مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۹، شماره ۲ (پیاپی ۲۶) ، زمستان ۱۳۸۶

بررسی میزان تاثیر فاکتورهای محیطی و تغذیه ای برمیزان تولید لوله زایا توسط *کاندیدادابلینسیس* درشرایط برون تنی (In vitro)

عباسعلی جعفری ندوشن* (Ph.D)

دانشگاه علوم پزشکي وخدمات داشتي درماني شهيد صدوقي يزد، دانشکده پزشکي، گروه انگل شناسي و قارچ شناسي

چکیده

سابقه و هدف: *کاندیدا دابلینسیس* از گونه‌های جدیداً شناخته شده جنس کاندیدا است. اگر چه این گونه در اوایل به عنوان مهم‌ترین عامل جدا شده از ضایعات دهانی افراد مبتلا به ایدز به شمار می‌رفت ولی اخیراً بطور مکرر از بیماران ایمنوساپرس غیر ایدزی نیز جدا شده است. توانایی کاندیدا دابلینسیس برای تولید لوله زایا در مجاورت با سرم انسان از مهم‌ترین مکانیسم‌های بیماری‌زایی این قارچ محسوب می‌شود که تحت تاثیر بعضی عوامل محیطی و تغذیه‌ای در بدن میزبان می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر بعضی عوامل محیطی مانند دما، pH و میزان غلظت گلوکز بر میزان تولید لوله زایا توسط گونه کاندیدا دابلینسیس در شرایط برون تنی بوده است.

مواد و روش‌ها: تست تولید لوله زایا (Germ tube) توسط سوش استاندارد کاندیدا دابلینسیس (CD 34) را با استفاده از سرم انسان دارای قند نرمال در حرارت، pH، و غلظت‌های مختلف در آزمایشگاه انجام و زمان شروع تولید اولین سلول‌های تولید کننده لوله زایا (به دقیقه) و همچنین میانگین درصد سلول‌های واجد لولهٔ زایا پس از دو ساعت محاسبه گردید. میانگین درصد سلول‌های واجد لوله زایا در شرایط مختلف میزان تحریک قارچ به تبدیل از حالت مخمری به رشته ای از نظر آماری (One-way ANOVA) مقایسه شدند.

یافته‌ها: تولید لوله زایا در حرارت ۴۲ درجه، pH برابر ۷ و در غلظت mg/ml ۳۰ گلوکز دارای بالاترین میزان در مقایسه با سایر شرایط محیطی و تغذیه ای بود (P=۰/۰۰۰۱). همچنین در این شرایط کم‌ترین زمان برای مشاهده اولین سلول‌های مخمری کاندیا واجد لوله زایا در شرایط برون تنی لازم بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که مشابه شرایط برون تنی در بدن میزبان هم همین شرایط باعث تحریک قارچ به تولید لوله زایا در بدن بخصوص در افراد دیابتی باعث تشدید ویرولانس (قدرت تهاجمی) قارچ شود.

واژه‌های کلیدی: کاندیدادابلینسیس، لوله زایا، برون تنی، دما، pH، گلوکز.

مقدمه

در سال‌هاي اخير گونه‌هاي کانديدا غير آلبيکنس نيز از ضايعات کانديديازيس انساني خصوصاً در افراد با سيستم ايمني ضعيف و افراد مبتلا به ايدز جدا مي‌شوند. گونه کانديدا دابلينسيس از گونه‌هاي جديداً شناخته شده است که از نظر خصوصيات ژنوتيپي و فنوتيپي (توانايي توليد لوله زايا و کلاميدوکونيدي) بسيار نزديک به کانديدا آلبيکنس مي‌باشد [۱]. اين گونه براي اولين بار از بيماران ايدزي در دوبلين ايرلند جدا شد [۲] در حالي که در حال حاضر داراي انتشار جهاني است. در سال‌هاي اوليه اين گونه غالباً از ضايعات دهاني-حلقي بيماران مبتلا به ايدز گزارش مي‌شد [۲] هر چند که اخيراً اين گونه از ضايعات کانديديازيس دهاني افراد غير ايدزي و از دستگاه تناسلي خانم‌هاي مبتلا به کانديديازيس واژن نيز مکرراً جدا و گزارش شده است [۴،۳]. هر چند که

* تلفن: ۸۲۴۱۷۵۱ – ۰۳۵۱ نابر: ۰۳۵۱– ۸۲۴۹۷۰۵ Email: jafariabbas@ssu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۴/۵

Archive of SID
www.SID.ir

اغلب نمونه‌هاي كانديدا دابلينسيس جدا شده از ضايعات بيماران حساس به آمفوتريسين و آزول‌ها بوده ولي گزارش‌هايي مبني بر مقاومت اين گونه به داروهاي رايج ضد قارچي متداول از جمله فلوكونازول در افراد ايدزي گزارش شده است [۶،۵]. در ايران هم اين گونه را از ضايعات بيماران مبتلا به كانديديازيس جدا شده است [۷].

از جنس كانديدا تنها دو گونه كانديداآلبيكنس و كانديدا دابلينسيس علاوه بر توانايي توليد مسيليوم كاذب توانايي توليد لوله زايا يا جرم تيوب نيز دارند كه در بيماري‌زايي اين قارچ‌ها مهم است [۸]. ميسيليوم كاذب مشابه بلاستوكونيدي با عمل جوانه زدن تشكيل مي‌شود هرچند كه سلول جديد متصل به سلول مادر بوده و طويل مي‌شود. برعكس جرم تيوب رشد خارج سلولي بلاستوكونيدي‌ها است كه به وسيله رشد راسي يک سلول و به دنبال آن تشكيل ديواره عرضي در پشت نوک رونده آن به وجود مي‌آيد. در حقيقت لوله زايا مقدمه و شروع تشكيل ميسليوم حقيقي مي‌باشد كه داراي ديواره‌هاي موازي مي‌باشد [۹ و۱۰ و۱۱ و ۱۲ و ۱۳]. در شرايط In vitro تغيير مورفولوژيک مخمري به ميسليال و از جمله جرم تيوب به وسيله شرايط محيطي و يا تغذيه‌اي (مانند حرارت ، pH و منبع كربن) تقويت مي‌شود هر چند كه تاكنون مكانيسم‌هاي فيزيولوژيک و مولكولار آن هنوز ناشناخته است [۱۴].

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسي تاثير بعضي عوامل محيطي مانند دما، pH و ميزان غلظت گلوكز بر ميزان توليد جرم تيوب توسط گونه كانديدادابلينسيس در شرايط برون تني (In vitro) بوده است.

مواد و روش‌ها

اين مطالعه از نوع laboratory trial بوده كه در شرايط برون تني (In vitro) بر اساس تست استاندارد توليد لوله زايا (Germ tube test) است كه براي تشخيص افتراقي كانديدا آلبيكنس از ساير گونه‌ها بكار مي‌رود [۷]. براي بررسي نقش عوامل محيطي دما pH، و همچنين نقش غلظت گلوكز بر ميزان تحريك توليد لوله زايا اين تست را در شرايط كنترل شده (غلظت‌هاي مختلف گلوكز، دما و pH متفاوت و مورد نظر) و هر شرايط در ۵ تكرار انجام گرديد. براي اين منظور از سوش استاندارد كانديدا دابلينسيس (CD 34) بر روي محيط سابورودكستروزآگار (Oxoid, UK) كشت يه و سپس از كلني‌هاي تازه آن با استفاده ازيک لوپ استريل داخل لوله‌هاي آزمايش محتوي ۰/۵ ميلي‌ليتر سرم انسان (سرم فردي با قند خون نرمال) سوسپانسيون (CFU/ml $۱۰^{۵}$* ۱) يه گرديد. جهت بررسي نقش عوامل مذكور اين سوسپانسيون درشرايط مختلف كنترل شده به مدت ۲ ساعت نگهداري و آزمايش شدند. اين شرايط شامل درجه حرارت هاي ۲۷، ۳۲، ۳۷ و۴۲ درجه سانتي‌گراد، pHهاي ۵/۵, ٦، ٦/۵, ۷ و در مجاورت با غلظت‌هاي صفر, ۱۰, ۲۰ و ۳۰ ميلي‌گرو بر ميلي ليتر و گلوكز بوده است. پس از يه سوسپانسيون مخمري ($۱۰^{۵}$×۱) با شرايط فوق درفواصل ۱۰ دقيقه و حداكثر تا ۲ ساعت يک قطره از سوسپانسيون تست را بر روي يک لام هموسيتومتر (توما) زير ميكروسكوپ قرارداده و با پوشاندن توسط يک لامل نيز در زيرميكروسكوپ با عدسي شماره ٤۰ و ۱۰ بررسي شدند. كوتاه‌ترين زماني كه رشته‌هاي ظريف مشخصه جرم تيوب (لوله زايا) در اطراف سلول‌هاي مخمري مشاهده مي‌شد ثبت و در نهايت پس از ۲ ساعت ميانگين درصد سلول‌هاي مخمري واجد لوله زايا در ۵ ميدان ديد براي هر شرايط آزمايش شمارش و ميانگين و انحراف معيار آ ا محاسبه گرديد.

براي هرشرايط موردآزمايش ۵ تكرار (از ۵ كلني مختلف) كانديدا دابلينسيس آزمايش شده و ميانگين درصد سلول‌هاي واجد لوله زايا را در شرايط مختلف باتست آماري One-way ANOVA مقايسه و مقدار P≤ ۰/۰۵ از نظر آماري معني‌دار در نظر گرفته شد.

نتايج

توليد لوله زايا در حرارت ٤۲ درجه سانتيگراد, pH برابر ۷ و در غلظت mg/ml ۳۰ گلوكز بالاترين ميزان بوده (جداول ۱ تا ۳) و همچنين در اين شرايط كوتاه‌ترين زمان (به دقيقه)

www.SID.ir

براي مشاهده اولين مخمرهاي داراي لوله زايا به ترتيب پس از ميانگين ۱۸، ٤۲ و ٦۰ دقيقه اولين سلول‌هاي واجد لوله زايا مشاهده گرديدند (جدول ٤).

جدول ۱. ميانگين و انحراف معيار درصد سلول‌هاي C. dubliniensis داراي لوله زايا در حرارت‌هاي مختلف مورد بررسي

دما(درجه سانتيگراد)	ميانگين	انحراف معيار
۲۷	۱	۰
۳۲	۸	۱/۶
۳۷	۳۳/۲	۱/۹
۴۲	۴۴/۴	۱/۸

جدول ۲. ميانگين و انحراف معيار درصد سلول‌هاي C. dubliniensis داراي لوله زايا در pH مختلف مورد بررسي

pH	ميانگين	انحراف معيار
۵/۵	صفر	صفر
۶	۱۸/۲	۲/۲
۶/۵	۲۸/۲	۲/۶
۷	۴۵/۲	۱/۹

جدول ۳. ميانگين و انحراف معيار درصد سلول‌هاي C. dubliniensis داراي لوله زايا در غلظت‌هاي مختلف گلوکز مورد بررسي

غلظت گلوکز (mg/ml)	ميانگين	انحراف معيار
صفر	۱۶	۱/۶
۱۰	۲۰	۱/۶
۲۰	۴۳	۳/۱
۳۰	۵۸/۶	۵/۵

با انجام آزمون آماري Oneway-ANOVA تفاوت بين ميانگين درصد سلول‌هاي داراي لوله زايا در دماي مختلف، pH مختلف و غلظت مختلف گلوکز مورد بررسي از نظر آماري معني‌دار بود بود (P =/۰۰۰۱).

با انجام آزمون آماري Tukey جهت مقايسه دو به دو هر کدام از شرايط مختلف مورد آزمايش، به استثناي تفاوت بين ميانگين سلول‌هاي داري لوله زايا در دو غلظت صفر و ۱۰ ميلي‌گرم گلوکز (P= ۰/۳۷۱)، در ساير موارد مقايسه دو به دو شرايط داراي تفاوت آماري معني‌دار بود (P= ۰/۰۰۱).

جدول ۴. ميانگين و انحراف معيار زمان شروع توليد لوله زايا (دقيقه) در شرايط مختلف مورد بررسي توسط کانديدا دابلينسيس

دما		
درجه	ميانگين	انحراف معيار
۲۷	۱۰۴	۱۱/۴
۳۲	۹۲	۸/۴
۳۷	۵۰	۷/۰۷
۴۲	۴۲	۴/۵
pH		
ميزان pH	ميانگين	انحراف معيار
۵/۵	۲۰	۷/۱
۶	۲۶	۵/۵
۶/۵	۳۴	۵/۵
۷	۶۰	۷/۱
غلظت گلوکز		
Mg/ml	ميانگين	انحراف معيار
صفر	۴۴	۵/۵
۱۰	۳۲	۴/۵
۲۰	۲۴	۵/۵
۳۰	۱۸	۴/۵

بحث و نتيجه‌گيري

توليد لوله زايا ازخصوصيات مورفولوژيک منحصر به فرد درگونه کانديداآلبيکنس و کانديدادابلي‌سينسيس است که در مدت زمان کوتاهي در سرم انسان مشاهده مي‌شود و به عنوان يکي از راه‌هاي ساده براي تشخيص اين دوگونه کانديدا خصوصاً کانديداآلبيکنس از ساير گونه‌هاي کانديدا بکار مي‌رود [۷]. اين پديده يعني توانايي تغيير حالت قارچ از فرم مخمري به فرم ميسليال (لوله زايا) در حقيقت نوعي مکانيسم ـاجمي قارچ در بدن ميزبان محسوب مي‌شود که در بيماري‌زايي اين دو گونه خصوصاً گونه کانديداآلبيکنس موثر

Archive of SID
www.SID.ir

مي‌باشد [۱ و۲]. به علاوه مطالعات جديد بيانگر اين است كه اين پديده (توليد لوله زايا) يكي از مكانيسم‌هاي فرار از سيستم ايمني سلولي (بيگانه خواري) توسط بعضي مخمرها از جمله دو گونه كانديدا آلبيكنس و كانديدا دابلينسيس محسوب مي‌شود زيرا به كمك اين مكانيسم مي‌توانند بيگانه خواري را مهار و باعث تخريب سلول بيگانه خوار شوند [۱۵].

نتايج مطالعه حاضر نشان داد كه تعدادي از فاكتورهاي محيطي و تغذيه‌اي مانند pH، حرارت و غلظت گلوكز مي‌توانند در شرايط آزمايشگاهي (برون تني) ميزان توليد لوله زايا يا در حقيقت ميزان قدرت تاجمي و بيماري‌زايي قارچ موثر باشد. در مطالعه حاضر تاثير فاكتور محيطي pH و درجه حرارت و يک فاكتور تغذيه‌اي يعني ميزان غلظت گلوكز به عنوان منبع كربني مورد نياز قارچ در شرايط برون‌تني آزمايش و بررسي شد. حرارت ٤٢ درجه سانتي‌گراد، pH برابر ۷ و غلظت ۳۰ mg/ml گلوكز باعث تحريک توليد لوله زايا توسط كانديدا دابلينسيس شد كه اين افزايش ميزان توليد لوله زايا در مقايسه با ساير شرايط از نظر آماري معني دار بود (P=۰/۰۰۰۱).

تحريک توليد لوله زايا در pH برابر۷ و حرارت ۳۷ درجه سانتي‌گراد مشابه با نتايج مطالعات مشابه كه برروي كانديدا آلبيكنس بوده است [۱٦،۱۷] بوده ولي تاثير غلظت گلوكز كه براي اولين بار در اين مطالعه بررسي شده است، مشابه مطالعه Casanova و همكاران است كه در مطالعه آن‌ها از 3-acetyl-D-glucose amine و Hemin به عنوان منبع كربني براي تحريک توليد لوله زايا به كار رفته بود [۱٦] در حالي كه در مطالعه حاضر از گلوكز استفاده شده است. غلظت بالاي گلوكز در تحريک توليد لوله زايا دراين مطالعه مي‌تواند نشان دهنده اهميت بيماري‌زايي بالاي اين قارچ در بيماران ديابتي باشد. در اين مطالعه غلظت صفر گلوكز در لوله آزمايش معادل غلظت خون فرد با ميزان گلوكز طبيعي (سرم فرد نرمال براي تست استفاده شده), غلظت ۱۰, ۲۰و ۳۰ ميلي‌گرم در هر ميلي‌ليتر در لوله آزمايش به ترتيب معادل ميزان غلظت سرمي گلوكز فردي با ميزان ۲۰۰, ۳۰۰و ٤۰۰ ميلي‌گرم در صد مي‌باشد. افزايش سرعت در توليد و ميزان توليد لوله زايا در غلظت‌هاي بالاي گلوكز در مطالعه حاضر مي‌تواند نشان دهنده مكانيسم بيماري‌زا شدن اين قارچ و افزايش قدرت تاجمي آن در مخاط، بافت‌ها و مايعات بدن بيماران ديابتي با ميزان قند بالا باشد. بيماري ديابتي ازجمله عوامل مستعد كننده و زمينه ساز براي بيماري‌زا شدن كانديداها از جمله گونه‌هاي كانديدا آلبيكنس و كانديدا دابلينسيس بوده كه مي‌تواند باعث بروز علايم باليني جلدي، جلدي- مخاطي و منتشره كانديديازيس در ديابتي‌ها شود [۱۵،۷]. نتايج مطالعه حاضر بر اهميت كنترل ميزان قند خون در بيماران ديابتي نشان مي‌دهد.

در مطالعات متعدد ديگر عوامل مختلفي ديگري نيز مانند Hemin [۱٦]، دارو هاي ضد قارچي [۱۷]، بعضي آمينواسيدها [۱۸] و يک فاكتور گرفته شده ازپلاكت [۱۹] در شرايط برون تني بر روي تحريک ميزان و سرعت توليد لوله زايا توسط كانديداآلبيكنس آزمايش و نشان داده شده است. در اين مطالعه براي انجام آزمايشات توليد لوله زايا در شرايط آزمايشگاهي از سرم انسان استفاده شد. Isibok و همكاران [۱٤] در مطالعه‌اي نشان دادند كه استفاده از سرم انسان براي انجام تست لوله زايا در مقايسه با سرم گاو و بز مفيدتر است. بعلاوه ميزان توليد لوله زايا در شرايط بي هوازي (۱۰% غلظت CO2) در مقايسه با شرايط هوازي بيش‌تر بوده است. Cheng و همكاران در مطالعه‌اي بر روي واكنش كانديدا آلبيكنس در مجاورت با ميزان بالاي استروژن ميزبان نشان دادند كه تيتر بالاي استروژن نيز مي‌تواند باعث تشديد در سرعت توليد لوله زايا و افزايش طول لوله زايا در اين قارچ در ايجاد واژينيت كانديدايي در خانم‌ها شود كه احتمالاً به دليل نقش اين هور مون در افزايش ميزان غلظت گليكوژن در سلول‌هاي مخاطي واژن مي‌باشد [۲۰].

تشكر و قدردانی

از زحمات فراوان برادران حسين زرينفر و علي جبالي كه در انجام pre test اين تحقيق ما را ياري نمودند، و همچنين از سركار خانم فرزانه ميرزايي كه در تيه مواد و محيط كشت اين مطالعه ما را ياري نمودند تشكر و قدرداني بعمل مي آيد.

www.SID.ir

منابع

[1] Warnock DW, Trends in the epidemiology of invasive fungal infections.Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2007; 48: 1-12. Review.

[2] Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S, and et al. Widespread Geographic Distribution of Oral Candida dubliniensis Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. J Clin Microbiolo 1997; 35: 960–964.

[3] Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly, Salkin IF, and Coleman DC, Recovery of Candida dubliniensis from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. J. Clin. Microbiol 2000; 38:1 70–174.

[4] Redding S.W, C. W. Bailey JL, Lopez-Ribot WR, Kirkpatrick AW, Fothergill MG, Rinaldi, and T. F. Patterson. Candida dubliniensis in radiation-induced oropharyngeal candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Jun ;91 (6):659-62

[5] Perea S, Lo pez-Ribot Jl, Wickes Bl, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, and et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in Candida dubliniensis isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 1695–1703.

[6] Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP, Salgado J, Alonso-Vargas R, and et al. In vitro susceptibility of Candida dubliniensis to current and new antifungal agents. Chemotherapy 2000; 46:395–401

[7] Jafari AA, Anvari MH, Ghafoorzadah M. Identification of Candida species isolated from 150 patients'specimens infected to candidiasis using Candida CHROM agar and candida ID agar. Kowsar J 2006; 11 (4): 325-330 (Persian)

[8] Calderone, RA . Candida and candidiasis. Washington: ASM Press, 2002; 395-425

[9] Marot-Leblond A, Grimaud L, Nail S, Bouterige S, Apaire-Marchais V, Sullivan DJ, and et al. New monoclonal antibody specific for Candida albicans germ tube. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 61–67.

[10] Merson-Davies LA, Hopwood V, Robert R, Marot-Leblond A, Senet JM, and Odds FC. Reaction of Candida albicans cells of different morphology index with monoclonal antibodies specific for the hyphal form. J. Med. Microbiol. 1991; 35: 321–332.

[11] Hudson DA, Sciascia QL, Sanders RJ, Norris GE, Edwards PGB, Sullivan PA, and et al. Identification of the dialyzable serum inducer of germ-tube formation in Candida albicans. Microbiol, 2004; 150: 3041–3049.

[12] Ollert MW, and Calderone RA. A monoclonal antibody that defines a surface antigen on Candida albicans hyphae cross-reacts with yeast cell protoplasts. Infect. Immun. 1990; 58: 625–631.

[13] Torosantucci A Gomez MJ, Bromuro C, Casalinuovo I, and Cassone A, Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial forms of Candida albicans. J. Med. Vet. Mycol. 1991; 29: 361–372.

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

[15] Marcos M, Jose L. Lopez-Ribot W, Kirkpatrick R, Brent JC, Bachmann SP, and et al. Replacement of Candida albicans with C. dubliniensis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis Treated with Fluconazole. J clin microbiol, 2002; 40: 3135–3139.

[16] Casanova M, Cervera AM, Gozalbo D, and Martinez JP. Hemin Induces Germ Tube Formation in Candida albican. Infect. Immun. 1997; 65: 4360-4364.

[17] Vale-Silva LA, Buchta V, and Valentova 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: 39-43.

[18] Munin E, Giroldo LM, Alves LP, and Costa MS. Study of germ tube formation by Candida albicans after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Photochem Photobiol B. 2007; 27, 88:16-20.

[19] Robert R, Senet JM, and Mahaza C. Molecular basis of the interactions between Candida albicans, fibrinogen, and platelets. J. Mycol Med (France) 1992; 2: 19-25.

[20] Cheng G, Yeater KM, and Hoyer LL. Cellular and Molecular Biology of Candida albicans Estrogen Response. Eukaryo. Cell. 2006; 5: 180–191.

Archive of SID

www.SID.ir