تحقیقی

نقش دما، pH و میزان غلظت گلوکز برمیزان تولید لوله زایا درشرایط برون تنی (In vitro) توسط قارچ کاندیداآلبیکنس

عباسعلی جعفری ندوشن
استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد

نویسنده مسئول: عباسعلی جعفری ندوشن
تلفن: ۰۳۵۱ ۸۲۴۱۷۵۱
پست الکترونیک:
jafariabbas@ssu.ac.ir
آدرس: یزد، صفاییه، خیابان بوعلی،دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

وصول مقاله: ۸۷/۱/۲۰
اصلاح نهایی:۸۷/۳/۱۲
پذیرش مقاله:۸۷/۳/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: *توانایی کاندیدا آلبیکنس برای تولید لوله زایا در مجاورت با سرم انسان از مهمترین مکانیسمهای بیماریزائی است و شروعی برای تغییر حالت این قارچ از شکل مخمری به شکل رشته ای محسوب می شود که تحت تاثیر بعضی عوامل محیطی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیربعضی عوامل محیطی مانند دما، pH ومیزان غلظت گلوکز بر میزان تولید لوله زایا توسط گونه کاندیداآلبیکنس درشرایط برون تنی بوده است.*

روش بررسی: *تست تولید لوله زایا (Germ tube)با سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) با استفاده از سرم انسان دارای قند نرمال در حرارت، pHوغلظتهای مختلف گلوکز در آزمایشگاه انجام یافت و شروع تولید اولین سلولهای تولید کننده لوله زایا و همچنین میانگین درصد سلولهای واجد لولهٔ زایا پس از دو ساعت محاسبه گردید. میانگین درصد سلولهای واجد لوله زایا در شرایط مختلف یا به عبارتی میزان تحریک قارچ برای تبدیل از حالت مخمری به رشته ای از نظر آماری (One-way ANOVA) مقایسه شدند.*

یافته ها: *تولید لوله زایا در حرارت ۳۷ درجه، pHبرابر ۶/۵و در غلظت ۳۰ mg/ml گلوکز دارای بالاترین میزان در مقایسه با سایر شرایط محیطی و تغذیه ای بود (P=۰/۰۰۱). همچنین این شرایط منجر به کوتاهترین زمان برای مشاهده اولین سلولهای مخمری کاندیدا واجد لوله زایا در شرایط برون تنی شده بود.*

نتیجه گیری: *به نظر می رسد که در بدن میزبان هم همین شرایط باعث تحریک قارچ به تولید لوله زایا در بدن، بخصوص در افراد دیابتی و در نتیجه باعث تشدید قدرت تهاجمی قارچ مشابه شرایط برون تنی شود.*

واژه های کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس، لوله زایا، برون تنی، دما، pH گلوکز*

مقدمه

پیشرفتهای جدید تکنولوژی پزشکی مانند رادیوتراپی, کموتراپی, پیوند اعضا وهمچنین افزایش میزان بقاو جمعیت بیماران ایمنوساپرس, افراد مبتلا به بدخیمیها وایدزیها منجر به گسترش و شیوع بیماریهای قارچی فرصت طلب در طول چنددهه گذشته شده است (۱ و۲). کاندیدیازیس ازجمله بیماریهای قارچی فرصت طلب و دارای علایم بالینی بسیار متنوع است که می تواند از پوست و ناخن گرفته تا مخاط دهان ، واژن و ارگانهای داخلی (کاندیدیازیس سیستمیک) را درگیر نماید. عامل این بیماری یعنی گونه های مختلف کاندیدا ، چهارمین عامل شایع از عوامل عفونتزای بیمارستانی است (۳). گونه های مختلف کاندیدا از جمله کاندیدا آلبیکنس بخشی ازفلورنرمال میکروبی بدن انسان است که درسطوح جلدی ومخاطی، پوست، دهان، دستگاه گوارش و واژن انسان به صورت فلور نرمال و همزیست وجود دارد. به علاوه گونه های مختلف کاندیدا ازجمله کاندیداآلبیکنس به طور طبیعی زمانی که سیستم ایمنی بدن ضعیف شود و یا تعادل میکروبی فلورنرمال بدن به هم می خورد، تغییر حالت داده ،تبدیل به فرم فرصت طلب بیماریزا و مهاجم می شود. بعلاوه کاندیدا یکی ازعوامل بیماریزای مهاجم قارچی در دیابتیها، بدخیمیها، نوزادان نارس وافراد مبتلا به ایدز می باشد (۴و۵و۶و۷).

گونه کاندیداآلبیکنس مهمترین گونه تهاجمی (ویرولانت) بیماری کاندیدیازیس است و تعدادی ازعوامل ویرولانس درکاندیداآلبیکنس وجودداردکه به صورت تجربی نیزاثبات شده است (۸ و۹). درمیان این عوامل توانایی تغییر مورفولوژی کاندیدا آلبیکنس ازحالت بلاستوکونیدیا (فرم مخمری) به فرم میسلیال با شروع تولید لوله زایا توسط این قارچ موضوع بسیاری ازتحقیقات گسترده ست(۷). ازجنس کاندیدا تنها دو گونه کاندیدا آلبیکنس وکاندیدا دابلینسیس علاوه بر توانایی تولید میسلیوم کاذب توانایی تولید لوله زایا یاجرم تیوب نیزدارند که دربیماریزایی این قارچها مهم است که اولی از شایعترین و مهمترین عامل کاندیدا کاندیدیازیس و دومی از گونه های جدا شده از دهان بیماران مبتلا به ایدزاست که اخیرا شناخته شده است(۷).

میسیلیوم کاذب مشابه بلاستوکونیدی باعمل جوانه زدن تشکیل می شود، هرچندکه سلول جدید متصل به سلول مادربوده، طویل می شود. برعکس جرم تیوب رشدخارج سلولی بلاستوکونیدیها است که به وسیله رشد راسی یک سلول وبه دنبال آن تشکیل دیواره عرضی درپشت نوک رونده آن به وجودمی آید. درحقیقت لوله زایا مقدمه و شروع تشکیل میسلیوم حقیقی است که دارای دیواره های موازی می باشد(۹و ۱۰و ۱۱و ۱۲و ۱۳). درشرایط In vivo تغییرمورفولوژیک مخمری به میسلیال وازجمله جرم تیوب به وسیله شرایط محیطی ویاتغذیه ای (مانندحرارت ، pH ومنبع کربن) تقویت می شود(۱ و۲ و۱۴).

درمطالعه حاضر تاثیربعضی عوامل محیطی مانند دما، pH ومیزان غلظت گلوکز بر میزان تولید جرم تیوب (لوله زایا) توسط گونه کاندیداآلبیکنس درشرایط برون تنی (In vitro) بررسی شده است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی مداخله ای بوده که بر اساس تست استاندارد تولید لوله زایا (Germ tube test)در شرایط آزمایشگاهی(In vitro) اجرا گردیده است و در حقیقت برای تشخیص افتراقی کاندیداآلبیکنس از سایرگونه های کاندیدا در مجاورت با سرم انسان، حرارت ۳۷ درجه به کار می رود(۷). این تست برای بررسی نقش عوامل محیطی دما، pHو همچنین اهمیت غلظت گلوکز بر میزان تحریک تولید لوله زایا در شرایط کنترل شده و در ۵ تکرار انجام یافت. برای این منظور سوش استاندارد کاندیداآلبیکنس (ATCC 10231) برروی محیط سابورودکستروزآگار(Merck, Germany) کشت تهیه وسپس کلنیهای تازه آن با استفاده ازیک لوپ استریل داخل لوله های آزمایش محتوی ۰/۵ میلی لیتر سرم انسان (سرم فردی با قند خون نرمال معادل میزان گلوکز ۹۰ mg/dl ناشتا) سوسپانسیون (1×10^5 CFU/ml) تهیه گردید. برای بررسی نقش عوامل مذکور این سوسپانسیون درشرایط مختلف کنترل شده به مدت ۲ ساعت نگهداری وآزمایش شدند. این شرایط شامل درجه حرارتهای۲۷،۳۲، ۳۷ و۴۲ درجه سانتیگراد،pH های برابر۵/۵, ۶, ۶/۵، ۷ودرمجاورت با غلظتهای صفر, ۱۰, ۲۰ و ۳۰mg/ml گلوکز خالص(Merck, Germany)بوده است. برای تنظیم pH ازاسید کلریدریک ۰/۱ نرمال و با کمک میکروپیپت استفاده شد. در موارد افزایش حجم احتمالی تعداد نهایی سلولهای کاندیدا در

سوسپانسیون سلولی اصلاح گردید. در این آزمایشها سعی شدکه با تغییر هر پارامتر مورد بررسی سایر پارامترها ثابت نگهداشته شود. پس از تهیه سوسپانسیون مخمری (CFU/ml ۱۰۵×۱) با شرایط فوق درفواصل ۱۰ دقیقه ای وحداکثر تا ۲ ساعت یک قطره ازسوسپانسیون تست را بر روی یک لام هموسیتومتر (توما) زیرمیکروسکوپ قرارداده ، باپوشاندن با یک لامل تمیز در زیر میکروسکوپ باعدسی شماره ۴۰ و ۱۰ بررسی شدند. کوتاهترین زمانی که رشته های ظریف مشخصه جرم تیوب (لوله زایا) دراطراف سلولهای مخمری مشاهده می شددر هر آزمایش ثبت ودرنهایت پس از۲ ساعت میانگین درصدسلولهای مخمری واجدلوله زایادر ۵ میدان دید برای هر شرایط آزمایش شمارش و میانگین و انحراف معیار آنها محاسبه گردید.

برای هرشرایط موردآزمایش ۵ تکرار (از۵ کلنی مختلف) کاندیدا آلبیکنس آزمایش شده و میانگین درصد سلولهای واجدلوله زایا را در شرایط مختلف باتست آماری One-way ANOVA مقایسه و مقدار۰/۰۵ ≥P ازنظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تولید لوله زایا در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد, pH برابر ۶/۵و در غلظت mg/ml ۳۰ گلوکز بالاترین میزان بوده(جداول شماره ۱تا ۳) و همچنین در این شرایط کوتاهترین زمان (به دقیقه) برای مشاهده اولین مخمرهای دارای لوله زایا مورد نیاز بود (جدول شماره ۴).

با آزمون آماری One-way ANOVA تفاوت بین میانگین درصد سلولهای دارای لوله زایا در دماهای مختلف، pHهای مختلف و غلظتهای مختلف مورد بررسی از نظر آماری معنی دار بود (P=/۰۰۰۱).

با آزمون آماری Tukey برای مقایسه دو به دو هرکدام از پارامترهای مختلف موردآزمایش، به استثنای تفاوت بین میانگین سلولهای داری لوله زایادر دو غلظت صفر و ۱۰ میلیگرم گلوکز (P=۰/۳۹۴)، در سایر موارد مقایسه دو به دو پارامترهادارای تفاوت آماری معنی دار بود(P=۰/۰۰۱).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار درصد سلولهای C. albicans واجد لوله زایا پس از دو ساعت در حرارتهای مختلف مورد بررسی

دما(درجه سانتیگراد)	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	انحراف معیار
۲۷	۱	۰
۳۲	۷/٦	۱/۱٤
۳۷	٤٥	٤/۱
٤۲	۳۲/۸	۲/۸

جدول شماره ۲: میانگین و انحراف معیار درصد سلولهایC. albicans واجد لوله زایا پس از دو ساعت در pHمختلف مورد بررسی

pH	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	انحراف معیار
٥/٥	صفر	صفر
٦	۲۲	۱/٤
٦/٥	٦۰	۱/٦
۷	۳٤/۸	۱/۹

جدول شماره ۳: میانگین و انحراف معیار درصد سلولهای C. albicans واجد لوله زایا پس از دو ساعت در غلظتهای مختلف گلوکز مورد بررسی

غلظت گلوکز (mg/ml)	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	انحراف معیار
صفر	۲۱	۱/۶
۱۰	۲۵	۱/۶
۲۰	۵۷/۲	۵/۶
۳۰	۸۸/۶	٤/۸

جدول شماره ٤: میانگین و انحراف معیار زمان شروع تولید لوله زایا (دقیقه) در شرایط مختلف مورد بررسی توسط کاندیدا آلبیکنس

		میانگین سلولهای واجد لوله زایا	انحراف معیار
(دما درجه سانتیگراد)	۲۷	۹۰	۱۵/۸
	۳۲	۷۰	۷/۱
	۳۷	۳۲	۱٤/۸
	٤۲	٤٦	۱۱/٤
pH	۵/۵	٦٦	۱۱/٤
	٦	۲۰	۷/۱
	٦/۵	۱۲	٤/۵
	۷	۳۰	۷/۱
غلظت گلوکز(Mg/ml)	صفر	۳٦	۱۱/٤
	۱۰	۳۰	۷/۱
	۲۰	۱۸	٤/۵
	۳۰	۱۲	٤/۷

بحث

توانایی تغییرحالت قارچ ازفرم مخمری به فرم میسلیال (تولید لوله زایا) درحقیقت نوعی مکانیسم تهاجمی قارچ دربدن میزبان محسوب می شودکه دربیماریزایی گونه های کاندیدا آلبیکنس موثر می باشد(۱ و۲). به علاوه مطالعات جدیدبیانگراین است که این پدیده (تولیدلوله زایا) یکی ازمکانیسمهای فرار قارچ کاندیدا آلبیکنس ازسیستم ایمنی سلولی محسوب می شود، زیرا به کمک این مکانیسم این قارچ می‌تواند بیگانه خواری را مهار و باعث تخریب سلول بیگانه خوار شود(۱۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعدادی از عوامل محیطی و تغذیه ای مانند PH ، حرارت و غلظت گلوکز می تواند در شرایط آزمایشگاهی(برون تنی) بر میزان تولید لوله زایا یا در حقیقت میزان قدرت تهاجمی و بیماریزایی قارچ موثر باشد. در مطالعه حاضر تاثیر عامل محیطیPH و درجه حرارت و یک عامل تغذیه ای یعنی میزان غلظت گلوکز به عنوان منبع کربن مورد نیاز قارچدر شرایط برون تنی آزمایش و ارزیابی شد.

حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، pH برابر ۶/۵ وغلظت ۳۰ mg/ml

گلوکز باعث تحریک تولیدلوله زایا توسط کاندیدا آلبیکنس شد که این افزایش میزان تولید لوله زایا در مقایسه با سایر شرایط از نظر آماری معنی دار بود (P=/۰۰۰۱)

تحریک تولید لوله زایا در pH برابر ۶/۵ وحرارت ۳۷ درجه سانتی گراد مشابه بانتایج مطالعات دیگر (۱۶و ۱۷) بوده ، تاثیرغلظت گلوکز که دراین مطالعه بررسی شده است، مشابه مطالعه Casanova وهمکاران است که درمطالعه آنهااز 3-acetyl-D-glucose amine و Hemin به عنوان منبع کربن برای تحریک تولیدلوله زایا به کاررفته بود(۱۸). غلظت بالای گلوکزدرتحریک تولید لوله زایا دراین مطالعه ممکن است نشان دهنده اهمیت بیماریزایی بالای این قارچ دربیماران دیابتی باشد.

در این مطالعه غلظت صفر گلوکز در لوله آزمایش معادل غلظت خون فرد با میزان گلوکز طبیعی (سرم فرد نرمال برای تست استفاده شده), غلظت ۱۰, ۲۰و۳۰ میلی گرم در هر میلی لیتر در لوله آزمایش به ترتیب معادل میزان غلظت سرمی گلوکز فردی با میزان ۲۰۰, ۳۰۰و ۴۰۰ میلیگرم در هر دسی لیتر سرم می باشد.

افزایش سرعت در تولید و میزان تولید لوله زایا در غظتهای بالای گلوکزدر مطالعه حاضر ممکن است نشان دهنده بیماریزا شدن این قارچ و افزایش قدرت تهاجمی آن در بیماران دیابتی باشد. بیماری دیابتی ازجمله عوامل مستعد کننده و زمینه ساز برای بیماریزا شدن قارچها از جمله کاندیدا بوده و ممکن است باعث بروز علایم بالینی جلدی، جلدی-مخاطی و منتشره کاندیدیازیس در دیابتیها شود (۷،۱۵).

درمطالعات مشابهی تاثیرتحریک کننده وافزاینده میزان تولید لوله زایا با کاندیداآلبیکنس بر عوامل مختلفی مانند همین (Hemin) (۱۸) ، دارو های ضد قارچی(۱۹) ، بعضی آمینواسیدها (۸) ویک عامل گرفته شده ازپلاکت (۲۰) درشرایط برون تنی آزمایش شده و نشان داده شده است.در این مطالعه برای آزمایشهای تولید لوله‌زایا در شرایط آزمایشگاهی از سرم انسان استفاده شد.

Isibok وهمکاران (۱۴) درمطالعه ای نشان دادندکه استفاده ازسرم انسان برای تست لوله زایا درمقایسه باسرم گاو وگوسفند مفیدتراست.

بعلاوه میزان تولید لوله زایا در شرایط بی هوازی (غلظت CO_2 برابر ۱۰٪) درمقایسه باشرایط هوازی بیشتربوده است.

Chengو همکاران در مطالعه ای بر روی واکنش کاندیدا آلبیکنس در مجاورت بامیزان بالای استروژن میزبان نشان دادند که تیتر بالای استروژن می تواند باعث تشدید درسرعت تولید لوله زایا و افزایش طول لوله زایا در این قارچ شود. آنها نشان دادند که تیتر بالای استروژن می تواند باعث تحریک این قارچ به ایجاد واژینیت کاندیدایی در خانمها شود (۲۱).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضربه نظر می رسد که در بدن میزبان هم غلظت بالای گلوکز و کاهش pH باعث تحریک قارچ به تولید لوله زایا در بدن، به خصوص در افراد دیابتی و در نتیجه باعث تشدید ویرولانس قارچ مشابه با شرایط برون تنی می شود. به همین دلیل کنترل قند خون دربیماران دیابتی در جلوگیری از ابتلا به کاندیدیازیس به طور مؤثر کمک می کند.

تشکر و قدردانی

ازآقایان حسین زرینفر و علی جبالی که در انجام این تحقیق با بنده همکاری داشته اند تقدیر و تشکر بعمل می آید.

References

1) Warnock DW. *Trends in the epidemiology of invasive fungal infections*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2007;48(1):1-12.

2) Galle F, Catania MR, Liguori G. *Nosocomial candida infections: epidemiology of candidaemia*.J Prev Med Hyg. 2006;47(3):119-26

3) De Marie S.*New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections 2000*;85(1):88-93.

4) Ray D, Goswami R, Dadhwal V, Goswami D, Banerjee U, Kochupillai N. *Prolonged (3-month) mycological cure rate after boric acid suppositories in diabetic women with vulvovaginal candidiasis* **.** 2007;55(4):374-7. Epub 2007;10.

5) Sheng WH, Wang JT, Lin MS, Chang SC. *Risk factors affecting in-hospital mortality in patients with nosocomial infections.*J Formos Med Assoc. 2007;106(2):110-8.

6) Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A.*Nosocomial fungal infections: candidemia*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;34(3):213-20

7) Calderone, RA. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington D.C. 2002.

8) Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study *of germ tube formation by Candida albicans after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. 2007;27;88(1):16-20. Epub 2007 . 8.

9). Marot-Leblond A, Grimaud L, Nail S, Bouterige S, Apaire-Marchais V, Sullivan DJ, etal. *New monoclonal antibody specific for Candida albicans germ tube.*J Clin Microbiol. 2000 ;38(1):61-7.

10) Merson-Davies L, Hopwood V, Robert R, Marot-Leblond A, Senet JM, Odds FC. *Reaction of Candida albicans cells of different morphology index with monoclonal antibodies specific for the hyphal form*.J Med Microbiol. 1991;35(6):321-4

11) Hudson DA, Sciascia QL, Sanders RJ, Norris GE, Edwards PJ, Sullivan PA, etal. *Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in Candida albicans Microbiology.* 2004;150(Pt 9):3041-9

12) Ollert MW, and Calderone RA. *A monoclonal antibody that defines a surface antigen on Candida albicans hyphae cross-reacts with yeast cell protoplasts*. 1990;58(3):625-31.

13) Torosantucci A, Gomez MJ, Bromuro C, Casalinuovo I, Cassone A**.** *Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial forms of Candida albicans***.** J Med Vet Mycol. 1991;29(6):361-72.

14) Isibor JO, Eghubare AE, Omoregie R. *Germ Tube Formation in Candida albicans: Evaluation of Human and Animal Sera and Incubation Atmosphere*. Shiraz E-Medical Journal 2005; 6(1&2). (http://semj.sums.ac.ir/vol6/jan2005/germtube.htm).

15) Ajello L and Haaay RJ. *Candida species and Blastoshizomyces, Microbiology and Microbial Infections, Nineth edition*, Volum 4 (Medical Mycology), Arnold 1998, 423-460.

16) Buffo J, Herman MA, Soll DR**.** *A characterization of pH-regulated dimorphism in Candida albicans* Mycopathologia. 1984;15;85(1-2):21-30.

17) Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A**.** *Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-Candida albicans germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients***.** Rev Iberoam Micol. 2006;23(4):209-15.

18) Casanova M, Cervera AM, Gozalbo D, Martínez JP. *Hemin induces germ tube formation in Candida albicans.*Infect Immun. 1997;65(10):4360-4.

19) Vale-Silva LA, Buchta V, Valentová E. *Effect of subinhibitory concentration of some established and experimental antifungal compounds on the germ tube formation in Candida albicans*. Folia Microbiol (Praha). 2007;52(1):39-43.

20) Kennedy MJ, Calderone RA, Cutler JE, Kanabe T, Riesselman MH, Robert R, etal . *Molecular basis of Candida albicans adhesion.*J Med Vet Mycol. 1992;30 Suppl 1:95-122.

21) Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL.*Cellular and olecular biology of Candida albicans estrogen response* Eukaryot Cell. 2006;5(1):180-91.