Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۹٤/هفته‌ی دوم مهر ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۲۴

اثر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان ژن CaMCA1 کد کننده‌ی متاکاسپاز در گونه‌های Candida و نقش احتمالی آن در ایجاد مرگ سلولی

فرزاد کتیرائی[۱]، اسماعیل بابایی[۲]، عادل قادری[۳]، جواد اشرفی هلان[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژن‌های CaMCA1 و HSP90 در ایجاد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های قارچی نقش دارند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات ضد قارچی نانوکورکومین دندروزومی علیه گونه‌های Candida و بررسی اثر این دارو بر بیان این ژن‌ها بود.

روش‌ها: حساسیت چهار گونه‌ی Candida به کورکومین و نانوکورکومین طبق روش CLSIM27-S4 مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، بیان ژن‌های HSP90 و CAMCA1 در سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی با روش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) بررسی شد.

یافته‌ها: در نانوکورکومین حداقل غلظت مهاری برای تمامی گونه‌ها ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود به جز Candida krusei که این مقدار ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج حاصل از RT-PCR در گونه‌های Candida albicans، Candida tropicalis و Candida parapsilosis افزایش چشمگیر بیان ژن CaMCA1 را نشان داد، در حالی که در Candida krusei تغییر در بیان این ژن مشاهده نشد. بیان ژن HSP90 در دو گونه‌ی Candida albicans و Candida tropicalis کاهش نسبی یافت و در دو گونه‌ی دیگر بدون تغییر بود.

نتیجه‌گیری: نانوکورکومین در مهار رشد قارچ‌های گونه‌ی Candida در مقایسه با کورکومین اثرات بهتری نشان داد. این اثر ضد قارچی، از طریق القای آپوپتوز در قارچ می‌باشد و مشاهده‌ی بیان ژن‌های آپوپتوز این مکانیسم را تأیید می‌کند. در این مطالعه، مشاهده شد که این اثر، از طریق افزایش بیان ژن CAMCA1 می‌باشد. کاهش و عدم تغییر بیان ژن HSP90 بیانگر این بود که نانوکورکومین، از طریق این ژن اثرات ضد قارچی را اعمال نمی‌کند.

واژگان کلیدی: گونه‌های Candida، نانوکورکومین دندروزومی، اثرات ضد قارچی، آپوپتوز

ارجاع: کتیرائی فرزاد، بابایی اسماعیل، قادری عادل، اشرفی هلان جواد. **اثر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان ژن CaMCA1 کد کننده‌ی متاکاسپاز در گونه‌های Candida و نقش احتمالی آن در ایجاد مرگ سلولی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۹۴): ۹۳۹-۹۳۳

مقدمه

Candida albicans شایع‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های قارچی در انسان است و در حیوانات نیز از عوامل ایجاد عفونت‌های فرصت طلب محسوب می‌شود و قادر است عفونت‌های مختلفی را با علایم گوارشی و ریوی ایجاد نماید. افزایش مقاومت‌های دارویی و بیماران دارای نقایص سیستم ایمنی و سایر عوامل مستعد کننده، در این افزایش وقوع بیماری‌های ناشی از Candida نقش داشته است (۲-۱). از سوی دیگر، داروهای ضد قارچی از نظر تعداد محدود هستند و این تعداد محدود نیز با ایجاد مقاومت‌های دارویی و طیف اثر محدود و عوارض جانبی همراه است. در سال‌های گذشته، درمان‌های ترکیبی و گیاهان دارویی در درمان برخی عفونت‌های قارچی استفاده شده و مقالات مختلفی در این رابطه به چاپ رسیده است (٤-۳).

کورکومین، جزء اصلی و فعال ادویه‌ی زردچوبه می‌باشد که از ریزوم یا ساقه‌ی زیرزمینی گیاه Curcuma longa متعلق به خانواده‌ی زنجبیل‌ها استخراج می‌شود و همچنین، خاصیت فلورسانسی دارد (٦-۵). کورکومین به طور وسیعی به عنوان داروی ضد سرطان، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدان به کار رفته است. تأثیر این ترکیب گیاهی در بهبود آلرژی، زخم‌های پوستی، معده درد، یرقان، اسهال خونی و

۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- استادیار، گروه بیولوژی، دانشکده‌ی علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳- دامپزشک، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرزاد کتیرائی
Email: f.katiraee@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

ناراحتی های عصبی، قلبی- عروقی و مشکلات روانی مورد توجه بوده است (٦). این در حالی است که تأثیر جانبی قابل ملاحظه‌ای حتی در دزهای بالا نشان نداده است. داشتن چنین اثرات مفید و متنوعی از طرف یک ماده، چه در محیط برون تنی و چه در محیط درون تنی، بیانگر آن است که این ترکیب گیاهی، دارای اهداف مولکولی مختلفی است و می‌تواند چندین مسیر بیوشیمیایی را در سلول تحت تأثیر قرار دهد (٨-٧).

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول، نقطه‌ی مقابل تکثیر سلولی می‌باشد که باعث از بین رفتن سلول‌های اضافی، آسیب دیده و غیر طبیعی می‌شود. اختلال در این مسیر بیوشیمیایی، می‌تواند منجر به بروز توده‌های سلولی شود و در مورد سرطان نیز باعث پیش‌روی سلول‌های غیر طبیعی شود. بسیاری از روش‌های درمانی سرطان نیز بر پایه‌ی فعال‌سازی آپوپتوز می‌باشد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که کورکومین قادر به مهار فعالیت ژن‌های ضد آپوپتوزی می‌باشد و از این طریق، سرنوشت سلول را به سمت مرگ هدایت می‌کند (١٠-٩).

با وجود این اثرات و خصوصیات، کورکومین دارای حلالیت کم، نیمه‌ی عمر پایین و تخریب سریع است (١١). هر چند نانوذرات دندروزومی به طور قابل توجهی اثرات درمانی کورکومین را به واسطه‌ی افزایش حلالیت آن افزایش می‌دهند. از طرفی اعتقاد بر این است که کورکومین از طریق تغییر در خصوصیات غشا و فعالیت Adenosine triphosphatase (ATPase)، بیوسنتز ارگوسترول و القای آپوپتوز این اثرات را ایجاد می‌کند.

مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در قارچ‌ها از دو مسیر اصلی شامل مسیر میتوکندریال وابسته به متاکاسپاز و دیگری مسیر غیر وابسته به متاکاسپاز صورت می‌گیرد (١٢). بر این اساس، در مطالعه‌ی حاضر اثرات ضد قارچی نانوکورکومین دندروزومی علیه گونه‌های Candida مورد ارزیابی قرار گرفت و همچنین، اثر این دارو بر بیان ژن CaMCA1 که در ایجاد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در مسیر وابسته به متاکاسپاز در سلول‌های قارچی نقش دارد، به منظور درک بهتر نحوه‌ی اثر ضد قارچی این ترکیب بررسی گردید.

روش‌ها

چهار گونه‌ی استاندارد Candida شامل Candida albicans (ATCC10231)، Candida tropicalis (ATCC750)، Candida parapsilosis (ATCC22019) و Candida krusei (PTCC5295) مورد بررسی قرار گرفتند. حساسیت گونه‌های Candida به نانوکورکومین دندروزومی به روش Broth microdilution در میکروپلیت‌های ٩٦ خانه‌ای و در حجم ٢٠٠ میکرولیتر بر اساس روش پیشنهادی Clinical & laboratory standards institute-M27-S4 (CLSI-M27-S4) انجام گردید (١٤-١٣).

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه

بیان ژن‌های HSP90 و CaMCA1 در استرین‌های استاندارد Candida با روش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. کشت تازه از چهار گونه‌ی Candida مورد بررسی بر روی محیط Sabouraud dextrose agar (SDA) ساخت شرکت Merck تهیه گردید.

در لوله‌های استریل، مقدار ٥ سی‌سی محیط کشت Sabouraud dextrose broth حاوی کلرامفنیکل غلظت‌های انتخابی از داروی نانوکورکومین به همراه شاهد آماده شد. یک غلظت داروی نانوکورکومین برای این منظور انتخاب شده است، غلظتی از دارو که بر روی ٥٠ درصد از سلول‌های قارچی اثر ممانعتی دارد (MIC50 یا Minimal inhibitory concentration-50%) تا تأثیر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان این ژن‌ها ارزیابی گردد (با توجه به نتایج حاصل از تعیین حساسیت، غلظت ٠/٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گونه‌های Candida albicans، Candida tropicalis و Candida parapsilosis و غلظت ١ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای Candida krusei، مورد استفاده قرار گرفت).

همچنین، از ژن ACT1 به عنوان ژن شاهد داخلی در این تحقیق استفاده شد. لوله‌های حاوی غلظت‌های نانوکورکومین دندروزومی و محیط کشت با سلول‌های مخمری تلقیح شدند. غلظت مخمر اضافه شده در محیط کشت برابر با ١٠٠٠٠ سلول بود. لوله‌های تلقیح شده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٠-٢٨ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

استخراج RNA و تبدیل به cDNA: استخراج RNA از نمونه‌ها با استفاده از محلول RNX-plus دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن- ایران) انجام شد. به دلیل حساسیت کار با RNA از نظر آلودگی با RNase، جهت غیر فعال‌سازی این آنزیم، کلیه‌ی لوازم مورد استفاده با محلول ١ درصد Diethylpyrocarbonate (DEPC) تیمار گردید. به ازای هر ١٠٠-٥٠ میکرولیتر رسوب سلولی مورد نظر ١ میلی‌لیتر از محلول RNX-plus اضافه و به طور کامل یکنواخت شد. سپس، RNA توسط محلول کلروفرم جداسازی و با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد. رسوب RNA پس از شستشو توسط اتانول در ٠/١ میلی‌مول Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) نگهداری گردید. کمیت و کیفیت RNAی به دست آمده با استفاده از دستگاه‌های اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز، مورد بررسی قرار گرفت.

در مرحله‌ی بعد، میزان مساوی از نمونه‌های RNA با استفاده از آنزیم رونویسی معکوس (RevertAidô M-MLV، شرکت فرمنتاز)

www.SID.ir

Archive of SID

و پرایمر Oligo dT به complementary DNA (cDNA) تبدیل شد.

واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای مندرج در جدول ۱ به انجام رسید. در انجام PCR روی نمونه‌های cDNA، علاوه بر تکثیر cDNA مربوط به ژن مورد مطالعه، از ژن اکتین به عنوان شاهد داخلی که مداوم بیان می‌شود، استفاده گردید.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه‌ی قطعه‌ی تکثیری (bp)
Act-F	ATCAAGGTATCATGGTTGGTATGG	۱۰۰
Act-R	TGTTCAATTGGGTATCTCAAGGTC	
MCA-F	AGGGTATAACCAAGGTTACG	۲۰۰
MCA-R	CAGAAGGTCTATTGTATTGTCC	
HSP-F	CCATCTGATATCACTCAAGATG	۲۰۰-۲۱۰
HSP-R	AGTGATAAACACTCTACGGACG	

برای هر سویه‌ی استاندارد Candida مورد نظر، سه واکنش PCR با پرایمرهای Forward و Reverse هر یک از سه ژن گفته شده آماده گردید. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix (Amplicon) و ۹ میکرولیتر آب مقطر به انجام رسید. واکنش PCR طبق برنامه‌ی زیر در دستگاه ترموسایکلر (Techne, UK) صورت گرفت: در ابتدا مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمادهی شد. سپس، در ۳۵ چرخه و در هر چرخه به ترتیب در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، در دمای اتصال ۶۰-۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بر اساس نوع پرایمر ۳۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه واکنش انجام گرفت. در پایان، قطعات نیمه کامل به منظور تکمیل سنتز، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفت. پس از انجام واکنش برای به دست آوردن قطعات سه ژن مورد نظر محصول PCR بر روی ژل آگارز بررسی گردید.

عکس حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در مرحله‌ی قبل با استفاده از نرم‌افزار Gel analyser 2010a مورد بررسی قرار گرفت. این نرم‌افزار قادر است مقادیر نیمه کمی از شدت باندهای حاصل از واکنش را نشان دهد که در مقایسه با مقدار عددی حاصل از شاهد داخلی در همان نمونه آنالیز می‌گردد. نکته‌ی مهم، ایجاد شرایط یکسان برای نمونه‌های مورد بررسی به منظور کسب نتایج صحیح بود.

یافته‌ها

در جدول ۲، نتایج حاصل از آزمایش تعیین حساسیت گونه‌های Candida به کورکومین و نانوکورکومین دندروزومی به روش میکرودایلوشن براث مطابق با روش پیشنهادی CLSI-M27-S4 شرح داده شده است.

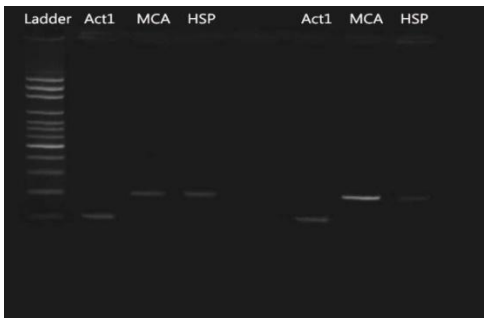
جدول ۲. نتایج حاصل از تعیین حساسیت به کورکومین و نانوکورکومین در گونه‌های Candida

گونه‌های (C.) Candida	حساسیت به کورکومین (MIC)	حساسیت به نانوکورکومین (MIC)
	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
C. Albicans	۲	۰/۵
C. Tropicalis	۱	۰/۵
C. Parapsilosis	۱	۰/۵
C. Krusei	۲	۱

MIC: Minimal inhibitory concentration

نتایج حاصل از RT-PCR ژن‌های مورد نظر قبل و بعد از تأثیر نانوکورکومین دندروزومی بر گونه‌های مختلف Candida

شکل ۱، میزان بیان ژن‌های مورد بررسی را در Candida albicans قبل و بعد از تیمار با نانوکورکومین دندروزومی نشان می‌دهد. بر اساس شکل، افزایش بیان در ژن متاکاسپاز بعد از تیمار با نانوکورکومین مشهود است. همچنین، جدول ۳ مقادیر نیمه کمی این آزمایش را نشان می‌دهد. بیان ژن HSP نیز کاهش نسبی داشته است.



شکل ۱. الگوی الکتروفورزی تکثیر ژن‌های مورد بررسی در Candida albicans قبل (ستون‌های ۴-۲ از سمت چپ) و بعد از تیمار (۸-۶ از چپ به راست). همان‌طور که در ستون ۷ نمایان است، میزان بیان ژن CaMCA1 افزایش داشته است.

در Candida tropicalis نیز افزایش بیان در ژن متاکاسپاز بعد از تیمار با نانوکورکومین در مقایسه با شاهد داخلی مشاهده شد. شکل ۲، میزان بیان ژن‌های مورد بررسی را در Candida parapsilosis قبل و بعد از تیمار با نانوکورکومین دندروزومی نشان می‌دهد. بر اساس شکل،

www.SID.ir

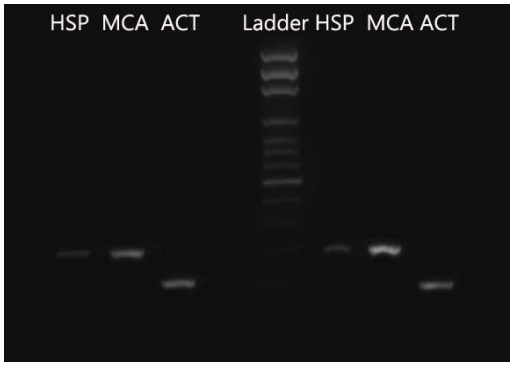
Archive of SID

جدول ۳. مقایسه‌ی نیمه کمی بیان ژن‌های متاکاسپاز و پروتئین شوک حرارتی و ژن اکتین (به عنوان ژن شاهد) در گونه‌های مختلف Candida در مواجهه با نانوکورمومین دندروزومی

گونه‌های Candida (C.)	شدت بیان ژن HSP90			شدت بیان ژن MCA			شدت بیان ژن ACT1		
	نتیجه	بعد از تیمار	قبل از تیمار	نتیجه	بعد از تیمار	قبل از تیمار	نتیجه	بعد از تیمار	قبل از تیمار
C. Albicans	کاهش ٪۱۱	۳۲	۳۶	افزایش ٪۱۰۲	۷۷	۳۸	بدون تغییر	۴۰	۴۰
C. Tropicalis	کاهش ٪۲۰	۳۲	۴۰	افزایش ٪۵۰	۴۵	۳۰	کاهش ٪۳۰	۵۵	۷۲
C. Parapsilosis	کاهش ٪۶	۳۰	۳۲	افزایش ٪۶۰	۱۲۰	۷۵	افزایش ٪۸	۸۱	۷۵
C. Krusei	کاهش ٪۲	۵۶	۵۷	کاهش ٪۵	۵۳	۵۹	کاهش ٪۹	۵۰	۵۵

مقادیر عددی شدت بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار (بر اساس میزان شدت باند) تعیین گردیده است. مقادیر عددی بیشتر، نمایانگر بیشتر بودن شدت باند به دست آمده است.

افزایش بیان در ژن متاکاسپاز بعد از تیمار با نانوکورکومین مشهود است. همچنین، جدول ۳ مقادیر کمی این آزمایش را نشان می‌دهد.



شکل ۲. الگوی الکتروفورزی تکثیر ژن‌های مورد بررسی در Candida parapsilosis قبل و بعد از تیمار (از چپ به راست)

شکل ۳، میزان شدت بیان ژن‌های مورد بررسی را در Candida krusei قبل و بعد از تیمار با نانوکورکومین دندروزومی نشان می‌دهد. بر اساس شکل، اختلاف محسوسی در بیان ژن‌های مورد بررسی بعد از تیمار دیده نمی‌شود. همچنین، مقادیر کمی این آزمایش درجدول ۳ آمده است.

شکل ۳. الگوی الکتروفورزی تکثیر ژن‌های مورد بررسی در Candida krusei قبل و بعد از تیمار (از چپ به راست)

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، خاصیت ضد قارچی نانوکورکومین علیه گونه‌های مختلف Candida مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج با کورکومین مقایسه شد. نانوکورکومین، به طور نسبی مؤثرتر از کورکومین خواص ضد Candida از خود نشان داد. هر چند، انتظار می‌رفت تبدیل کورکومین به فرم دندروزمال، اثرات این ترکیب را بیش از پیش کند، اما این تأثیر بر حداقل غلظت مهار کننده‌ی رشد قارچ اثر چشمگیری نبوده است. البته از مهم‌ترین مزیت‌های تبدیل کورکومین به نانوکورکومین، حلالیت آن در آب و افزایش طول عمر ترکیب است. تبدیل به فرم دندروزومال قابلیت‌های بیشتری از جمله تهیه‌ی آسان، پایداری (حدود چهار سال در دمای اتاق)، عدم سمیت سلولی، هزینه‌ی اندک تولید، زیست‌تخریب پذیری، خنثی بودن از لحاظ بار الکتریکی، ساختار کروی و سهولت کاربردی به دارو می‌دهد.

در بین گونه‌های استاندارد Candida از نظر حساسیت به نانوکورکومین، تفاوت قابل ملاحظه‌ای دیده نشد که این خود از ویژگی‌های مناسب این ترکیب است. در ادامه، روندهای مولکولی خاصیت ضد قارچی با بررسی میزان بیان برخی ژن‌های مسؤول آپوپتوز (HSP90 و CaMCA1) مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان ژن‌های HSP90 و CaMCA1 تحت تأثیر غلظتی از دارو قرار گرفت که این غلظت، قابلیت مهار رشد ۵۰ درصدی سلول‌های قارچی را داشته باشد. بیان ژن با نمونه‌های شاهد مورد مقایسه قرار گرفت.

در این مطالعه، از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه گونه‌های Candida albicans، Candida tropicalis و Candida parapsilosis و غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه Candida krusei (مطابق با MIC_{50}) استفاده گردید. نتایج نشان داد که بیان ژن HSP90 در Candida albicans و Candida tropicalis در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش نسبی داشت و در Candida krusei و Candida parapsilosis به طور تقریبی بدون تغییر بود. بر این اساس، احتمال می‌رود نانوکورکومین آپوپتوز را از طریق فعال‌سازی سایر ژن‌ها در قارچ القا کند. این پروتئین، در

www.SID.ir

Archive of SID

Candida اهمیت ویژه‌ای دارد و در تغییر فنوتیپی گونه‌های Candida به خصوص Candida albicans نقش اساسی دارد. البته نقش HSP90 در آپوپتوز به طور وسیعی در سلول‌های پستانداران مورد مطالعه قرار گرفته است. در رده‌ی سلولی منوبلاستوئید، بیان HSP90 باعث القای آپوپتوز می‌شود (۱۵). برخی مطالعات نیز نشان می‌دهد که HSP90 نقش حفاظتی در مقابل آپوپتوز دارد (۱۶).

در پستانداران، HSP90 از طریق تنظیم پروتئین‌های کاسپاز ایفای نقش می‌کند (۱۷). مطالعات اخیر بر روی نقش HSP90 در آپوپتوز قارچ نشان داده‌اند که این ژن، در طی فرایند آپوپتوز در قارچ نقش دارد. در یک مطالعه جهت بررسی نقش این ژن در آپوپتوز دو سویه‌ی Candida albicans که یکی از آن‌ها فاقد توانایی بیان ژن HSP90 بود، به وسیله‌ی عوامل ایجاد کننده‌ی آپوپتوز مورد درمان قرار گرفتند. در گروه فاقد توانایی بیان ژن HSP90، میزان کمتر آپوپتوز، تولید پایین گونه‌های فعال اکسیژن و میزان بالای بقا مشاهده گردید که بیان کننده‌ی نقش این ژن در شروع آپوپتوز در قارچ می‌باشد.

همچنین، این سویه‌ها فاقد توانایی بیان ژن کاسپاز CaMCA1 بودند که باعث تأخیر در آپوپتوز شد. فعال شدن کاسپازها به عنوان یکی از مهم‌ترین وقایع در طی فرایند آپوپتوز در سلول‌های پستانداران می‌باشد. پروتئین HSP90 از طریق تنظیم فعالیت کاسپازی- کلسی‌نورین، باعث ایجاد آپوپتوز در قارچ می‌شود (۱۸). به هر صورت در این بررسی، بیان ژن HSP90 تحت تأثیر قرار نگرفت. البته در غلظت‌های بالاتر چون رشد قارچ مهار می‌شود، امکان مقایسه‌ی بیان ژن با نمونه‌های شاهد وجود ندارد. از آن جایی که این پروتئین در حدت گونه‌های Candida به خصوص Candida albicans نقش دارد، شاید کاهش بیان آن در کاهش شدت بیماری‌های ناشی از Candida مؤثر باشد و البته این تنها یک احتمال است. نقش ژن CaMCA1 به عنوان کد کننده‌ی پروتئین متاکاسپاز، در القای آپوپتوز در قارچ شناخته شده است. در مطالعه‌ی اخیر، حذف این ژن در Candida albicans باعث شد تا قارچ دارای فعالیت کاسپازی و آپوپتوزی کمتر در هنگام مواجهه با آسیب اکسیداتیو باشد که نشان دهنده‌ی نقش این ژن در القای آپوپتوز در قارچ می‌باشد. بررسی بیشتر نشان داد که این ژن باعث تغییر در حساسیت قارچ به عوامل اکسیداتیو از طریق تغییر در متابولیسم انرژی می‌شود (۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر، نانوکورکومین در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش بیان ژن CaMCA1 در سه گونه‌ی Candida albicans، Candida tropicalis و Candida parapsilosis گردید که در دو گونه‌ی اول، میزان بیان ژن بیشتر بود، اما غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوکورکومین در گونه‌ی Candida krusei تأثیری در بیان این ژن نداشت. این یافته، نشان می‌دهد که یکی از مکانیسم‌های خاصیت ضد قارچی نانوکورکومین از طریق القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان این ژن در تمام گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق به جز Candida krusei باشد. البته در مورد Candida krusei نیز بررسی بیشتری لازم است تا بتوان نتیجه‌گیری درستی انجام داد. این احتمال وجود دارد که در غلظت‌های دیگری از دارو اثرات آپوپتوتیک در این گونه ایجاد شود. ترکیبات دیگری هم یافت شده است که از طریق بیان این ژن، باعث آپوپتوز در قارچ می‌شود.

در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده است که بایکالین، فعالیت کاسپاز را بالا می‌برد و آمفوتریسین B بیان CaMCA1 را در Candida افزایش می‌دهد که هر دو ژن (کاسپاز و CaMCA1) در آپوپتوز نقش دارند. آن‌ها نشان دادند که فعالیت کاسپاز در انواعی از Candida که تحت درمان با آمفوتریسین قرار گرفته‌اند، در مقایسه با گروه شاهد بیشتر است. فعالیت کاسپاز، نشان از بیان ژن CaMCA1 است. زمانی که دو داروی بایکالین و آمفوتریسین B با هم ترکیب و برای درمان استفاده می‌شوند، میزان بیان این ژن چندین برابر می‌گردد. در این تحقیق، مشخص شد که ترکیب آمفوتریسین B و بایکالین، از مسیر فعال کردن ژن CaMCA1 صورت می‌گیرد (۲).

البته این احتمال نیز وجود دارد که نانوکورکومین از طریق اثرگذاری روی دیگر ژن‌های مسؤول آپوپتوز، خواص ضد قارچی از خود نشان دهد. نتایج این مطالعه ضمن آشکارسازی مولکولی بخشی از مسیر ضد قارچی نانوکورکومین روی گونه‌های Candida albicans و غیر Candida albicans نشان داد که این ترکیب، همانند داروهای پیش‌گفته، از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و سپس بیان ژن CaMCA1، باعث ایجاد آپوپتوز می‌شود. نتایج نشان داد که بیان ژن CaMCA1 در Candida albicans بیشترین درصد افزایش را پس از تیمار با نانوکورمین داشته است و همان‌طور که اشاره شد، این ژن در Candida krusei تحت تأثیر جدی قرار نگرفته است.

از سوی دیگر، Candida parapsilosis بیشترین درصد کاهش را در بیان ژن HSP90 داشته است. شناخت دلایل این تفاوت، نیاز به بررسی بیشتر و روش‌های دقیق‌تر دارد. در مجموع، در این تحقیق اثرات ضد Candida برای نانوکورکومین دندروزومی به اثبات رسید و این اثرات به واسطه‌ی افزایش فعالیت ژن CaMCA1 با القای آپوپتوز از طریق مسیر کاسپاز- کلسی‌نورین است. این تحقیق، بخشی دیگر از اثرات ترکیب شگفت‌آور کورکومین را روشن می‌کند و نوید دارویی جدید و مناسب را علیه عفونت‌های قارچی می‌دهد. بخشی از بیماران مبتلا به عفونت‌های فرصت طلب ناشی از Candida، بیماران

www.SID.ir

Archive of SID

مبتلا به انواع سرطان‌ها و افراد تحت درمان هستند و این احتمال وجود دارد این دارو، همانند شمشیری دو لبه برای این بیماران عمل کند و علاوه بر تأثیر بر سلول‌های سرطانی، به عنوان داروی پیش‌گیری کننده یا درمانی بر ضد برخی از عفونت‌های فرصت طلب عمل کند. جهت آشکار شدن دیگر مکانیسم‌های احتمالی ضد قارچی، پیشنهاد می‌شود ژن‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تبریز و در قالب پایان‌نامه‌ی دکترای عمومی دامپزشکی به شماره‌ی ۲۱۹۱۸۶۵ به انجام رسیده است.

References

1. Katiraee F, Khosravi AR, Khalaj V, Hajiabdolbaghi M, Khaksar A, Rasoolinejad M, et al. Oropharyngeal candidiasis and oral yeast colonization in Iranian Human Immunodeficiency Virus positive patients. J Mycol Med 2010; 20(1): 8-14.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20(1): 133-63.
3. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med 2012; 125(1 Suppl): S3-13.
4. Katiraee F, Khosravi AR, Khalaj V, Hajiabdolbaghi M, Khaksar AA, Rasoulinejad M. In vitro antifungal susceptibility of oral candida species from Iranian HIV infected patients. Tehran Univ Med J 2012; 70(2): 96-103. [In Persian].
5. Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, et al. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. Int J Nanomedicine 2014; 9: 403-17.
6. Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. Curr Probl Cancer 2007; 31(4): 243-305.
7. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. Mol Pharm 2007; 4(6): 807-18.
8. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. Trends Pharmacol Sci 2009; 30(2): 85-94.
9. Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. Biochem Pharmacol 2005; 70(5): 700-13.
10. Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. Blood 2003; 101(3): 1053-62.
11. Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhaes TF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. J Antimicrob Chemother 2009; 63(2): 337-9.
12. Kumar A, Dhamgaye S, Maurya IK, Singh A, Sharma M, Prasad R. Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(1): 167-75.
13. Katiraee F, Teifoori F, Soltani M. Emergence of Azoles Resistance Candida species in Iranian AIDS defined patients with oropharyngeal candidiasis. Curr Med Mycol 2015; 1(3): 11-6.
14. Fothergill AW, Sutton DA, McCarthy DI, Wiederhold NP. Impact of new antifungal breakpoints on antifungal resistance in Candida species. J Clin Microbiol 2014; 52(3): 994-7.
15. Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, Katz DR. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. J Immunol 1996; 157(9): 4109-18.
16. Lee MW, Park SC, Chae HS, Bach JH, Lee HJ, Lee SH, et al. The protective role of HSP90 against 3-hydroxykynurenine-induced neuronal apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2001; 284(2): 261-7.
17. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. EMBO J 2000; 19(16): 4310-22.
18. Dai B, Wang Y, Li D, Xu Y, Liang R, Zhao L, et al. Hsp90 is involved in apoptosis of Candida albicans by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway. PLoS One 2012; 7(9): e45109.
19. Cao Y, Huang S, Dai B, Zhu Z, Lu H, Dong L, et al. Candida albicans cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. Fungal Genet Biol 2009; 46(2): 183-9.
20. Fu Z, Lu H, Zhu Z, Yan L, Jiang Y, Cao Y. Combination of baicalein and Amphotericin B accelerates Candida albicans apoptosis. Biol Pharm Bull 2011; 34(2): 214-8.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Isfahan Medical School Received: 24.01.2016

Vol. 34, No. 394, 2nd Week, October 2016 Accepted: 14.03.2016

Effect of Dendrosomal Nanocurcumin on CaMCA1 Gene Expression and Encoding Metacaspase in Candida Species and its Possible Role in Cell Death

Farzad Katiraee[1], Esmaeil Babaei[2], Adel Ghaderi[3], Javad Ashrafi-Helan[4]

Original Article

Abstract

Background: This study aimed to evaluate the antifungal effect of dendrosomal nanocurcumin against Candida species and the effect of this on the expression of CaMCA1 and HSP90 genes, which may induce programmed cell death in fungal cells.

Methods: Sensitivity to curcumin and nanocurcumin in four candida species were evaluated according to CLSI (M27-S4) guideline. Then, the expression of HSP90 and CAMCA1 genes of the treated cells with dendrosomal Nanocorcumin was examined using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

Findings: The minimal inhibitory concentration (MIC) level of nanocurcumin was 1 mg/ml for Candida krusei and 0.5 mg/ml for other strains. The RT-PCR results revealed the increasing of the expression of CAMCA1 gene. This expression was significant in Candida albicans, Candida tropicalis and Candida parapsilosis while no increasing was observed in Candida krusei. The expression of HSP90 gene was decreased in Candida albicans and Candida tropicalis and was without any change in other strains.

Conclusion: The results of current study showed that nanocurcumin is a more efficient antifungal agent compared with curcumin. The antifungal effect is through induction of apoptosis in yeast and increasing in gene expression confirms the mechanism of apoptosis. In this study, it was observed that this effect is due to increasing in gene expression CaMCA1. Decrease and no change in gene expression of HSP90 showed that nanocorcumin does not impose antifungal effects through this gene.

Keywords: Candida species, Dendrosomal nanocurcumin, Antifungal effects, Apoptosis

Citation: Katiraee F, Babaei E, Ghaderi A, Ashrafi-Helan J. **Effect of Dendrosomal Nanocurcumin on CaMCA1 Gene Expression and Encoding Metacaspase in Candida Species and its Possible Role in Cell Death.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(394): 933-9.

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Assistant Professor Department of Biology, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- Doctor of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4- Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Corresponding Author: Farzad Katiraee, Email: f.katiraee@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir