپتید موجب افزایش وابسته به غلظت و زمان در نشت پروتئین‌های درون‌سلولی شد؛ به‌طوری‌که در غلظت‌های MIC×۱ و MIC×۲، میزان نشت پروتئین نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). نتایج رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیوداید نشان داد که درصد سلول‌های دارای آسیب غشایی در غلظت‌های MIC×۱ و MIC×۲ به‌ترتیب به ۲۲/۶ درصد و ۴۸/۵درصد رسید. همچنین، تیمار با پپتید موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن شد و درصد سلول‌های ROS-positive در غلظت‌های MIC×۱ و MIC×۲ به‌ترتیب به ۴۴درصد و ۶۸/۲درصد افزایش یافت. پپتید Hyde C1 تشکیل بیوفیلم را نیز به‌صورت وابسته به غلظت مهار کرد؛ به‌طوری‌که در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مهار بیوفیلم ۳۴/۶ درصد بود ($P < ۰/۰۵$) و در غلظت‌های ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان مهار به‌ترتیب به ۶۲/۳، ۸۱/۵ و ۸۷/۲ درصد رسید ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: پپتید Hyde C1 دارای فعالیت ضدقارچی و ضدبیوفیلمی علیه *کاندیدا آلبیکنس* است و احتمالاً از طریق آسیب غشایی و القای استرس اکسیداتیو اثر می‌گذارد.

واژگان کلیدی: پپتید Hyde C1؛ فعالیت ضدقارچی؛ *کاندیدا آلبیکنس*؛ گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)؛ بیوفیلم؛ مقاومت دارویی؛ استرس اکسیداتیو؛ پپتید ضدمیکروبی

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Nikzad Alamshiri A, Seyedjavadi SS, Peyravii Ghadikolaii F, Mehdi Goudarzi M. Evaluation of the Antifungal and Antibiofilm Effects of Hyde C1 Peptide on *Candida albicans*. Pejouhesh dar Pezeshki. 2026;50(1):1-12.

*نویسنده مسئول مکاتبات: سیما السادات سیدجوادی؛ آدرس پست الکترونیکی: sima_seyedjavadi@yahoo.com
گروه قارچ‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مشترک مکاتبات: فاطمه پیروی قادیکلایی؛ آدرس پست الکترونیکی: peyravii57@iau.ac.ir
گروه زیست‌شناسی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

مقدمه

در سال‌های اخیر، افزایش بروز عفونت‌های فرصت‌طلب قارچی، به‌ویژه در بیماران بستری، افراد دارای نقص ایمنی، بیماران دریافت‌کننده داروهای سرکوب‌کننده ایمنی و بیماران تحت درمان‌های طولانی‌مدت آنتی‌بیوتیکی، به یکی از نگرانی‌های مهم در حوزه بیماری‌های عفونی تبدیل شده است. در میان قارچ‌های فرصت‌طلب، *کاندیدا آلبیکنس* جایگاه ویژه‌ای دارد؛ زیرا این قارچ علاوه بر توانایی ایجاد عفونت‌های سطحی و مخاطی، در شرایط مستعدکننده می‌تواند وارد جریان خون شده و عفونت‌های سیستمیک با مرگ‌ومیر بالا ایجاد کند. توانایی این قارچ در تغییر شکل مورفولوژیک، چسبندگی به سلول‌های میزبان، تولید آنزیم‌های ویرولانس و تشکیل بیوفیلم، نقش مهمی در پایداری عفونت و کاهش پاسخ به درمان‌های ضدقارچی دارد (۱، ۲).

درمان عفونت‌های ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* عمدتاً بر پایه داروهایی مانند آزول‌ها، پلی‌ان‌ها و اکینوکاندین‌ها انجام می‌شود. با وجود اثربخشی این داروها، استفاده گسترده و گاه طولانی‌مدت از آن‌ها با بروز مقاومت دارویی، عود عفونت، سمیت دارویی و محدودیت در اثربخشی علیه بیوفیلم‌های قارچی همراه بوده است. بیوفیلم‌های *کاندیدا آلبیکنس* به‌ویژه در عفونت‌های مرتبط با کاتترها، پروتزها و سایر وسایل پزشکی اهمیت دارند، زیرا سلول‌های موجود در بیوفیلم نسبت به سلول‌های پلانکتونیک مقاومت بیشتری در برابر داروهای ضدقارچی نشان می‌دهند. بنابراین، شناسایی ترکیبات جدیدی که بتوانند هم رشد قارچ و هم تشکیل بیوفیلم را مهار کنند، اهمیت زیادی دارد (۳، ۴).

در این زمینه، پپتیدهای ضدمیکروبی به‌عنوان گروهی از ترکیبات زیستی با پتانسیل درمانی قابل توجه مطرح شده‌اند. این پپتیدها معمولاً مولکول‌هایی کوتاه، آمفی‌پاتیک و دارای بار مثبت هستند که می‌توانند با غشای میکروارگانیسم‌ها برهم‌کنش داشته باشند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که بسیاری از پپتیدهای ضدمیکروبی علاوه بر اثر ضدباکتریایی، دارای فعالیت ضدقارچی و ضدبیوفیلمی نیز هستند. برای مثال، برخی از این پپتیدها با اتصال به سطح سلول میکروبی، موجب تخریب غشا، افزایش نفوذپذیری، خروج محتویات داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شوند. گروهی دیگر نیز از طریق القای استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد میتوکندری، مهار سنتز دیواره سلولی یا تداخل با مسیرهای سیگنالینگ، اثرات ضدقارچی خود را اعمال می‌کنند (۵، ۶).

ویژگی مهم پپتیدهای ضدمیکروبی این است که برخلاف بسیاری از داروهای کلاسیک، معمولاً فقط یک هدف مولکولی منفرد ندارند؛ بلکه می‌توانند چندین مسیر حیاتی را به‌طور هم‌زمان تحت تأثیر قرار دهند. همین ویژگی احتمال ایجاد مقاومت میکروبی را کاهش می‌دهد و آن‌ها را به گزینه‌ای مناسب برای توسعه داروهای جدید تبدیل می‌کند. علاوه بر این، گزارش شده است که برخی پپتیدها می‌توانند مراحل مختلف تشکیل بیوفیلم، از جمله چسبندگی اولیه، بلوغ بیوفیلم و پایداری ماتریکس خارج‌سلولی را مهار کنند. این موضوع از نظر درمان عفونت‌های مزمن و مقاوم به دارو اهمیت ویژه‌ای دارد (۷).

منابع گیاهی یکی از مخازن مهم برای شناسایی پپتیدها و ترکیبات ضدمیکروبی جدید محسوب می‌شوند. گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا از مجموعه‌ای از ترکیبات دفاعی استفاده می‌کنند که بخشی از آن‌ها شامل پپتیدهای کوچک با اثرات ضدمیکروبی است. در مطالعات قبلی، پپتید Hyde C1 که از گیاه کاسنی(*Cichorium intybus*) جداسازی شده، دارای فعالیت ضدباکتریایی گزارش شده است. این یافته نشان می‌دهد که Hyde C1 ممکن است توانایی برهم‌کنش با ساختارهای حیاتی سلول‌های میکروبی را داشته باشد (۸). با این حال، شواهد موجود درباره اثر ضدقارچی این پپتید محدود است و تاکنون فعالیت آن علیه *کاندیدا آلبیکنس*، به‌ویژه از نظر اثر بر رشد، آسیب غشایی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تشکیل بیوفیلم، به‌طور کامل بررسی نشده است.

با توجه به اهمیت بالینی *کاندیدا البیکنس*، افزایش مقاومت دارویی و نقش بیوفیلم در تداوم عفونت، بررسی اثرات ضدقارچی و ضدبیوفیلمی پپتید Hyde C1 می‌تواند به شناخت بهتر ظرفیت درمانی این پپتید کمک کند. سؤال اصلی پژوهش حاضر این بود که آیا پپتید Hyde C1 می‌تواند رشد سویه استاندارد و سویه‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* را مهار کرده و تشکیل

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

بیوفیلم را کاهش دهد؟ همچنین این پرسش مطرح شد که آیا اثر ضدقارچی این پپتید با آسیب غشای سلولی، نشت پروتئین‌های درون‌سلولی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن همراه است؟ فرضیه پژوهش این بود که پپتید Hyde C1 دارای اثرات ضدقارچی و ضدبیوفیلمی علیه *کاندیدا آلبیکنس* است و این اثر احتمالاً از طریق اختلال در تمامیت غشای سلولی و القای استرس اکسیداتیو اعمال می‌شود. این مطالعه در سال ۱۴۰۴در بخش قارچ شناسی انستیتوپاستور ایران و بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

روش کار

طراحی مطالعه و روش نمونه‌گیری:

این پژوهش یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی از نوع *in vitro* بود که با هدف ارزیابی اثرات ضدقارچی و ضدبیوفیلمی پپتید Hyde C1 بر *کاندیدا آلبیکنس* انجام شد. نمونه‌های مورد بررسی شامل یک سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC10231 و پنج سویه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* بودند. سویه‌های بالینی از میان سویه‌های موجود در کلکسیون قارچ‌های بیماری‌زای انستیتوپاستور ایران (http://fa.pasteur.ac.ir/MBankResult.aspx) استفاده گردید. این ایزوله‌ها از نمونه خون بیماران مبتلا به عفونت کاندیدایی جداسازی شده بودند. از نظر جنسیت بیماران، سه ایزوله مربوط به بیماران زن و دو ایزوله مربوط به بیماران مرد بود. اطلاعات هویتی بیماران در مطالعه وارد نشد و محرمانگی داده‌ها رعایت گردید.

معیارهای ورود و خروج

معیار ورود شامل تأیید هویت سویه‌ها به‌عنوان *کاندیدا آلبیکنس*، رشد مناسب در شرایط آزمایشگاهی و عدم آلودگی کشت‌ها بود. سویه‌هایی که هویت آن‌ها تأیید نشد، رشد کافی نداشتند، دچار آلودگی میکروبی بودند یا نتایج آن‌ها در تکرار آزمایش‌ها قابل بازتولید نبود، از مطالعه خارج شدند.

سنتز پپتید Hyde C1

پپتید (LVSVWIISAALSLKNKVAYRNAKLVSKLFRIAL) Hyde C1 با خلوص بالای ۹۵ درصد به صورت سنتتیک از شرکت تجاری مربوطه GenScript (Piscataway, New Jersey, USA) با شماره لات C833X243G0-3/PE7385 تهیه شد. پپتید در آب مقطر استریل حل گردید و محلول استوک با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC)

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) بر اساس دستورالعملCLSI، روشM27-A2 انجام شد، که استاندارد جهانی برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی پپتیدها است و امکان مقایسه مستقیم با دیگر مطالعات را فراهم می‌کند. (۹). به طور خلاصه، سوسپانسیونی از مخمرها با غلظت نهایی $۲/۵ - ۰/۵ \times ۱۰^{۳}$ سلول در میلی‌لیتر در محیط RPMI 1640 (Sigma-Aldrich، آمریکا) حاوی بافر MOPS آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به چاهک‌های یک صفحه میکروتیتر ۹۶ چاهکی افزوده شد. رقت‌های سریال دوبرابری از پپتید Hyde C1 با محدوده غلظتی ۱تا ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و به چاهک‌ها اضافه گردید. صفحات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظتی که عدم رشد قابل رویت را ایجاد کند، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

برای تعیین MFC، از هر چاهکی که هیچ رشدی مشاهده نشد، ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط SDA (شرکت Merck، آلمان) کشت داده شد و کمترین غلظتی که منجر به مرگ ۹۹٪/۹ کلنی‌ها گردید، به عنوان MFC گزارش شد (۱۰). این آزمایش نیز در سه تکرار مستقل انجام شد.

سنجش نشت پروتئین

برای بررسی اینکه آیا پپتید Hyde C1 از طریق تخریب غشای پلاسمایی عمل می‌کند یا خیر، سنجش نشت پروتئین انجام شد (۱۱). این روش ارزیابی مستقیم آسیب غشای پلاسمایی را فراهم می‌کند. سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* در فاز لگاریتمی رشد جمع‌آوری و با بافر فسفات سالین سه بار شسته شدند. سپس

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف MIC×۱، MIC×۲ و MIC×۴ از پپتید Hyde C1 قرار گرفتند و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوبه شدند. نمونه‌ها سپس سانتریفیوژ شده و محتوای پروتئینی سوپرناتانت با استفاده از روش برادفورد (Bradford) با کمک معرف برادفورد و اندازه‌گیری جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر سنجیده شد (۱۲). سلول‌های تیمارشده با Triton X-100 1% به‌عنوان شاهد مثبت و سلول‌های بدون تیمار به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند.

ارزیابی آسیب غشای سلولی با استفاده از فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیوداید (PI)

برای بررسی کمی و دقیق آسیب غشای پلاسمایی سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* در مواجهه با پپتید Hyde C1، از فلوسایتومتری همراه با رنگ پروپیدیوم آیوداید (Propidium Iodide – PI) استفاده گردید (۱۳). این روش امکان تشخیص سلول‌های با غشای آسیب دیده به صورت دقیق و سریع را می‌دهد. PI یک رنگ فلورسنتی است که به غشای سالم نفوذ نمی‌کند، اما در سلول‌هایی که یکپارچگی غشایشان آسیب دیده است، وارد شده و با اتصال به DNA، فلورسانس قرمز رنگی از خود نشان می‌دهد. سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* در فاز لگاریتمی رشد (اوایل فاز نمایی) جمع‌آوری شده و سه بار با بافر فسفات سالین استریل شسته شدند. سپس سوسپانسیونی از سلول‌ها با غلظت 10^6 سلول در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین تهیه شد. سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف پپتید Hyde C1 شامل ۱MIC × و MIC ×۲ قرار گرفتند. همچنین یک گروه شاهد منفی (بدون پپتید، تنها بافر فسفات سالین) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، سلول‌ها با سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه) جمع‌آوری و یک بار با بافر فسفات سالین شسته شدند. سپس سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروپیدیوم آیوداید (Sigma-Aldrich، آمریکا) مجدداً مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از رنگ‌آمیزی، سلول‌ها مجدداً شسته شده و در بافر فسفات سالین حل شدند اندازه‌گیری فلورسانس سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (FACSCalibur) انجام شد. تحریک رنگ PI با طول موج ۴۸۸ نانومتر انجام شده و نشر فلورسانس در طول موج ۶۱۷ نانومتر ثبت گردید.

سنجش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

سطح گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی با استفاده از رنگ فلورسانس ′۷′,۲- دی‌کلروفلوئورسین دی‌استات (DCFH-DA) اندازه‌گیری شد (۱۴). این روش ارزیابی دقیق استرس اکسیداتیو ناشی از پپتید را فراهم می‌کند. این رنگ غیرفلورسانس پس از ورود به سلول و واکنش با ROS به ترکیب فلورسانس DCF تبدیل می‌شود. سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* با غلظت 10^6 سلول در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین حاوی ۱۰ میکرومولار DCFH-DA(Sigma-Aldrich، آمریکا) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد پیش‌انکوبه شدند. سپس سلول‌ها شسته شده و با غلظت‌های مختلف پپتید MIC×۱ و MIC×۲ به مدت ۲ ساعت تیمار شدند. شدت فلورسانس با استفاده از فلوسایتومتری (طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و نشر ۵۲۵ نانومتر) اندازه‌گیری شد. سلول‌های تیمار شده با H_2O_2 (۱۰ میلی‌مولار) به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شدند.

بررسی مهار تشکیل بیوفیلم

توانایی پپتید Hyde C1 در مهار تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* با روش کریستال ویوله ارزیابی گردید (۱۵). این روش کمک می‌کند اثر ضدبیوفیلمی پپتید به صورت کمی تعیین شود. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (10^6 سلول در میلی‌لیتر) در محیط RPMI 1640 به چاهک‌های صفحه ۹۶ چاهکی اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت چسبیدن اولیه انکوبه گردید. سپس چاهک‌ها با بافر فسفات سالین شسته شدند و غلظت‌های مختلف پپتید (۲ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزوده شدند. پس از انکوباسیون، چاهک‌ها شسته شدند تا سلول‌های غیرچسبیده حذف گردند. بیوفیلم‌های تشکیل شده با متانول ۹۹٪ تثبیت و با کریستال ویوله ۰/۱٪

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

(Sigma-Aldrich، آمریکا) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو، رنگ متصل شده با اتانول ۹۵٪ (Sigma-Aldrich، آمریکا) حل گردید و جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار بیوفیلم نسبت به گروه شاهد (بدون پپتید) محاسبه گردید.

آنالیز آماری

داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ تحلیل و به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. غلظت‌های مختلف پپتید Hyde C1 به‌عنوان متغیر مستقل و شاخص‌های MIC، MFC، آسیب غشایی، نشت پروتئین، تولید ROS و مهار بیوفیلم به‌عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. تمام آزمایش‌ها و اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار مستقل انجام شد تا خطای تصادفی کاهش یافته، تکرارپذیری نتایج افزایش یابد و امکان گزارش داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار فراهم شود. استفاده از تکرارهای مستقل یکی از اصول اساسی طراحی آزمایش است و برای افزایش اعتبار نتایج تجربی توصیه می‌شود (۱۶). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SD) گزارش گردیدند. برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون ANOVA یک‌طرفه استفاده شد، زیرا اثر چند غلظت مختلف پپتید بر متغیرهای کمی بررسی می‌شد. در صورت معنی‌دار بودن ANOVA، مقایسه گروه‌های تیمار با کنترل با آزمون تعقیبی Dunnett انجام شد. داده‌های ROS، بیوفیلم و سایر آزمون‌ها نسبت به گروه کنترل بدون تیمار نرمال‌سازی شدند و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی پپتید Hyde C1

فعالیت ضدقارچی پپتید Hyde C1 علیه یک سویه استاندارد (*Candida albicans* ATCC 10231) و پنج سویه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از روش رقت در محیط مایع بر اساس پروتکل CLSI M27-A2 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، پپتید Hyde C1 علیه تمامی سویه‌های مورد بررسی *کاندیدا آلبیکنس* فعالیت ضدقارچی نشان داد. کمترین مقادیر MIC و MFC مربوط به سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231 و سویه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* 621-506 بود که به‌ترتیب ۸ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد و نشان‌دهنده حساسیت بالاتر این سویه‌ها به پپتید Hyde C1 است. سه سویه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* 622-96، 628-719 و 623-519 مقادیر MIC برابر با ۱۶ و MFC برابر با ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند. بیشترین مقادیر MIC و MFC مربوط به سویه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* 624-424 بود که به‌ترتیب ۳۲ و ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و نشان‌دهنده حساسیت کمتر این سویه نسبت به سایر سویه‌های مورد بررسی است.

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) پپتید Hyde C1 علیه سویه‌های مختلف *کاندیدا آلبیکنس*

سویه قارچی	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)
C. albicans ATCC 10231 (استاندارد)	۸	۱۶
C. albicans 622-96 (بالینی)	۱۶	۳۲
C. albicans 628-719 (بالینی)	۱۶	۳۲
C. albicans 621-506 (بالینی)	۸	۱۶
C. albicans 623-519 (بالینی)	۱۶	۳۲
C. albicans 624-424 (بالینی)	۳۲	۶۴

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

سنجش نشت پروتئین

نتایج حاصل از سنجش نشت پروتئین در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، تیمار سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* با پپتید Hyde C1 منجر به نشت پروتئین به صورت وابسته به غلظت و زمان گردید.

جدول ۲- میزان نشت پروتئین از سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پپتید Hyde C1 در زمان‌های مختلف

زمان انکوباسیون	گروه کنترل	۸×MIC میکروگرم/میلی‌لیتر ۱	۱۶×MIC میکروگرم/میلی‌لیتر ۲	۳۲×MIC میکروگرم/میلی‌لیتر ۴	Triton X-100
۰ دقیقه	۰ ± ۰	۰ ± ۰	۰ ± ۰	۰ ± ۰	۰ ± ۰
۳۰ دقیقه	۱/۲ ±۰/۴	۱۸/۴ ± ۲/۱*	۴۲ ± ۵/۳**	۷۸ ± ۳/۱**	۸۹ ± ۳/۴**
۶۰ دقیقه	۱/۸ ± ۰/۵	۳۲ ۲*	۶۷ ± ۲/۸**	۱۱۲ ± ۴/۲**	۱۳۴ ± ۴/۶**
۹۰ دقیقه	۲/۶ ± ۰/۶	۴۴ ± ۲/۴*	۸۴ ± ۳/۲**	۱۴۲ ± ۵/۱**	۱۷۲ ± ۵/۴**
۱۲۰ دقیقه	۳/۲ ± ۰/۷	۵۴/۶ ± ۳/۸*	۹۸/۷ ± ۵/۲**	۱۶۵/۴ ± ۷/۶**	۱۹۲/۵ ± ۸/۳**

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ و علامت ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.001$ نسبت به گروه کنترل است.

در گروه شاهد منفی (سلول‌های بدون تیمار با پپتید)، میزان نشت پروتئین در تمام زمان‌های انکوباسیون ناچیز (کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود که نشان‌دهنده حفظ یکپارچگی غشا در شرایط طبیعی می‌باشد.

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱×MIC پپتید (۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، میزان نشت پروتئین در ۳۰ دقیقه اول به ۲/۱ ± ۱۸/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید و با گذشت زمان افزایش یافت، به طوری که در ۱۲۰ دقیقه به ۳/۸ ± ۵۴/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. این افزایش نسبت به گروه شاهد منفی در تمام زمان‌ها معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$).

در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲×MIC)، میزان نشت پروتئین به طور بیشتر بود. در زمان ۳۰ دقیقه، نشت پروتئین به ۵/۳ ± ۴۲/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید و در ۱۲۰ دقیقه به ۵/۲ ± ۹۸/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت که این افزایش نسبت به گروه شاهد منفی معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$).

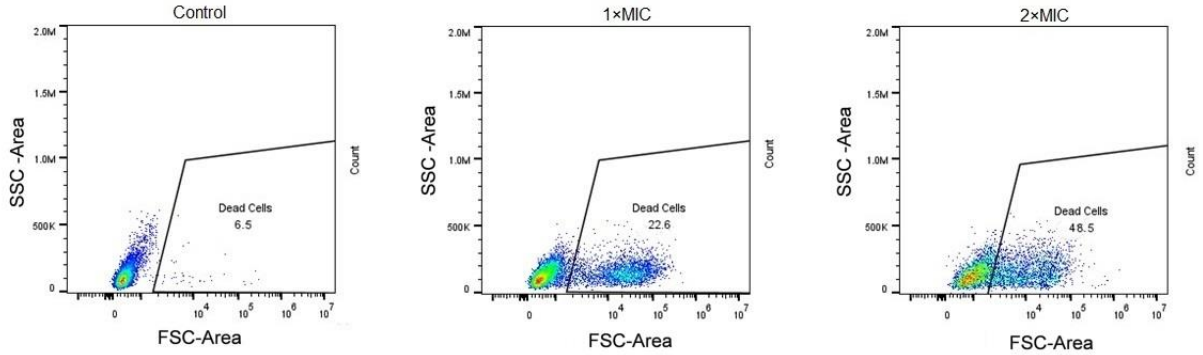
بیشترین میزان نشت پروتئین در غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۴×MIC) مشاهده شد، به طوری که پس از ۱۲۰ دقیقه، میزان پروتئین نشت یافته به ۷/۶ ± ۱۶۵/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید که با گروه شاهد مثبت (تیمار با تریتون X-100 ۱٪ با میزان نشت ۸/۳ ± ۱۹۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > ۰/۰۵$).

ارزیابی آسیب غشای سلولی با استفاده از فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیوداید (PI)

به منظور بررسی آسیب ناشی از پپتید Hyde C1 به یکپارچگی غشای سلولی *کاندیدا آلبیکنس*، جذب رنگ پروپیدیوم آیوداید (PI) در سلول‌های قارچی تیمار شده با غلظت‌های مختلف پپتید (۱×MIC و ۲×MIC) پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز فلوسایتومتری در شکل ۱ نشان داده شده است.

آنالیز فلوسایتومتری افزایش معنی‌داری در شدت فلورسانس سلول‌های تیمار شده با پپتید در مقایسه با گروه شاهد منفی (بدون پپتید) نشان داد که حاکی از افزایش نفوذپذیری غشای سلولی قارچ توسط پپتید می‌باشد. درصد سلول‌های قارچی مرده که با جذب PI تعیین شد، برای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱×MIC و ۲×MIC به ترتیب ۲۲٪/۶ و ۴۸٪/۵ بود. این نتایج نشان می‌دهد که پپتید Hyde C1 آسیب غشایی را به صورت وابسته به دوز القا می‌کند، به طوری که غلظت‌های بالاتر پپتید منجر به درصد بیشتری از سلول‌های مرده می‌گردد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]



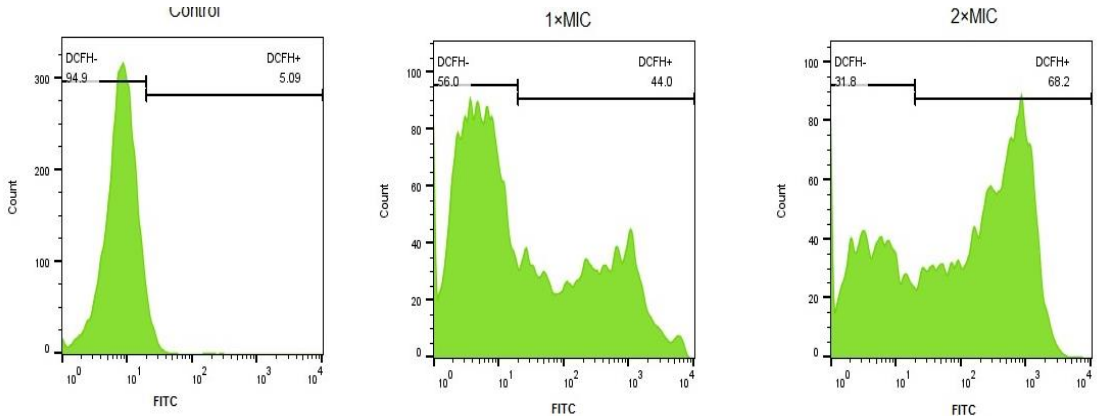
شکل ۱- آنالیز فلوسایتومتری آسیب غشای سلولی *کاندیدا آلبیکنس* تیمار شده با غلظت‌های مختلف پپتید Hyde C1 (MIC×۱و MIC× ۲) به مدت ۲ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد. درصد سلول‌های با غشای آسیب‌دیده (PI-positive) برای غلظت‌های MIC×۱و MIC×۲ به ترتیب ۲۲٪/۶ و ۴۸٪/۵ بود که نشان‌دهنده اثر وابسته به دوز پپتید در تخریب غشای سلولی می‌باشد. گروه شاهد منفی: سلول‌های بدون تیمار با پپتید

سنجش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

نتایج آنالیز فلوسایتومتری در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در گروه شاهد منفی (سلول‌های بدون تیمار با پپتید)، تنها ۵ درصد سلول‌ها فلورسانس مثبت (DCFH-positive) بودند که نشان‌دهنده سطح پایه و طبیعی ROS در سلول‌های سالم می‌باشد. در مقابل، تیمار سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* با پپتید Hyde C1 منجر به افزایش وابسته به غلظت در درصد سلول‌های DCFH- positive گردید.

به طور مشخص، پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱×MIC پپتید Hyde C1، درصد سلول‌های ROS- positive به ۴۴ درصد افزایش یافت که نسبت به گروه شاهد منفی (۵ درصد) بیش از ۸ برابر بیشتر بود. این افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد که حتی در غلظت MIC نیز پپتید قادر به القای استرس اکسیداتیو قابل توجهی در سلول‌های قارچی می‌باشد.

بیشترین افزایش تولید ROS در غلظت ۲×MIC حاصل شد، به طوری که درصد سلول‌های ROS- positive به ۶۸/۲ درصد رسید که نسبت به گروه شاهد منفی بیش از ۱۳ برابر افزایش نشان می‌دهد. این یافته به روشنی حاکی از آن است که پپتید Hyde C1 تولید ROS درون سلولی را به صورت وابسته به دوز تحریک می‌کند و در غلظت‌های بالاتر، اکثریت سلول‌های قارچی (بیش از دو سوم) دچار تنش اکسیداتیو شدید می‌شوند.



شکل ۲- آنالیز فلوسایتومتری تولید ROS در سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* تیمار شده با غلظت‌های MIC×۱ و MIC×۲ پپتید Hyde C1 به مدت ۲ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از رنگ DCFH-DA. درصد سلول‌های ROS-positive در گروه شاهد منفی (بدون پپتید) ٪۵ بود که در غلظت‌های MIC×۱ و MIC×۲ به ترتیب به ٪۴۴ و ٪۶۸/۲ افزایش یافت. نتایج نشان‌دهنده القای وابسته به غلظت استرس اکسیداتیو توسط پپتید Hyde C1 می‌باشد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

بررسی مهار تشکیل بیوفیلم

همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، پپتید Hyde C1 توانست تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* را به صورت وابسته به غلظت مهار کند. در غلظت‌های پایین پپتید (۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، مهار بیوفیلم ناچیز و کمتر از ۱۰٪ بود. با افزایش غلظت پپتید به ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱×MIC) درصد مهار بیوفیلم به ۴/۲ ± ۳۴/۶ درصد رسید که نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).

در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲×MIC)، مهار بیوفیلم افزایش یافت و به ۵/۱ ± ۶۲/۳ درصد رسید. حداکثر مهار بیوفیلم در غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۸×MIC) مشاهده گردید که منجر به مهار ۳/۴ ± ۸۷/۲ درصدی تشکیل بیوفیلم شد. در این غلظت، تشکیل بیوفیلم تقریباً به طور کامل سرکوب گردید.

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف پپتید Hyde C1 بر مهار تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231

غلظت پپتید (µg/mL)	جذب نوری (OD_{540}) (میانگین ± انحراف معیار)	درصد مهار بیوفیلم (میانگین ± انحراف معیار)
شاهد منفی (بدون پپتید)	۱/۸۲±۰/۰۷۵	-
۴ (۱/۲×MIC)	۱/۶۵ ±۰/۰۶۲	۹/۲ ± ۱/۸
۸ (۱×MIC)	۱/۱۹ ± ۰/۰۵۴	*۳۴/۶ ± ۴/۲
۱۶ (۲×MIC)	۰/۶۹ ± ۰/۰۴۱	**۶۲/۳ ± ۵/۱
۳۲ (۴×MIC)	۰/۳۴ ± ۰/۰۳۲	**۸۱/۵ ± ۳/۸
۶۴ (۸×MIC)	۰/۲۳± ۰/۰۲۸	**۸۷/۲ ± ۳/۴

** $P < 0.001$ نسبت به شاهد منفی، * $P < 0.05$ نسبت به شاهد منفی

بحث

در مطالعه حاضر، پپتید Hyde C1 علیه سویه استاندارد و سویه‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* فعالیت ضدقارچی و قارچ‌کشی نشان داد. مقادیر MIC این پپتید در محدوده ۸ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر MFC در محدوده ۱۶ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت. همچنین، نتایج آزمون‌های مکانیسمی نشان داد که اثر ضدقارچی Hyde C1 با آسیب غشای پلاسمایی، افزایش نشت پروتئین‌های درون‌سلولی، القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن و مهار تشکیل بیوفیلم همراه است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که Hyde C1 می‌تواند از طریق چند مسیر هم‌زمان، به‌ویژه اختلال در تمامیت غشا و القای استرس اکسیداتیو، بر *کاندیدا آلبیکنس* اثر بگذارد. پپتیدHyde C1 که اخیراً از گیاه کاسنی (Cichorium intybus L.) جداسازی و شناسایی شده است، یک پپتید ضدمیکروبی با وزن مولکولی ۳۶۸۶/۴ دالتون بوده و دارای ساختار مارپیچ α آمفی‌پاتیک با نسبت آبگریزی بالا (۶۱٪) و بار مثبت خالص ۶+ می‌باشد (۸). این ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، اساس فعالیت ضدقارچی قوی این پپتید را تشکیل می‌دهند.

در مطالعه حاضر، برای نخستین بار فعالیت ضدقارچی پپتید Hyde C1 علیه سویه‌های استاندارد و بالینی *کاندیدا آلبیکنس* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که این پپتید دارای مقادیر MIC بین ۸ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MFC بین ۱۶ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. این مقادیر با نتایج مطالعات پیشین در مورد پپتیدهای ضدقارچی دیگر قابل مقایسه است. به عنوان مثال، پپتید Cecropin دارای MIC برابر ۰/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه *کاندیدا آلبیکنس* گزارش شده است (۱۷)، در حالی که پپتید Octominin II دارای MIC برابر ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (۱۸). پراکندگی مقادیر MIC در

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

میان پپتیدهای مختلف، ناشی از تفاوت در ساختار اولیه، طول زنجیره، بار خالص و نسبت آبگریزی آن‌ها است.

مکانیسم اصلی اثر اکثر پپتیدهای ضدمیکروبی، برهمکنش الکترواستاتیک اولیه با غشای سلولی میکروارگانیسم و به دنبال آن تخریب فیزیکی غشا می‌باشد (۱۷، ۸). این پپتیدها به دلیل داشتن بار مثبت خالص، تمایل بالایی به غشای آنیونی سلول‌های قارچی (که حاوی فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل گلیسرول می‌باشند) دارند. در مطالعه حاضر، ارزیابی آسیب غشا با استفاده از روش فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم آیوداید (PI) نشان داد که پپتید Hyde C1 منجر به افزایش وابسته به دوز در درصد سلول‌های PI-positive می‌گردد. این یافته با نتایج مطالعه Hyde C1 بر روی باکتری‌ها که در آن غلظت‌های ۱×MIC و ۲×MIC به ترتیب منجر به رنگ‌پذیری ۴۱/۹ و ۸۳/۵ درصد سلول‌های باکتریایی گردید (۸)، همخوانی کامل دارد و نشان می‌دهد که مکانیسم تخریب غشا در هر دو گروه میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها و قارچ‌ها) محفوظ مانده است. علاوه بر این، سنجش نشت پروتئین در مطالعه حاضر نیز افزایش وابسته به غلظت و زمان نشت پروتئین‌های درون سلولی را تأیید کرد. نشت پروتئین‌هایی با وزن مولکولی چندین کیلودالتون نشان‌دهنده ایجاد حفره‌های بزرگ در غشا یا تخریب گسترده ساختار غشا می‌باشد (۱۱).

جالب توجه است که بسیاری از پپتیدهای ضدمیکروبی، علاوه بر تخریب مستقیم غشا، قادر به القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول هدف نیز می‌باشند که منجر به استرس اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی می‌گردد (۱۹، ۱۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پپتید Hyde C1 تولید ROS را به صورت وابسته به غلظت القا می‌کند، به طوری که درصد سلول‌های ROS-positive از ۵ درصد در گروه شاهد به ۴۴ و ۶۸/۲ درصد به ترتیب در غلظت‌های ۱×MIC و ۲×MIC افزایش یافت. مکانیسم القای ROS توسط پپتیدهای ضدمیکروبی ممکن است از چند مسیر صورت گیرد: (۱) تخریب غشای میتوکندری و اختلال در زنجیره انتقال الکترون (۲)، ورود پپتید به درون سلول و برهمکنش مستقیم با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، و (۳) فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آپوپتوز (۲۰). مطالعه بر روی پپتید PMAP-23 نشان داده است که افزایش سطح کلسیم سیتوزولی و میتوکندریایی نقش کلیدی در القای ROS و آپوپتوز در *کاندیدا آلبیکنس* ایفا می‌کند (۱۹). همچنین، پپتید Cecropin نیز از طریق القای ROS و تغییر در پتانسیل غشای میتوکندری باعث مرگ سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* می‌شود (۱۷). بنابراین، به نظر می‌رسد پپتید Hyde C1 نیز از طریق یک مکانیسم دوگانه شامل تخریب مستقیم غشای پلاسمایی و القای غیرمستقیم استرس اکسیداتیو، اثر ضدقارچی خود را اعمال می‌کند.

یکی دیگر از چالش‌های مهم در درمان عفونت‌های کاندیدایی، توانایی این قارچ در تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم‌ها به دلیل ساختار پیچیده و ماتریکس خارج سلولی حاوی پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و DNA، مانعی فیزیکی در برابر نفوذ داروهای ضدقارچی ایجاد می‌کنند و همچنین باعث ایجاد فنوتیپ مقاوم می‌شوند (۲۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پپتید Hyde C1 قادر به مهار تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* به صورت وابسته به غلظت می‌باشد و در غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تا ۲/۸۷ درصد از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کند. این میزان مهار بیوفیلم با نتایج مطالعات دیگر پپتیدهای ضدقارچی مانند Octominin II (۱۸) و Jelleine-Ic (۲۲) قابل مقایسه است. مکانیسم مهار بیوفیلم توسط پپتید Hyde C1 احتمالاً از چند مسیر صورت می‌گیرد: (۱) جلوگیری از چسبندگی اولیه سلول‌ها به سطح که مرحله کلیدی در تشکیل بیوفیلم است، (۲) تخریب ماتریکس خارج سلولی بیوفیلم، و (۳) کشتن سلول‌های موجود درون بیوفیلم از طریق مکانیسم تخریب غشا و القای ROS (۲۳). با توجه به نقش محوری بیوفیلم در عفونت‌های مزمن و مقاوم به درمان، توانایی پپتید Hyde C1 در مهار تشکیل بیوفیلم، اهمیت آن را برای بررسی‌های تکمیلی افزایش می‌دهد.

مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر پپتیدهای ضدقارچی مشتق از منابع طبیعی نشان دهنده پتانسیل بالای پپتید Hyde C1 است. پپتید Cecropin که از باکتری‌های نوترکیب بیان می‌شود،

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

دارای MIC بسیار پایین (۰/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد اما نگرانی‌هایی در مورد پایداری و سمیت سلولی آن وجود دارد (۱۷). در مقابل، پپتید Octominin II با MIC برابر ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فعالیت ضدقارچی نسبتاً ضعیف‌تری دارد (۱۸). پپتید Hyde C1 با MIC بین ۸ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده میانی این طیف قرار دارد.

در تفسیر یافته‌های این مطالعه باید به برخی محدودیت‌ها نیز توجه داشت. نخست اینکه، تمامی آزمایش‌ها در شرایط آزمایشگاهی *(in vitro)* انجام شده است و برای تأیید کارایی و ایمنی پپتید Hyde C1 در شرایط درون‌تن *(in vivo)*، مطالعات بیشتر بر روی مدل‌های حیوانی ضروری است. دوم اینکه، مکانیسم دقیق ورود پپتید به درون سلول و برهمکنش آن با اهداف درون سلولی مانند DNA، RNA و میتوکندری نیاز به بررسی‌های تکمیلی با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپی پیشرفته و مطالعات مولکولی دارد. سوم اینکه، اگرچه پپتید Hyde C1 فعالیت ضدقارچی خوبی علیه سویه‌های بالینی مورد آزمایش نشان داد، اما تنوع ژنتیکی سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* در جمعیت‌های مختلف جغرافیایی ممکن است بر حساسیت آن‌ها به این پپتید تأثیر بگذارد.

در انتها به طور خلاصه، مهم‌ترین نقاط قوت پپتید Hyde C1 شامل فعالیت ضدقارچی مؤثر، توانایی مهار تشکیل بیوفیلم، القای آسیب غشایی، افزایش نشت محتویات پروتئینی سلول و تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن است. برخلاف برخی پپتیدهای ضدقارچی که عمدتاً بر یک مسیر اثر می‌گذارند، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که Hyde C1 احتمالاً از طریق مکانیسم‌های چندگانه بر سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* اثر می‌گذارد. این ویژگی می‌تواند اهمیت این پپتید را به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای توسعه ترکیبات ضدقارچی و ضدبیوفیلمی افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه، همسو با مطالعات پیشین درباره پپتیدهای ضدمیکروبی، نشان داد که Hyde C1 دارای فعالیت ضدقارچی علیه *کاندیدا آلبیکنس* است و احتمالاً از طریق آسیب غشایی و القای استرس اکسیداتیو اثر می‌گذارد. بررسی‌های بیشتر برای تعیین ایمنی و کارایی این پپتید در شرایط پیش‌بالینی ضروری است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بررسی، و با کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.1401.021 ثبت شده است.

منافع مالی

این کار با حمایت مالی یک کمک‌هزینه تحقیقاتی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، ایران با شماره ۴۳۰۱۴۷۶۸ انجام شده است. سازمان تأمین‌کننده اعتبار هیچ نقشی در طراحی پروژه، اجرای کار، تحلیل‌ها، تفسیر داده‌ها و نگارش و ارسال نسخه خطی نداشته است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه شماره ۱۰۷۹۴۸۰۴۳۲۳۰۵۰۸۲۸۴۰۳۲۱۶۲۹۶۶۰۱۹ خانم عاطفه نیکزاد المشیری برای دریافت درجه دکتری تخصصی در رشته زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر بود.

از مشارکت‌کنندگان محترم و تمامی بزرگوارانی که در اجرای پژوهش حاضر ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

References

1. Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. Candida albicans the main opportunistic pathogenic fungus in humans. Revista Argentina de microbiologia. 2023 Apr 1;55(2):189-98.

2. Amann V, Kissmann AK, Firacative C, Rosenau F. Biofilm-associated candidiasis: pathogenesis, prevalence, challenges and therapeutic options. Pharmaceuticals. 2025 Mar 25;18(4):460.

3. Kantroo HA, Mubarak MM, Ahmad Z. Exploring therapeutic strategies for candidiasis: From current treatments to future perspectives. Bioorganic Chemistry. 2025 Jul 30:108797.

4. Van Rhijn N, White PL (2025) Antifungal treatment strategies and their impact on resistance development in clinical settings. J Antimicrob Chemother 80:3208-26.

5. Bucataru C, Ciobanasu C. Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. Microbiological research. 2024 Sep 1;286:127822.

6. Islam MM, Shuvo FR, Yadab SK, Chowdhury SM, Botul U, Hisham AA, Hasan M. Unlocking the therapeutic potential of AMPs: From mechanism to future research approaches. The Microbe. 2026 Apr 4:100715.

7. Oshiro KG, Rodrigues G, Monges BE, Cardoso MH, Franco OL. Bioactive peptides against fungal biofilms. Frontiers in microbiology. 2019 Oct 4;10:2169.

8. Afshari SG, Goudarzi M, Sharifnia F, Larypoor M, Hajikhani B, Seyedjavadi SS. Discovery of hyde C1 a broad spectrum antimicrobial peptide derived from chicory. Scientific Reports. 2025 Sep 29;15(1):33449.

9. PA W. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI document M27-A2. 2002.

10. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. Journal of clinical microbiology. 2001 Apr 1;39(4):1360-7.

11. Park C, Lee DG. Fungicidal effect of antimicrobial peptide arenicin-1. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2009 Sep 1;1788(9):1790-6.

12. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford assay for determining protein concentration. Cold Spring Harbor Protocols. 2020 Apr 1;2020(4):pdb-rot102269.

13. Cheng R, Xu Q, Hu F, Li H, Yang B, Duan Z, Zhang K, Wu J, Li W, Luo Z. Antifungal activity of MAF-1A peptide against Candida albicans. International Microbiology. 2021 May;24(2):233-42.

14. Park J, Kim H, Kang DD, Park Y. Exploring the therapeutic potential of scorpion-derived Css54 peptide against Candida albicans. Journal of Microbiology. 2024 Feb;62(2):101-12.

15. Amann V, Kissmann AK, Mildenberger V, Krebs I, Perez-Erviti JA, Martell-Huguet EM, Otero-Gonzalez AJ, Morales-Vicente F, Rodríguez-Castaño GP, Firacative C, Rodríguez A. Cm-p5 peptide dimers inhibit biofilms of *Candida albicans* clinical isolates, C. parapsilosis and fluconazole-resistant mutants of C. auris. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Jun 6;24(12):9788.

16. Jones B, Montgomery DC. Design of experiments: A modern approach. (No Title). 2020.

17. Peng C, Liu Y, Shui L, Zhao Z, Mao X, Liu Z. Mechanisms of Action of the Antimicrobial Peptide Cecropin in the Killing of *Candida albicans*. Life. 2022 Oct 11;12(10):1581.

18. Jayasinghe JN, Whang I, De Zoysa M. Antifungal efficacy of antimicrobial peptide Octominin II against Candida albicans. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Sep 13;24(18):14053.

19. Kim S, Lee DG. Role of calcium in reactive oxygen species-induced apoptosis in *Candida albicans*: An antifungal mechanism of antimicrobial peptide, PMAP-23. Free Radical Research. 2019 Jan 2;53(1):8-17.

20. Chen RC, Lan CY. Human antimicrobial peptide hepcidin 25-induced apoptosis in Candida albicans. Microorganisms. 2020 Apr 17;8(4):585.

21. Massey J, Zarnowski R, Andes D. Role of the extracellular matrix in Candida biofilm antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews. 2023 Nov;47(6):fuad059.

22. Wang L, Li K, Zhu J, Ding K, Tao X, Xu X, Zhu Y. Antifungal Activity and Mechanism of the Novel Antimicrobial Peptide Jelleine-Ic Against *Candida albicans*. Current Microbiology. 2025 Dec;82(12):1-2.

23. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013 Feb 15;4(2):119-28.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]