

بررسی اثر داروی ضد قارچی (گریزوفولونین) بر بیان ژن کیتین سنتاز در قارچ ترایکوفایتون روبروم

مهتاب وفائی^{۱*}، ساسان رضایی^۲، فاطمه نوربخش^۳، هاجرالسادات قادری^۴، کامیار متواضع^۵، مسعود امامی^۶، محمد رضا صفری^۷

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲. دانشیار قارچ‌شناسی، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی، بخش بیولوژی مولکولی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۵. استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۶. استاد قارچ‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۷. مربی قارچ‌شناسی، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه بیولوژی مولکولی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*آدرس مسؤول مکاتبات: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال،

پست الکترونیکی: Mahtab.Vafaei@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱/۳۰

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱۷

چکیده

قارچ ترایکوفایتون روبروم (*Trichophyton rubrum*) یکی از درماتوفیت‌های انسان دوست با انتشار جهانی است و از عوامل شایع کچلی در انسان به ویژه کچلی کشاله ران، بدن، دست و پا به شمار می‌رود. روش‌های مرسوم آزمایشگاهی در بررسی و مطالعه این قارچ علی‌رغم وقت‌گیر و طولانی بودن، همچنان روش‌های اصلی هستند؛ زیرا با وجود مطالعات فراوان در زمینه بیولوژی سلولی و مولکولی، بررسی‌های مولکولی چندانی درباره قارچ درماتوفیت انجام نشده است. امروزه مقاومت نسبت به داروهای ضد قارچی دیده می‌شود که یافتن داروهای جدید یا دستیابی به اثربخشی مناسب داروهای موجود، مستلزم شناخت دقیق‌تر به ویژه در زمینه مولکولی است. در این مطالعه بنیادی، رقت‌هایی از گریزوفولونین که توأم با رشد قارچ بود تهیه شد و با نمونه شاهد که تحت تأثیر دارو واقع نشده بود مقایسه گردید. سپس استخراج RNA انجام شد و به دنبال آن Multiplex-PCR هر سه نمونه برای ژن کیتین سنتاز و بتا‌کتین انجام گردید. از نظر میکروسکوپی در رقت $0.2 \mu\text{g/ml}$ میزان کوتاه و خمیده‌شدن میسیلیوم‌ها نسبت به رقت $0.06 \mu\text{g/ml}$ بیشتر بود، درحالی که از نظر میزان بیان ژن کیتین سنتاز، تفاوتی بین نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تأثیر گریزوفولونین مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: درماتوفیت، ترایکوفایتون روبروم، کیتین سنتاز، گریزوفولونین، Multiplex-PCR

مقدمه
سایر استرس‌های محیطی محافظت می‌کند و شامل پلیمرهایی از کیتین، گلوکان، مانان و گلیکوپروتئین است (۱).

دیواره سلولی قارچ‌ها دارای ساختاری دینامیک است که از سلول در برابر تغییرات فشار اسمزی و

محصولات ناقص DNA و در نتیجه عدم نسخه برداری حاصل می شود (۱۷). در مطالعه حاضر، بیان ژن کد کننده کیتین سنتاز در قارچ ترایکوفایتون روبروم تحت تأثیر گریزئوفولونین بررسی گردید تا مشخص شود با غلظت های مختلف این دارو میزان بیان ژن و در نتیجه میزان تولید پروتئین آن تغییر می یابد یا ثابت می ماند. همچنین تغییرات میکروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

قارچ ترایکوفایتون از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران بدست آمد و پس از مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، تأیید و با سویه استاندارد مقایسه گردید.

سوسپانسیونی از میکروکنیدها حاوی $10^6 \times 10^{-6} - 15$ میکروکنیدی در آب مقطر استریل تهیه شد (۱۸).

رقت هایی از گریزئوفولونین و سوسپانسیون میکروکنیدی به محیط کشت ساپرو دکستروز برات افزوده شد تا رقتی به دست آید که میزان رشد قارچ در آن کمتر از نمونه شاهد باشد. بدین منظور از استوک 0.001 (g/ml) رقت های 0.2 و 0.06 ($\mu\text{g/ml}$)، رشد کافی از قارچ مورد نظر را داشتند و میزان رقت نهایی دارو در این دو نمونه به ترتیب 0.02 ($\mu\text{g/ml}$) و 0.06 ($\mu\text{g/ml}$) به دست آمد و سپس در پلیت ها سوسپانسیون میکروکنیدی ترایکوفایتون روبروم تحت تأثیر دارو و نیز در غیاب دارو کشت داده شد. پس از ۱۲ روز از نمونه ها لام تهیه شد و به طور میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. سپس کلنی های رشد یافته در محیط کشت فاقد دارو و نیز هر یک از رقت های دارویی $0.02 \mu\text{g/ml}$ و $0.06 \mu\text{g/ml}$ به طور جداگانه جمع آوری شد و پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع درون بوتله چینی کوبیده شد. پودرهای میسلومی به دست آمده در محلول گوانیدین

کیتین پلیمری بدون شاخه از N-استیل گلوکز آمین با اتصالات β -(۱,۴) است و در گروه های مختلفی از ارگانسیم ها شامل قارچ ها، حشرات، سخت پوستان و آنگ ها وجود دارد، در حالی که انسان ها فاقد آن هستند. بنابراین می تواند هدف مناسبی برای داروهای ضد قارچی باشد (۴,۳,۲). کیتین به وسیله آنزیم های کد شده از روی ژن های کیتین سنتاز ساخته می شود و برخی دیگر از محصولات ژنی، فعالیت و جای گیری کیتین سنتازها را تحت تأثیر قرار می دهند (۵). قارچ ها چندین کیتین سنتاز دارند که برخی از آن ها ممکن است در مراحل معین، ضروری باشند (۶). سنتز کیتین مستقیماً به وسیله فعالیت آنزیم های کیتین سنتاز (CS) انجام می شود و مخمر ساکارومیسس ———— و *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان یک مدل بیولوژیک برای شناسایی فعالیت کیتین سنتازها مورد توجه است (۸,۷). امروزه بسیاری از ژن های کیتین سنتاز از قارچ های مختلف شناسایی شده و پلی پپتیدهای حاصل از این ژن ها به شش کلاس تقسیم شده اند (۹). نتایج بررسی ها حاکی از شباهت کیتین سنتاز حشرات از نظر کاتالیتیکی و توالی با آنزیم های مخمری و قارچی است (۱۰,۱۱).

درماتوفیت ها دسته ای از قارچ های رشته ای کراتین دوست هستند که جلد انسان و حیوانات را مورد حمله قرار می دهند (۱۲). ترایکوفایتون روبروم (*Trichophyton rubrum*) از جمله درماتوفیت هایی است که عامل اصلی برای ایجاد درماتومایکوزیس سطحی مانند Onychomycosis و Tinea Pedis به شمار می آید (۱۳). کلونیزه شدن درماتوفیت ها محدود به بافت های کراتینه مانند اپیدرم، مو و ناخن ها است (۱۴).

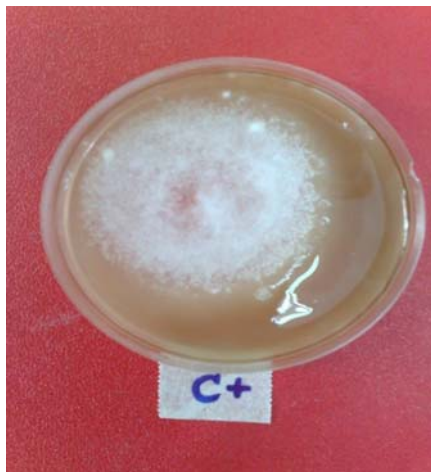
گریزئوفولونین محصول متابولیکی از کپک پنی سیلیوم گریزئوفولوم (*Penicillium griseofulvum*) است (۱۵). این دارو بیش از ۴۰ سال است که برای درمان درماتوفیتوزیس به کار می رود (۱۶). توقف رشد قارچ توسط گریزئوفولونین بر اثر شکستن ساختار دوک میتوزی سلول ها و در نتیجه توقف متافاز تقسیم سلولی یا به وسیله

Antisense; 5'-TCG CAG GGT TAG
GAT ACCA<C>- 3'

Multiplex- PCR تحت برنامه 90°C به مدت ۵ دقیقه (یک سیکل)، 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 56°C به مدت ۱ دقیقه، 72°C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه (۳۵ سیکل) و 72°C به مدت ۷ دقیقه (یک سیکل) انجام شد و محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد (۱۸).

نتایج

مشاهده کلنی‌های قارچی در پلیت‌های نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تأثیر رقت‌های $0.2\ \mu\text{g/ml}$ و $0.06\ \mu\text{g/ml}$ گریزئوفولویین پس از ۱۲ روز حاکی از آن بود که در پلیت مربوط به نمونه شاهد، کلنی قارچی به خوبی رشد کرده (تصویر ۱) درحالی که میزان رشد قارچ در نمونه‌های تحت تأثیر دارو کمتر است و به علاوه، کلنی‌ها نیز حالت خرد شده دارند و به ویژه این حالت خردشدگی کلنی‌ها در رقت $0.2\ \mu\text{g/ml}$ بیش از رقت $0.06\ \mu\text{g/ml}$ است (تصویر های ۲ و ۳).



تصویر ۱ - کلنی قارچ ترایکوفایتون روبروم شاهد در محیط سابرو دکستروز براث.

ایزوتیوسیانات (GITC) سرد به صورت هموژنیزه درآمدند.

حجم $500\ \mu\text{l}$ از این محلول هموژنیزه برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. سپس مراحل استخراج RNA با سدیم استات ۳ مولار ($500\ \mu\text{l}$)، فنل ($500\ \mu\text{l}$) و کلروفرم ($100\ \mu\text{l}$) همراه با سانتریفیوژ در $12000\ \text{g}$ به مدت ۵ دقیقه دنبال شد. پس از افزودن حجم مساوی از ایزوپروپانل و قرارگیری نمونه‌ها در حرارت 20°C به مدت یک ساعت، سانتریفیوژ در $12000\ \text{g}$ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس GITC ($150\ \mu\text{l}$) و ایزوپروپانل ($150\ \mu\text{l}$) افزوده شده و مخلوط حاصل در 20°C به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ در $12000\ \text{g}$ به مدت ۵ دقیقه و افزودن الکل مطلق سرد ($500\ \mu\text{l}$) و سانتریفیوژ مجدد در $12000\ \text{g}$ به مدت ۵ دقیقه، رسوب سفید و سختی به دست آمد که در بافر TE8 ($50\ \mu\text{l}$) داغ حل شد (۱۸).

RNA حاصل با استفاده از کیت Fermentas

به منظور ساخت cDNA تحت برنامه 70°C به مدت ۵ دقیقه، 25°C به مدت ۵ دقیقه، 42°C به مدت ۶۰ دقیقه و 70°C به مدت ۱۰ دقیقه، برای نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تأثیر دارو مورد استفاده قرار گرفت. OD ۲۶۰ برای cDNA هر سه نمونه با اسپکتروفتومتر خوانده شد تا میزان cDNA لازم برای هر سه نمونه به دست آید، سپس master mix با فرمول $2/5\ \mu\text{l}$ از پرایمرها، $1\ \mu\text{l}$ از Taq DNA polymerase، $1\ \mu\text{l}$ از dNTP و $2\ \mu\text{l}$ cDNA شاهد، $2/5\ \mu\text{l}$ از cDNA رقت 0.06 و $2/2\ \mu\text{l}$ از cDNA رقت 0.2 تهیه شد که با استفاده از آب مقطر استریل به حجم $50\ \mu\text{l}$ رسانده شد (۲۲). با استفاده از پرایمرهای سینتتیک شرکت سیناژن برای ژن کیتین سنتاز

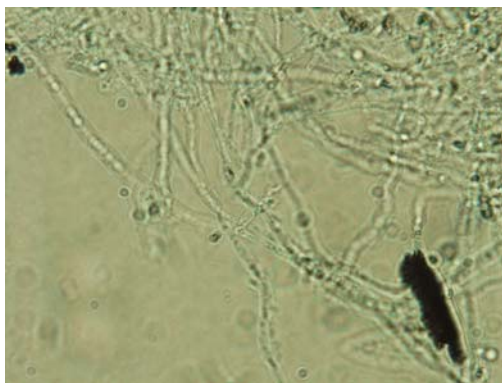
Sense; 5'- ATG TAC' AAC GAA GAC
GAG TTC- 3'

Antisense ; 5'- AAT AAA GCC AAA
GGC AGA CTC- 3'

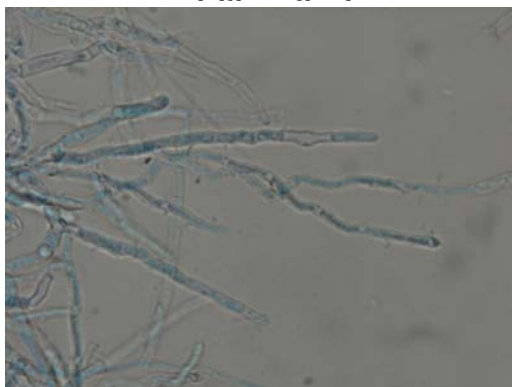
و پرایمرهای سینتتیک شرکت سیناژن برای ژن بتا

اکتین

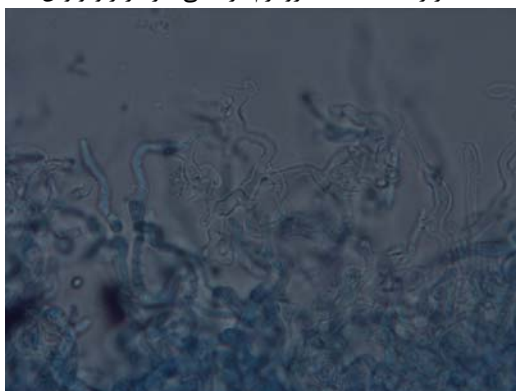
Sense; 5'-ACT ACA GCT CCG GAA
TGT G<C>- 3'



تصویر ۴- میسلیم‌های باریک و دراز در ترایکوفایتون روبروم شاهد، کشت شده در سابرو دکستروز براث.

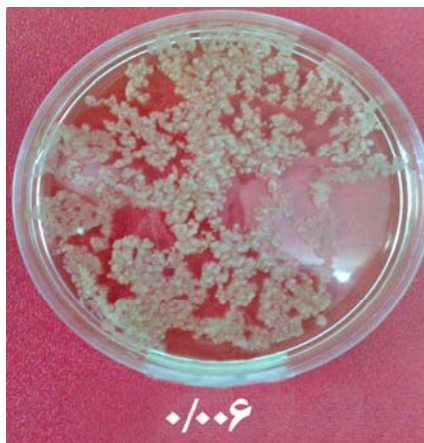


تصویر ۵- میسلیم‌های کوتاه و چروکیده ترایکوفایتون روبروم تحت تاثیر رقت ۰/۰۰۶ میکروگرم در میلی‌لیتر گریزئوفولوین.

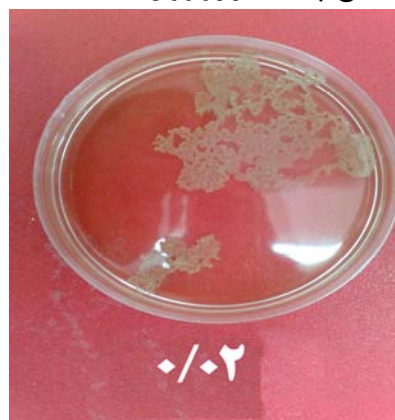


تصویر ۶- میسلیم‌های کوتاه‌تر و چروکیده‌تر در ترایکوفایتون روبروم تحت تاثیر رقت ۰/۰۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر گریزئوفولوین.

برای اطمینان از استخراج RNA، پس از الکتروفورز نمونه حاوی RNA روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، باندهای rRNA ۱۸ S و rRNA ۲۵ S دیده شد (تصویر ۷). این باندها نماینده وجود و جداسازی RNA است. بنابراین RNA به دست آمده دارای کیفیت لازم برای انجام PCR در مراحل بعدی می‌باشد.

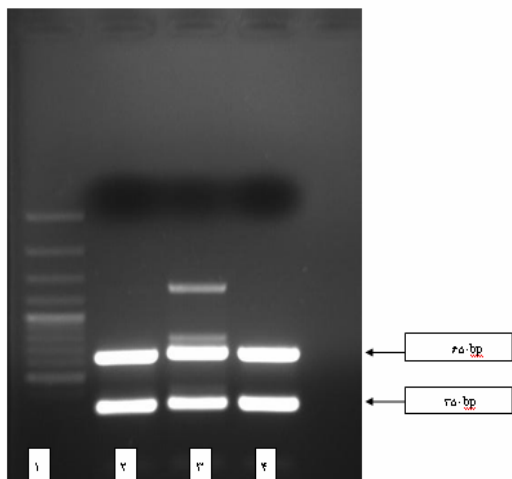


تصویر ۲- کلنی قارچ ترایکوفایتون روبروم تحت تاثیر رقت ۰/۰۰۶ µg/ml گریزئوفولوین.



تصویر ۳- کلنی قارچ ترایکوفایتون روبروم تحت تاثیر رقت ۰/۰۰۲ µg/ml گریزئوفولوین.

بررسی نمونه‌ها با لاکتوفنل توسط میکروسکوپ نشان داد که میسلیم‌های نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های تحت تاثیر دارو کشیده تر بوده و قطر کمتری دارند اما در نمونه‌های مجاور شده با دارو چروکیده شده‌اند و میزان چروکیده و کوتاه شدن میسلیم‌ها در رقت ۰/۰۰۲ µg/ml بیش از رقت ۰/۰۰۶ µg/ml است. بنابراین، با بالا رفتن میزان رقت دارو، میزان کوتاه و چروکیده شدن میسلیم‌ها بیشتر می‌شود (تصویرهای ۴ و ۵).



تصویر ۸- تصویر الکتروفورز: (۱) سایز مارکر؛ (۲) نمونه شاهد؛ (۳) رقت ۰,۰۰۶ میکروگرم در میلی لیتر؛ (۴) رقت ۰,۰۰۲ میکروگرم در میلی لیتر. عدم تغییر در بیان ژن کیتین سنتاز در ناحیه ۶۵۰ bp و بتا کیتین در ناحیه ۳۵۰ bp.

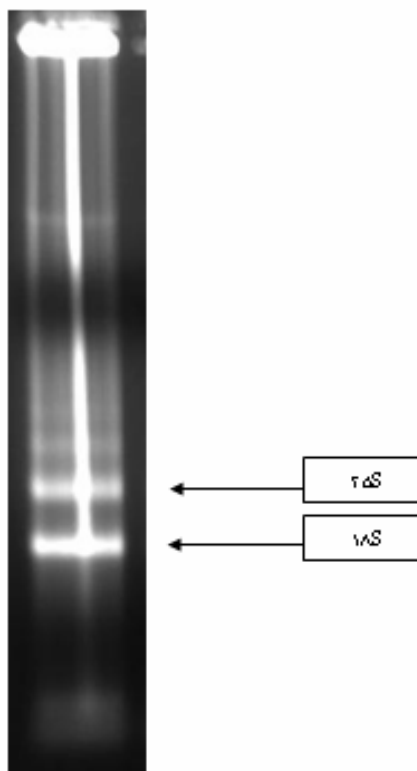
بحث

مطالعه مولکولی حاضر حاکی از آن بود که گریزوفولون تأثیری روی بیان ژن کیتین سنتاز تریکوفایتون روبروم ندارد، هر چند که تغییراتی به صورت کوتاه و خمیده شدن میسلیومها به علت اثر این دارو بر تقسیم سلولی و شکستن دوک میتوزی مشاهده می شود که می توان گفت این دارو، تأثیری روی بیان ژن ساختمانی ندارد اما بر ژن غیر ساختمانی مانند ATPase- Subunit G مؤثر بوده است.

در میان بیماری های جلدی، کچلی ها همچنان از شیوع بالایی برخوردار هستند و در بین عوامل درماتوفیت، تریکوفایتون روبروم از جمله شایع ترین عوامل محسوب می شود. این قارچ تقریباً تمامی نواحی پوست و ضمایم آن را مورد حمله قرار می دهد. تریکوفایتون روبروم جزو معدود درماتوفیت هایی است که منحصراً برای رشد روی بدن انسان تطابق یافته اند و تحت عنوان درماتوفیت های انسان دوست (Anthropophilic) نامیده می شوند (۱۲،۱).

مراحل تشخیص عفونت با این قارچ، وقت گیر و زمان بر است و گزارش موارد منفی کاذب با روش های تشخیصی موجود بالا است (۱۹، ۲۰). در این راستا رویکرد به روش های تشخیصی سریع و همچنین

به منظور مقایسه بیان ژن در نمونه شاهد با نمونه های تحت تأثیر دارو و نیز هر یک از رقت های دارویی با یکدیگر، Multiplex-PCR در دستگاه Thermal Cycler انجام شد که باند مربوط به ژن کیتین سنتاز با وزن ۶۵۰ bp و باند مربوط به ژن بتا-اکتین با وزن ۳۵۰ pb در کنار سایز مارکر پس از الکتروفورز و انجام رنگ آمیزی ژل الکتروفورز با اتیدیوم بروماید دیده می شوند (تصویر ۸). با توجه به تصویر، تغییری در میزان بیان ژن کیتین سنتاز در نمونه های تحت تأثیر گریزوفولون نسبت به نمونه شاهد و نیز در مقایسه با یکدیگر مشاهده نمی شود. همچنین در مورد ژن بتا اکتین که تحت تأثیر دارو قرار نمی گیرد و به عنوان کنترل بررسی شده است، بیان ژن، بدون تغییر دیده می شود. در واقع میزان بیان ژن کیتین سنتاز، هم در نمونه شاهد و هم در نمونه های تحت تأثیر گریزوفولون با میزان بیان ژن بتا اکتین قابل مقایسه است.



تصویر ۷- RNA استخراج شده و مشاهده باندهای S rRNA ۲۵ و ۱۸ که در هر سه نمونه شاهد، رقت ۰,۰۰۶ و رقت ۰,۰۰۲ میکروگرم در میلی لیتر به این صورت دیده می شود.

حساسیت را نسبت به گریزئوفولین در مقایسه با میکونازول، کلوتریمازول و تولنفتات نشان می‌دهند (۲۸). البته مطالعات اخیر نشان داده است که داروهای جدید مثل ایتراکونازول و تربینافین در مقایسه با گریزئوفولین، اثر تیماری مشابه، ولی مدت درمانی کوتاه‌تر و طیف اثر وسیع‌تر روی درماتوفیت‌ها، کاندیداها و کپک‌های غیرپاتوژن دارند که باعث شده به این داروها توجه بیشتری شود (۲۹، ۳۰). توسعه داروها و عوامل جدید، وابسته به شناسایی اهداف جدید است که در مورد قارچ‌ها این اهداف خاص می‌توانند دیواره سلولی و اجزای آن باشند (۳۱).

در پلیت مربوط به نمونه شاهد، کلنی قارچی به خوبی رشد کرده؛ درحالی که میزان رشد قارچ در نمونه‌های تحت تأثیر دارو، کمتر است و به علاوه، کلنی‌ها نیز حالت خرد شده دارند و به ویژه این حالت خردشدگی کلنی‌ها در رقت $0.02 \mu\text{g/ml}$ بیش از رقت $0.06 \mu\text{g/ml}$ است. در مطالعه میکروسکوپی، میسلیم‌های نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های تحت تأثیر دارو کشیده‌تر بوده و قطر کمتری دارند؛ در حالی که میسلیم‌ها در نمونه‌های مجاور شده با دارو چروکیده شده‌اند و میزان چروکیده شدن میسلیم‌ها در رقت $0.02 \mu\text{g/ml}$ بیش از رقت $0.06 \mu\text{g/ml}$ است. بنابراین هرچه میزان رقت دارو بالاتر می‌رود، میزان کوتاه و چروکیده شدن میسلیم‌ها بیشتر می‌شود که چنین حالتی در بررسی متواضع و همکاران نیز مشاهده شده است (۲۷). در استخراج RNA باندهای $18S \text{ rRNA}$ و $25S \text{ rRNA}$ دیده شد که این باندها نماینده وجود و جداسازی RNA است و در روش رضایی و همکاران نیز دیده می‌شوند (۱۸). با هدف مقایسه بیان ژن در نمونه شاهد با نمونه‌های تحت تأثیر دارو و نیز هر یک از رقت‌های دارویی با یکدیگر، Multiplex-PCR انجام شد که باند مربوط به ژن کیتین سنتاز با وزن 650 bp و باند مربوط به ژن بتا کتین با وزن 350 pb در کنار سایز مارکر پس از الکتروفورز دیده می‌شوند که حاکی از عدم تفاوت بیان ژن در نمونه شاهد در مقایسه با

روش‌های درمانی جدیدتر مستلزم داشتن دانش بیشتر و به کارگیری یافته‌های نوین در مورد این قارچ است و از آنجایی که مولکول DNA واجد تمامی اطلاعاتی است که یک سلول برای حیات خود به آن‌ها احتیاج دارد، این مولکول بهترین کاندیدا برای بررسی‌های مولکولی است. لذا تکنیک PCR بر این اساس طراحی شده که می‌توان با شناخت DNA و به دنبال آن پروتئین‌ها که حاصل ترجمه اطلاعات موجود در DNA است را بررسی کرده و به عملکرد این پروتئین‌ها در سلول و نقش آن‌ها در بقا و بیماری‌زایی عوامل پاتوژن پی برد.

از آنجا که کیتین به علت ساختار نامحلول و خارج سلولی بودن، به ادامه حیات قارچ تحت شرایط متغیر محیط کمک می‌کند، شناخت بیشتر آنزیم کیتین سنتاز می‌تواند به درک بیشتری از فیزیولوژی قارچ‌ها منجر شود و هدفی مناسب برای توسعه داروهایی با اثر انتخابی باشد (۲۲، ۲۱)؛ به طوری که در *Arthroderma benhamiae* که تحت تأثیر مهارکننده‌های کیتین سنتاز (نیکومایسین Z و پلی اکسین D) کشت شده بود نشان دادند که بیان ژن کیتین سنتاز I تحریک می‌شود، در حالی که بیان ژن کیتین سنتاز II تغییری نمی‌یابد (۲۳). بررسی‌های گذشته روی کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) اثبات کردند که دو فرایند ساخت کیتین و هیدرولیز آن به صورت مجزا از هم صورت می‌گیرد (۲۴).

در زمینه درمان، مطالعات بسیار محدودی روی میزان حساسیت درماتوفیت‌ها نسبت به گریزئوفولین و بررسی میزان تاثیر آن در تریاکوفایتون روبروم و نیز روی بیان ژن‌های دیگر در مواجهه با عوامل شیمیایی نظیر گریزئوفولین انجام شده است (۲۵) که به عنوان مثال می‌توان به افزایش بیان ژن ABC transporter (۲۶) و تأثیر این دارو روی بیان ژن ATPase-Subunit G (۲۷) اشاره نمود. معمولاً استراتژی‌های درمانی در عفونت‌های ناشی از تریاکوفایتون روبروم بر پایه کاربرد تربینافین و گریزئوفولین استوار است (۱۳). به طوری که طی مطالعه‌ای ثابت شده که درماتوفیت‌ها بیشترین

این دارو روی سایر انواع کیتین سنتتاز می‌تواند به شناخت نوع تأثیرگذارتر این ژن منجر شود و نیز شناسایی داروی مؤثر بر این ژن می‌تواند اثر بخشی و کارآمدی درمان را افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری بی دریغ کارکنان آزمایشگاه مولکولی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به ویژه سرکار خانم زرمغربی سپاسگزاری می‌شود.

نمونه‌های تحت تأثیر دارو و نیز هر یک از نمونه‌های مجاور شده با دارو نسبت به یکدیگر است. هرچند در مطالعه متواضع، داروی گریزئوفلوین روی بیان ژن ATPase- Subunit G اثر داشته (۲۷). زمردیان و همکاران، کاهش بیان ژن β - توبولین را در اثر گریزئوفلوین گزارش کرده‌اند (۱۵). بررسی Cervelatti نیز افزایش بیان ژن ABC transporter را تحت تأثیر این دارو نشان داده است (۲۶). اما بررسی حاضر حاکی از آن است که داروی گریزئوفلوین روی بیان این ژن ساختمانی بر خلاف ژن‌های غیر ساختمانی، اثرات کاهشی یا افزایشی نداشته است. به نظر می‌رسد بررسی تأثیر

منابع مورد استفاده

- Bowman, S. M., Free, S. J., 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bio Essays* 28: 799-808.
- Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M., Lodge, J. K., 2005. A Chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4: 1902-1912.
- Behr, J. B., 2003. Chitin synthase as an antifungal target. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents* 2: 173-189.
- Wang, L., Ma, L., Leng, W., Liu, T., Yu, L., Yang, J., Yang, L., Zhang, W., Zhang, Q., Dong, J., Xue, Y., Zhu, Y., Xu, X., Wan, Z., Ding, G., Yu, F., Tu, K., Li, Y., Li, R., Shen, Y., Jin, Q., 2006. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* Expressed sequence tags. *BMC Genomics* 7: 2164-7.
- Munro, C. A., Gow, N. A., 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol*. 39: 41-53.
- Ruiz-Herrera, J., 2000. Cycloheximide-induced inhibition of chitin synthesis, and decay of apical vesicles and chitosomes in *Phycomyces blakesleeianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 209-214.
- Henar Valdivieso, M., Durán, A., Roncero, C., 1999. Chitin synthases in yeast and fungi. *EXS* 87: 55-69.
- Lesage, G., Shapiro, J., Specht, C. A., Sdicu, A. M., Ménard, P., Hussein, S., Yan Tong, A. H., Boone, C., Bussey, H., 2005. An interactional network of genes involved in chitin of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genetics* 6: 2156-72.
- Ichinomiya, M., Horiuchi, H., Ohta, A., 2002. Different functions of the class I and class II chitin synthase genes, chsC and chsA are revealed by repression of chsB expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 42: 51-58.
- Merzendorfer, H., 2005. Insect chitin synthases. *Biochemical Systemic and Environmental Physiology Springer-Verlag* 10: 1-15.
- Tellam, R. L., Vuocolo, T., Johnson, S. E., Jarmey, J., Pearson, R. D., 2000. Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur J Biochem* 267: 6025-43.
- Maranhao, F., Paiao, F.G., Martinez-Rossi, N. M., 2007. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microbial Pathogenesis* 43: 166-172.
- Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N. S., Ghannoum, M. A., 2003. Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 82-86.
- Kano, R., 2004. Chitin Synthase (CHS) Gene Analysis of Dermatophytes, *Jpn J Mycol* 45: 53-53.

15. Zomorodian, K., Uthman, U., Tarazooie, B., Rezaie, S., 2007. The effect of griseofulvin on the gene regulation of β -tubulin in the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. Journal of Infection and Chemotherapy 13: 373-379.
 16. Develoux, M., 2001. Griseofulvin. Ann Dermatol Venereol 128: 1317-25.
 17. Kassem, M. A. A., Esmat, S., Bendas, E. R., El-Komy, M. H. M., 2006. Efficacy of topical griseofulvin in treatment of tinea corporis. Mycoses 49: 232-235.
 18. Rezaie, S., Ban, J., Mildner, M., Poitschek, C., Brna, C., Tschachler, E., 2000. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. Gene 241: 27-33.
 19. Gupta, A. K., Zaman, M., Singh, J., 2008. Diagnosis of *Trichophyton rubrum* from Onychomycotic Nail Samples Using Polymerase Chain Reaction and Calcofluor White Microscopy. American Podiatric Medical Association 98: 224-228.
 20. Li, R. Y., Li, D. M., Yu, J., Liu, W., Ji, Z. H., Wang, D. L., 2004. Application of Molecular Biology techniques in the identification of pathogenic fungi and the diagnosis of fungal Infection. Beijing Da Xue Xue Bao 36: 536-539.
 21. Ruiz-Herrera, J., San-Blas, G., 2003. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. Curr Drug Targets Infect Disord 3: 77-91.
 22. Kraus, P.R., Eox, D. S., Cox, G. M., Heitman, J., 2006. The Cryptococcus neoformans MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calineurin function. Molecular Microbiology 48: 1377-1387.
 23. Kano, R., Okabayashi, K., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A., 2001. Expression of Ubiquitin Gene in *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* Cultured with Fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 45: 2559-2562.
 24. Selvaggini, S., Munro, C. A., Paschoud, S., Sanglard, D., Gow, N. A., 2004. Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 150: 921-928.
 25. Chadeganipour, M., Nilipour, S., Havaei, A., 2004. In vitro evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. Mycoses 47: 503-507.
 26. Cervelatti, E. P., Fachin, A. F; Martinez-Rossi, N. M., 2006. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. Medical Mycology 44:141- 147.
۲۷. متواضع، ک.، شاه محمدی، ن.، امامی، م.، رضایی، س.، ۱۳۸۵. بررسی تاثیر داروی گریزوفولوین بر روی بیان ژن ATPase- Subunit G در قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون روبروم، مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، جلد ۱، شماره ۴، ۲۴۱ تا ۲۳۷.
28. Sumana M. N., Rajagopal, V., 2002. A Study of dermatophytes and their invitro antifungal sensitivity. Indian Pathol Microbiol 45: 169-72.
 29. Mohrenschlager, M., Korting, H. C., Seide, H. P., 2002. Tinea capitis. Therapeutic options in the post-Griseofulvin era. Hautarzt 53: 788-794.
 30. Santos D. A., Hamdan, J. S., 2006. In vitro antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. Med Mycol 44: 357-62.
 31. Stevens, D., 2000. Drug interaction studies of a glucan synthase inhibitor (LY 303366) and a chitin synthase inhibitor (Nikkomycin Z) for inhibition and killing of fungal pathogens. Antimicrob Agents Chemother 44: 2547-2548.