

بیان ژن‌های ALS2 و ALS9 کاندیدا آلبیکنس در زنان مبتلا به واژینیت کاندیدیایی با روش RT-PCR

حسین رحیمی^۱، شهلا رودبار محمدی^{۲*}، رضا کجویی^۳، مریم رودباری^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه بیولوژی مولکولی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه بقیه الله، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
Email: Sh.mohammadi@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۸/۲۶

دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۲۱

چکیده

هدف: تقریباً سه چهارم زنان در معرض واژینیت کاندیدیایی هستند. در این بین کاندیدا آلبیکنس عامل ۸۰ درصد موارد گزارش شده است. از عوامل بیماری‌زایی کاندیدا آلبیکنس می‌توان از ژن ALS نام برد که در کد کردن دسته بزرگی از گلیکوپروتئین‌ها که عامل ارتقای چسبندگی قارچ به میزبان است نقش دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان بیان ژن‌های ALS2، ALS9 در کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینیت کاندیدیایی بوده است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از زنان مبتلا به واژینیت کاندیدیایی توسط سوآپ نمونه‌گیری انجام شد. سپس روی محیط‌های کشت قارچی سابوردکستروز آگار و کروم آگار کشت داده شدند. DNA از جدایه‌های کاندیدا استخراج شد. به منظور تشخیص و تأیید قطعی کاندیدا آلبیکنس از آزمون PCR-RFLP استفاده شد و سپس واکنش RT-PCR به منظور بررسی بیان نیمه کمی ژن‌های ALS2، ALS9 با آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها انجام گرفت. **نتایج:** از میان ۵۵ جدایه بالینی کاندیدا آلبیکنس بیان ژن ALS2 در ۲۳ جدایه بالینی (۴۱/۸ درصد) و بیان ژن ALS9 در ۲۱ جدایه (۳۸/۱ درصد) مشاهده شد که در ۲۰ مورد هر دو ژن دارای بیان بود. **نتیجه‌گیری:** بیان ژن ALS2 در ۴۱/۸ درصد و ژن ALS9 در ۳۸/۱ درصد جدایه‌های بالینی می‌تواند بیانگر ایفای نقش این ژن‌ها در ارتقای چسبندگی و تشکیل بیوفیلم توسط کاندیدا در عفونت‌های واژینال می‌باشد. اما حضور مشترک هر دو ژن در ۸۶ درصد موارد مثبت گزارش شده نشان دهنده نقش مثبت این ژن‌ها در تکمیل فعالیت دیگری دارد.

کلیدواژگان: کاندیدا آلبیکنس، واژینال کاندیدیازیس، ژن‌های ALS2, 9

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات: ۳۹-۴۹

مقدمه

فاکتورهای مرتبط با عامل بیماری‌زا و عوامل مرتبط با میزبان از اهمیت خاصی برخوردار است [۱، ۲]. از جمله عوامل بیماری‌زا می‌توان به قدرت اتصال کاندیدا (*Candida*) به بافت میزبان

واژینیت کاندیدیایی (Vaginal Candidiasis) همواره یکی از معضلات پزشکی در بین زنان است. در ایجاد واژینیت کاندیدیایی، عوامل بیماری‌زایی (Virulence) متعددی از جمله

واژینیت و بیان ژن‌های 2, 9 Als

و در کد کردن ناحیه‌ای پروتئینی که دارای ۳۲۰ تا ۳۳۰ اسید آمینه می‌باشد. بعضی از پروتئین‌های ALS که در N- گلیکوزیلیشن نقش دارد، در این ناحیه قرار دارند. این ناحیه تقریباً با ۱۰۰ اسید آمینه همراه است که از نظر وجود سرین (Serine) و ترئونین (Threonine) قوی است و پیش‌بینی می‌شود ترکیبی با مقدار گلیکوزیله شدن بالا باشد. به دنبال این ناحیه دامنه مرکزی از نسخه‌های تکراری با توالی ۱۰۸ جفت‌باز است. این ناحیه تقریباً متغیر است اما هر یک در کد کردن توالی‌های سرین و ترئونین و تعداد زیادی از توالی‌های N- گلیکوزیله نقش دارد [۱۱-۱۳].

از آنجایی که اتصال به سلول‌های واژن اولین گام در ایجاد عفونت توسط گونه‌های کاندیدا است، بنابراین شناسایی ژن‌های مؤثر در اتصال و چسبندگی آن بسیار اهمیت دارد. در مطالعه حاضر نمونه‌های کاندیدا آلیکسنس از زنان مبتلا به واژینیت علامت‌دار جمع‌آوری شد و هدف بررسی بیان نیمه کمی ژن‌های ALS2 و ALS9 در بین جدایه‌های کاندیدا آلیکسنس در این جمعیت بیماران بوده است.

مواد و روش‌ها

طی یک سال از خرداد ۱۳۹۰ الی تیرماه سال ۱۳۹۱، از زنان مبتلا به واژینیت علامت‌دار مراجعه کننده به درمانگاه‌های شهر تهران توسط سوآپ مرطوب نمونه‌گیری شد و در لوله فاکون‌های حاوی ۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی منتقل شد. جدایه‌ها روی محیط سابورودکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) و کروم آگار (CHROMagar) (Merck, آلمان) کشت داده شد.

گونه‌های کاندیدا از نظر ریخت‌شناسی (Morphology) و رنگ کلونی بررسی شد. در کنار نمونه‌های جمع‌آوری شده از سویه استاندارد ATCC10231 استفاده شد. اطلاعات بیماران براساس پرسشنامه در خصوص علائم بالینی، داشتن دیابت، هورمون‌درمانی، کورتون‌درمانی، استفاده از داروهای ضد بارداری،

از طریق عواملی مانند مولکول‌های چسبنده و پروتئین‌هایی که این اتصال را تسریع می‌کند اشاره نمود [۳، ۴]. کاندیدا یکی از فلورهای قارچی طبیعی در انسان است که می‌تواند در سطوح مخاطی و پوست کلونیزه شود و در شرایط خاص میزبان از قبیل نقص سیستم ایمنی توانایی ایجاد بیماری را دارد. گونه‌های کاندیدا چهارمین عامل آلودگی‌های خونی و عامل ۵۰ درصد کاندیدمیا (Candidemia) و عامل ۸۰ درصد کاندیدیازیس اوروفارنژیال (Oropharyngeal Candidiasis) و واژینیت کاندیدیایی است. برتری کاندیدا آلیکسنس (*Candida albicans*) در ایجاد عفونت‌های منتشر شونده خونی و موکوسی نشان دهنده وجود عوامل بیماری‌زای متفاوت در مقایسه با دیگر گونه‌های کاندیدا است [۵-۷].

۷۵ درصد از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های قارچی مربوط به مخمر کاندیدا آلیکسنس است. قدرت اتصال و تشکیل فرم هایفی (Hyphae) از عوامل مهم بیماری‌زایی در مراحل ابتدایی اتصال کاندیدا آلیکسنس به بافت است. از ژن‌های مهمی که مرتبط با تشکیل هایفی است، می‌توان به ژن‌های SAP (Secreted Aspartyl Proteinase) و ALS (Agglutinin-Like Sequence) اشاره کرد که در چسبندگی و اتصال نقش دارند و در واقع خانواده ژنی ALS در بیماری‌زایی نقش کلیدی دارند. پروتئین‌های آگلوتینین خانواده‌ای است که به وسیله اعضای گروه ALS کد می‌شود [۸-۱۰].

این خانواده دارای هشت ژن است که عبارتند از: ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS5, ALS6, ALS7, ALS9 این ژن‌ها در ساخت گلیکوپروتئین‌های سطح سلول نقش دارد و برخی از آنها چسبندگی به میزبان را تقویت می‌کند. هرچند آنها ساختار سه بعدی مشابه دارند ولی تفاوت زنجیره‌ای میان پروتئین ALS قابل مشاهده و بیانگر عمل متفاوت پروتئین‌ها است. بیان متفاوت ژن‌های ALS توسط روش استاندارد نورترن بلاتینگ (Northern Blotting) در آزمایشگاه ثابت شده است. ژن‌های ALS دارای سه دامنه عمومی هستند. ناحیه ۵ دارای وزن مولکولی ۱۳۰۰ جفت‌باز بوده

استفاده از آنتی بیوتیک‌های ضد قارچی، استفاده از مکمل‌های غذایی و داشتن بیماری‌های زمینه‌ای و بارداری ثبت شد.

واکنش PCR- RFLP (PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism)

جدایه‌های کاندیدا روی محیط سابوردکستروز آگار کشت داده شدند. پس از رشد کلونی، استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم و با استفاده از گلوله شیشه‌ای و محلول لیز کننده، طی مراحل مختلفی انجام شد [۱۴]. ترکیبات بافر لیز کننده شامل ۱۰ میلی مولار Tris-HCL و ۱ میلی مولار EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) و ۱۰۰ SDS و ۱ درصد (Sodium Dodecyl Sulfate) و ۱۰۰ میلی مولار NaCl و تریتون X-۱۰۰ (Triton X-100) X-۱۰۰.

(Merck) به مقدار ۲ درصد بوده است.

پس از سانتیفریوژهای متوالی مایع رویی به آرامی دور ریخته شد تا رسوب DNA آسیبی نبیند. سپس میکروتیوب‌ها به منظور خشک شدن روی کاغذ خشک کن به مدت ۴۵ دقیقه برگردانده شد.

واکنش PCR با آغازگرهای ITS1 و ITS2

برای انجام PCR اجزای زیر به ترتیب شامل آب مقطر ۸/۵ میکرولیتر، آغازگرهای (Primers) ذکر شده در غلظت ۱۰ پیکومول به مقدار ۱/۵ میکرولیتر و نمونه DNA استخراج شده به میزان ۱ میکرولیتر و مخلوط اصلی (Master Mix) (سیناژن) به اندازه ۱۲/۵ میکرولیتر به میکروتیوب‌های استریل اضافه شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای ITS و درجه حرارت اتصال آغازگر به DNA الگو

ردیف	کد	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	توالی آغازگر
۱	ITS1	۵۶	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCG - 3'
۲	ITS4	۵۶	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

مقطر استریل به همراه ۲/۵ میکرولیتر بافر و ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۱ میکرولیتر آنزیم انجام شد. پس از آماده‌سازی ترکیب واکنش، میکروتیوب‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. مدت زمان انکوباسیون ۶۰ دقیقه بود. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محصولات واکنش هضم آنزیم، الکتروفورز شد.

آزمون RT-PCR

استخراج RNA

این مرحله نیز همانند مرحله استخراج DNA توسط روش گلوله شیشه‌ای (Glass Bead) و ترکیب سه تایی فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل از روی کلونی‌های تولید شده روی

به منظور تکثیر ناحیه ITS، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر درون دستگاه ترموسایکلر با برنامه مشخصی قرار داده شد.

واکنش هضم آنزیم

در این مطالعه از آنزیم MspI (Fermentas، انگلیس) برای جداسازی گونه‌های کاندیدا استفاده شد. از آنجایی که این آنزیم قادر به جداسازی گونه‌های آلبیکانس و دابلی نینسیس (*Candida dubliniensis*) نیست، از آنزیم BlnI که قدرت افتراق گونه‌های آلبیکانس و دابلی نینسیس را دارد [۱۵] نیز استفاده شد. ترکیب واکنش هضم آنزیم با ترکیب ۱۱/۵ میکرولیتر آب

واژینیت و بیان ژنهای 2, 9 Als

جدول ۲ مقادیر مورد استفاده برای مرحله اول سنتز cDNA

مقدار (میکرولیتر)	مواد
۸	تیمار RNA (۳ میکروگرم/ میلی لیتر)
۱	آغازگر راندوم هگزامر (Random Hexamer Primer)
۱	dNTP
۱۰	حجم نهایی

ترکیبات زیر در ادامه به میکروتیوب ها اضافه شد:

جدول ۳ مقادیر مورد استفاده برای سنتز مرحله دوم سنتز cDNA

مقدار (میکرولیتر)	مواد
۲/۵	بافر واکنش دهنده 10 X
۱	Ribonuclease inhibition(20u/ml) 10mM dNTP
۱	آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M-MuLV (۲۰۰ واحد/ میلی لیتر)
۲۰	حجم نهایی

برای غیرفعال شدن آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (M-MuLV) میکروتیوبها ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بلافاصله به ظرف یخ منتقل شدند. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد.

واکنش RT-PCR

آغازگرهای ژنهای 2,9 ALS با انجام بلاست (Blast) در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) و با استفاده از نرم افزار Gene Runner کنترل شد. آغازگرهای یاد شده با توالی الیگونوکلئوتیدی زیر همراه با میزان حجم مورد نیاز هر یک از آغازگرها برای رسیدن به غلظت ۱۰ میکرومول/ میکرولیتر در حجم ۵۰ میکرولیتر استفاده شد.

جدول ۴ توالی آغازگرهای 2, 9 ALS و درجه حرارت اتصال آغازگر به RNA الگو

ردیف	کد	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	توالی آغازگر
۱	AS9F	۵۴/۵	5'-ACA GCT AAT TCA CAA GTT TCT C-3'
۲	AS9R	۵۴/۱	5'-AGT TTG ATA TTG AGT GAC AGC-3'
۳	AS2F	۵۵/۸	5'-AGG TTC ATC GGT TGA TTT GG-3'
۴	AS2R	۵۷/۸	5'-CCC ATT GCA CCA GAT GTG TA-3'

محیط سابورودکستروز آگار انجام شد [۱۴].

حذف DNA ژنومی از RNA تام استخراج شده

از آنجایی که در نمونه‌های استخراج شده حاصل DNA نیز وجود دارد و با توجه به این‌که برای تبدیل RNA به cDNA و انجام PCR نمونه RNA می‌بایست عاری از آلودگی با DNA ژنومی باشد، قبل از سنتز cDNA تمامی نمونه‌های RNA تیمار شد.

تیمار RNA با استفاده از کیت DNase (محصول شرکت Fermentas، انگلیس) طی فرآیند دو مرحله‌ای انجام شد: ابتدا به یک میکروتیوب استریل عاری از نوکلئاز یک میکروگرم RNA اضافه شد. سپس یک میکرولیتر بافر واکنش دهنده 10X DNase و یک میکرولیتر 1 DNase عاری از RNase به میکروتیوبها اضافه شد.

در ادامه یک میکرولیتر EDTA ۲۵ میلی‌مولار به هر میکروتیوب اضافه و میکروتیوبها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

سپس غلظت نمونه‌های استخراج شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و برای سنتز cDNA از یک غلظت مشخص RNA در تمامی نمونه‌ها استفاده شد.

سنتز cDNA

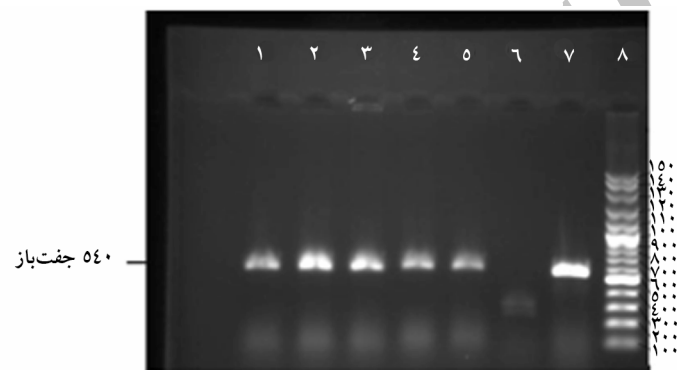
پس از تیمار نمونه‌های RNA، تبدیل RNA به cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Fermentase، انگلیس) به روش زیر انجام شد:

جدول ۵ چرخه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR با آغازگرهای ALS2, 9

تکرار	مرحله	مواد	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
۱	۱	واسرشتگی اولیه	۹۴	۳۰۰
	۲	واسرشتگی ثانویه	۹۴	۵۰
۳۴	۳	اتصال آغازگر به الگو	۵۷	۶۰
	۴	گسترش رشته جدید	۷۲	۵۰
۱	۵	بسط نهایی	۷۲	۶۰۰

در تمامی واکنش‌های PCR از ژن ACT1 به عنوان ژن کنترل داخلی و همچنین از نمونه استاندارد کاندیدا آلیکنس ATCC10231 استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد.

شکل ۱ محصول PCR معمولی؛ ۱-۵) باندهای محصول PCR جدایه‌های بالینی، ۶) کنترل منفی (۷) باندهای محصول PCR نمونه استاندارد کاندیدا آلیکنس (ATCC10231)، ۸) نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی



شکل ۱ محصول PCR معمولی؛ ۱-۵) باندهای محصول PCR جدایه‌های بالینی، ۶) کنترل منفی (۷) باندهای محصول PCR نمونه استاندارد کاندیدا آلیکنس (ATCC10231)، ۸) نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی

نتایج شناسایی جدایه‌های کاندیدا آلیکنس به روش RFLP

هضم ناحیه ITS کاندیدا آلیکنس با آنزیم *MspI*، دو باند به اندازه ۲۴۰ و ۳۰۰ جفت‌باز ایجاد کرد. به منظور شناسایی قطعی کاندیدا آلیکنس، محصولات PCR گونه‌های آلیکنس و مشکوک به دابل‌نسیس تحت هضم با آنزیم *BlnI* قرار گرفتند. محصولات هضم با آنزیم *BlnI*، دو قطعه ۳۴۰ و ۲۰۰ جفت‌بازی برای دابل‌نسیس و یک قطعه ۵۴۰ جفت‌بازی برای آلیکنس بود که با استفاده از این آنزیم دو گونه به راحتی از هم تفکیک شدند.

نتایج حاصل از کشت سویه‌ها

در این مطالعه ۵۵ جدایه بالینی کاندیدا آلیکنس با استفاده از کروم آگار جداسازی شد که کلونی با رنگ سبز روشن ایجاد کردند.

نتایج حاصل از PCR با استفاده از آغازگرهای ITS2 و ITS1

پس از الکتروفورز محصول PCR، جدایه‌های بالینی کاندیدا آلیکنس باندهای به اندازه ۵۴۰ جفت‌باز ایجاد کردند.

واژینیت و بیان ژن‌های 9, 2 Als

اسپکتوفتومتر خوانده شد و میانگین غلظت نمونه‌ها ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

نتایج حاصل از بیان نیمه کمی ژن‌های 9, 2 ALS در جدایه‌های کاندیدا آلیکنس

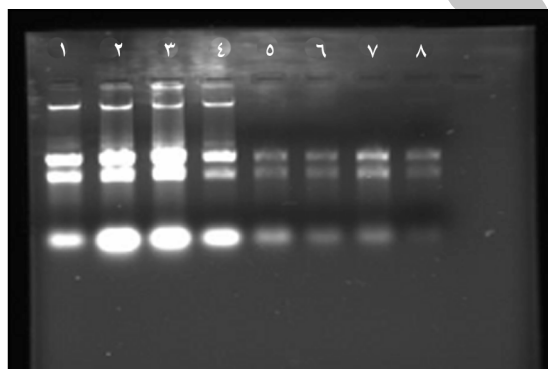
واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ALS2 و ALS9 روی ۵۵ نمونه بالینی و نمونه استاندارد انجام شد. پس از الکتروفورز محصول PCR، بیان دو ژن ALS2 و ALS9 در نمونه‌های بالینی و نمونه استاندارد محاسبه شد.

نتایج مربوط به استخراج RNA و بررسی کیفی آن توسط الکتروفورز

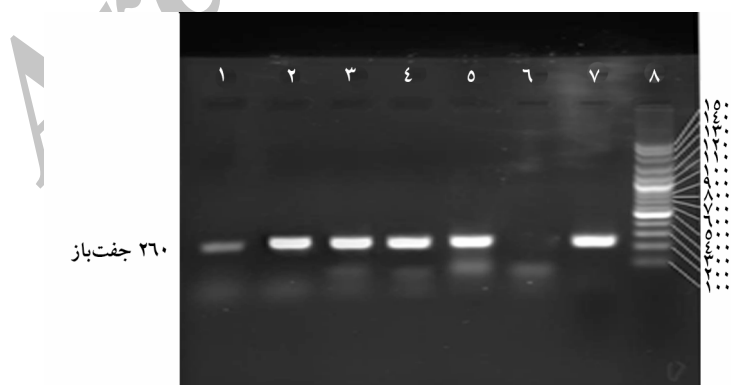
در تصویر RNA های استخراج شده روی ژل آگارز به دلیل وجود DNA تمامی نمونه‌های RNA برای از بین رفتن DNA با آنزیم Dnase تیمار شدند.

نتایج حاصل از بررسی کمی غلظت RNA توسط روش اسپکتروفوتومتری

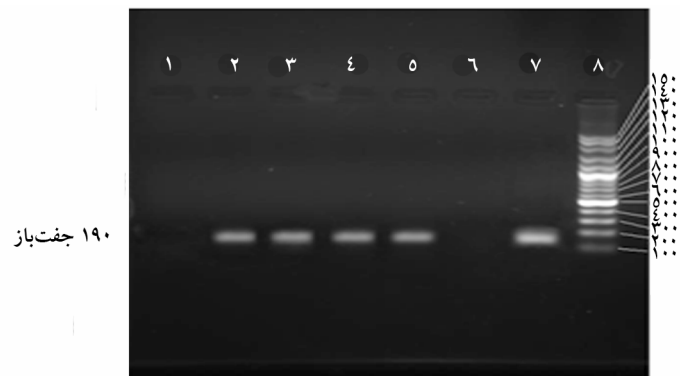
غلظت RNA تمام جدایه‌های بالینی توسط دستگاه



شکل ۲ جدایه‌های بالینی بعد از تیمار RNA؛ ردیف‌های ۱ تا ۴) بدون تیمار کردن، ردیف ۵ تا ۸) ردیف‌های تیمار شده



شکل ۳ تصویر حاصل از بیان ژن ALS2 در واکنش RT-PCR؛ ردیف‌های ۱ تا ۵) جدایه‌های بالینی، ردیف ۶) کنترل منفی، ردیف ۷) نمونه استاندارد



شکل ۴ تصویر حاصل از بیان ژن ALS9 در واکنش RT-PCR: ردیف ۱ تا ۵) نمونه بالینی، ردیف ۶) کنترل منفی، ردیف ۷) نمونه استاندارد

سنین باروری هستند، زنان مبتلا به دیابت ملیتوس (Mellitus Diabetes)، کسانی که از آنتی بیوتیک وسیع الطیف استفاده می کنند یا از درمان های که باعث تغییرات هورمونی می شود بهره می برند و اشخاص دچار نقص سیستم ایمنی بیشتر گزارش شده است [۱۸-۲۰].

کلونیزه شدن قارچ نیازمند اتصال مخمر به سلول های مخاطی واژن است. در این میان قدرت اتصال کاندیدا آلیکنس نسبت به دیگر گونه های کاندیدا به طور قابل توجهی بالاتر است. جوانه زدن سلول های مخمری کاندیدا باعث افزایش کلونیزه شدن و سهولت تهاجم به بافت می شود. اتصال میکروارگانیسم به بافت میزبان از اولین مراحل ایجاد عفونت است. در اتصال کاندیدا به بافت میزبان ژن هایی مانند HWPI (Hyphal Wall Protein 1)، SAP، ALS نقش بارزی دارند. بیان آنها موجب تشکیل پروتئین های اتصال یابنده به فیبرونکتین (Fibronectin) و لامینین (Laminin) می شود. به دنبال اتصال آن قدرت اتصال به سلول های اندوتلیال و مخاطی افزایش می یابد [۲۱].

پروتئین های ALS از عوامل شناخته شده است که در تشکیل بیوفیلم و اتصال دارای نقش مهمی است [۲۲]. ژن های ALS کاندیدا آلیکنس روی کروموزوم های مختلف وجود دارند که در این میان ژن های ALS2, 9 روی

جدول زیر میزان بیان نیمه کمی ژن های ALS2, 9 را نشان می دهد. ۲۳ جدایه بالینی (۴۱/۸ درصد) ژن ALS2، ۲۱ جدایه (۳۸/۱ درصد) ژن ALS9 را بیان نمودند و ۲۰ جدایه (۳۶/۶ درصد) به طور همزمان هر دو ژن را بیان نمودند.

جدول ۶ میزان بیان نیمه کمی ژن های ALS2,9 در جدایه های بالینی

کل نمونه	ALS2, 9	ALS9	ALS2	
۵۵	۲۰	۲۱	۲۳	تعداد
۱۰۰	۳۶/۳۶	۳۸/۱۸	۴۱/۸۱	درصد

بحث

تقریباً سه چهارم زنان در طول زندگی در معرض ابتلا به واژینال کاندیدیازیس هستند. در این بین کاندیدا آلیکنس عامل ۸۰ درصد موارد بیماری بوده است که عواملی مانند تغییر ریخت شناختی، توانایی تولید هایف، قدرت اتصال و چسبندگی و تولید آنزیم های نظیر هیدرولازهای ترشحاتی توانایی بیماری زایی این قارچ را افزایش می دهد [۱۶، ۱۷]. کاندیدا آلیکنس قارچ فرصت طلبی است که باعث ایجاد عفونت های جلدی- مخاطی و همچنین بیماری های سیستمیک می شود و از طرفی چهارمین عامل مؤثر در عفونت های بیمارستانی گزارش شده است. این بیماری در زنانی که در

واژینیت و بیان ژن‌های 9, 2, Als

بیان ژن‌های 9, 2, ALS را در ابتلا به واژینیت به خوبی بیان کرده است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از میان ۵۵ نمونه بالینی کاندیدا آلبیکنس که ۲۰ جدایه (۳۶/۳۶ درصد) هر دو ژن ALS2 و ALS9 را به طور همزمان بیان نمودند. و ۲۳ جدایه (۴۱/۸ درصد) و ۲۱ جدایه (۳۸/۱ درصد) به ترتیب ژن‌های ALS2 و ALS9 را بیان نمودند.

این میزان بیان ژن‌ها در جدایه‌های بالینی می‌تواند بیانگر ایفای نقش این ژن‌ها در ارتقای چسبندگی و تشکیل بیوفیلم در قارچ کاندیدا آلبیکنس باشد. چرا که تمامی نمونه‌هایی که بیان ژن‌ها در آن‌ها مثبت بوده در ایجاد واژینیت علامت‌دار در بیماران تحت بررسی نقش داشتند. می‌توان چنین اظهار داشت که حضور مشترک هر دو ژن در ۳۶/۳۶ درصد جدایه‌ها در ایجاد هم‌افزایی این ژن‌ها در تقویت عملکرد یکدیگر نقش دارد.

افرادی که صرفاً یکی از این دو ژن را بیان نمودند علاوه برداشتن علائم بالینی مصرف آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین (Azithromycin) را در سابقه بیماری خود داشتند. از آنجایی که پاره‌ای از مقالات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریال را عامل مناسبی برای توسعه کاندیدیازیس عنوان نموده‌اند و ممکن است در بیان ژن ALS هم نقش داشته باشد؛ این موضوع می‌تواند در بررسی آتی بررسی شود. مطابق اطلاعات موجود در پرسشنامه بیماران تحت مطالعه وجود اختلالات هورمونی به عنوان بیماری زمینه‌ای در افرادی که دچار واژینیت کاندیدیایی بوده و هر دو ژن ALS2 و ALS9 را بیان نمودند می‌تواند از اهداف پژوهشی آینده محسوب شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

کروموزوم ۶ کاندیدا آلبیکنس قرار دارند.

افزایش بیان ALS9 در ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyces cerevisiae*) سبب اتصال به لامینین می‌شود در حالی که حذف آن باعث کاهش قدرت اتصالی کاندیدا آلبیکنس نسبت به سلول‌های اندوتلیال می‌شود اما نسبت به سلول‌های مخاطی تغییری ندارد [۲۳].

مطالعه سال ۲۰۰۵ ژائو (Zhao) و همکاران نشان داد که حذف ژن‌های ALS2 و ALS4 باعث کاهش شکل‌گیری فرم جرم تیوب و کاهش قدرت اتصال کاندیدا آلبیکنس به سلول‌های اندوتلیال رگی می‌شود [۲۴].

در مطالعه گرین (Green) و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مدل حیوانی رت که از جدایه جدا شده از بیماران ایدزی برای ایجاد کاندیدیازیس دهانی استفاده شد با گذشت ۳ و ۵ روز پس از ایجاد عفونت با انجام آزمون RT-PCR حضور ژن‌های ALS1,2,3,4 بارز بود. در حالی که حضور ژن‌های ALS5, 9 در روز پنجم مشاهده شد [۲۵].

در سال ۲۰۰۸ ناس (Nas) و همکاران مطالعاتی را در زمینه بیان ژن‌های ALS1 و HWP1 و SAP4 در سوبه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های واژینیت کاندیدیایی با روش RT-PCR انجام دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن ALS در زنان در سنین باروری نسبت به دو ژن دیگر بیشتر بوده است [۲۶].

نقش دیگر برای پروتئین‌های ALS در زمینه تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس است. اجزای اتصالی در زمینه تشکیل بیوفیلم مهم است و اشاره به این دارد که پروتئین‌های ALS ممکن است در این جریان نقش داشته باشد [۲۷].

با توجه به نقش ژن‌های ALS در اتصال و چسبندگی به سلول‌های میزبان، هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن‌های ALS2 و ALS9 در جدایه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از زنان مبتلا به واژینیت بوده است؛ همچنین ارتباط

منابع

- [1] Ahmad A, Khan AU. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 144(1): 68-71.
- [2] Esmailzadeh S, Mahdavi OS, Rahmani Z. Frequency and etiology of vulvovaginal candidiasis in women referred to a gynecological center in babol, Iran. Int J Fertil Steril 2003; 3(2): 74-7.
- [3] Argimon S, Wishart JA, Leng R, Macaskill S, Mavor A, Alexandris T, Nicholls S, Knight AW, Enjalbert B, Walmsley R, Odds FC, Gow NAR, Brown AJP. Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot Cell 2007; 6(4): 682-92.
- [4] Ahmad Khan MS, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: Ahmad I, Owais M, Shahid M, Aqil F (Eds). Combating Fungal Infection: Problems and Remedy. 2010; p: 21-45.
- [5] Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis 2009; 48(12): 1695-703.
- [6] Boatto HF, Moraes MSD, Machado AP. Relationship of laboratory results with clinical signs and symptoms of patients with vulvovaginal candidiasis and the significance of the sexual partners for the maintenance of the infection. Rev Bras Ginecol Obstet 2007; 29(2): 80-4.
- [7] Bauters TG, Dhont MA, Temmerman MI, Nelis HJ. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. Am J Obstet Gynecol 2002; 187(3): 569-74.
- [8] Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Trop 2002; 81(2): 101-10.
- [9] Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect 2003; 36(4): 223-8.
- [10] Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol 1999; 48(7): 671-9.
- [11] Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(3): 400-28.
- [12] Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol 2001; 9(4): 176-80.
- [13] Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. Curr Genet 1998; 33(6): 451-9.
- [14] Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, Osumi M. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Jpn J Infect Dis 2002; 55(4): 122-5.
- [15] Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H.

- Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58(4): 235-7.
- [16] Antony G, Saralaya V, Gopalkrishna Bhat K, Shalini Shenoy M, Shivananda PG. Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26(3): 202-5.
- [17] Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14(4): 380-5.
- [18] Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL Jr, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology* 2010; 156(Pt 12): 3635-44.
- [19] Kelekci S, Kelekci H, Cetin M, Inan I, Tokucoglu S. Glucose tolerance in pregnant women with vaginal candidiasis. *Ann Saudi Med* 2004; 24(5): 350-3.
- [20] De Bernardis F, Agatensi L, Ross IK, Emerson GW, Lorenzini R, Sullivan PA, Cassone A. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 1990; 161(6): 1276-83.
- [21] Dwivedi P, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One* 2011; 6(1): e16218.
- [22] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001; 183(18): 5385-94.
- [23] Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* 2008; 46(1): 1-15.
- [24] Zhao X, Oh SH, Yeater KM, Hoyer LL. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology* 2005; 151(Pt 5): 1619-30.
- [25] Green CB, Marretta SM, Cheng G, Faddoul FF, Ehrhart EJ, Hoyer LL. RT-PCR analysis of *Candida albicans* ALS gene expression in a hyposalivatory rat model of oral candidiasis and in HIV-positive human patients. *Med Mycol* 2006; 44(2): 103-11.
- [26] Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E, Ozkan S, Kustimur S. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)* 2008; 53(2): 179-83.
- [27] Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, Filler SG, Zhang M, Waring AJ, Edwards JE Jr. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30480-9.

Expression of *Candida albicans* ALS 2 and ALS 9 Genes Isolated from Women with Vaginal Candidiasis by RT-PCR

Hossein Rahimi¹, Shahla Roudbarmohammadi^{2*}, Reza Kachouei³, Maryam Roudbari⁴

- 1- M.Sc. Student, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Molecular Biology, Faculty of Medical Sciences, Baqiatallah University, Tehran, Iran
- 4- Ph.D. Candidate, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: Sh.mohammadi@modares.ac.ir

Received: 11/Mar/2013, Accepted: 16/Nov/2013

Abstract

Objective: Approximately three-fourths of women experience an episode of vaginal candidiasis. *Candida albicans* (*C. albicans*) is the etiological agent in over 80% of cases. *C. albicans* has numerous virulence factors such as the agglutinin-like sequence (ALS) genes which code the large glycoprotein family that has a role in the adherence of *Candida*. The present study aims to evaluate expressions of the ALS 2, 9 genes in *C. albicans* which have been isolated from vaginal candidiasis.

Methods: We collected 150 wet vaginal swabs from patients diagnosed with vaginal candidiasis. Samples were cultured on sabouraud dextrose and CHROMagar for morphological analysis. Then, DNA was extracted by glass bead and lysis buffer. We performed RFLP-PCR to confirm the presence of *C. albicans*. For investigation of semi-quantitative expression of ALS2 and ALS9 genes, we performed RT-PCR by using specific primers.

Result: From 55 clinical isolates of *C. albicans*, 36.36% expressed both the ALS2 and ALS9 genes. There were 23 (41.81%) isolates that expressed only the ALS2 gene and 21 (38.1%) expressed the ALS9 gene.

Conclusion: Expressions of the ALS9 (41.8%) and ALS 2 (38.1%) genes in *Candida* isolates may indicate that these genes play a critical role in adhesion and biofilm formation of vaginal infection. However the presence of both genes in 36.36% of the isolates suggests a positive role for these genes in augmentation of their activities.

Keywords: *Candida albicans*, Vaginal candidiasis, ALS gene

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 2, Summer 2013, Pages: 39-49