مقاله پژوهشی

ارزیابی بیان ژن آسپارتیک پروتئیناز واکوئلی (VAP) در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس منتشر

دکتر حجت اله شکری*، دکتر شهلا امری ساروکلایی**

دریافت: ۹۴/۹/۲۸ پذیرش: ۹۵/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: پروتئیناز واکوئلی یک آنزیم آسپارتیک در کاندیدا آلبیکنس است که توسط ژن VAP بیان می‌شود و نقش مهمی در ایجاد کاندیدیازیس سیستمیک بازی می‌کند. هدف این مطالعه ارزیابی بیان ژن VAP در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس منتشر بود.

روش کار: ارزیابی بیان ژن VAP با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز- ترانس‌کریپتاز معکوس (RT-PCR) انجام شد و نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. همچنین ٤٨ سر موش مادهٔ Balb/c (۶ هفته سن و وزن ۲۵ گرم) به صورت تجربی با سویه‌های مختلف کاندیدا آلبیکنس عفونی شدند و میزان بیان ژن VAP در مخمرهای جدا شده از خون موش‌های عفونی سنجش شد.

نتایج: میزان بیان ژن VAP در سویه‌های مالزیایی به طور معناداری بیشتر از سویه‌های ایرانی بود (P<۰/۰۵). نتایج ما افزایش بیان ژن VAP سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از خون موش‌ها در مقایسه با بیماران انسانی را نشان دادند. یک تفاوت معناداری در نسبت ژنهای VAP به 18S rRNA هم در سویه‌های بالینی و و هم سویه‌های کنترل کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مالزیایی در مقایسه با بیماران ایرانی مشاهده شد (P< ۰/۰۵). باندهای VAP و 18S rRNA پس از الکتروفورز سویه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس به دست آمده از بیماران انسانی و خون موش‌ها ظاهر شدند که به ترتیب حدود bp ۲۲۰ و ۳۰۲ بودند.

نتیجه‌نهایی: ژن VAP به عنوان مولد پروتئیناز می‌تواند به عنوان یک ژن مهم در ایجاد کاندیدیازیس منتشر ناشی از کاندیدا آلبیکنس عمل نماید.

کلید واژه ها: ژن VAP / کاندیدا آلبیکنس / کاندیدیازیس سیستمیک

مقدمه:

گونه‌های کاندیدا قارچ های فرصت طلبی هستند که به صورت همزیست در دستگاه گوارش، مخاط واژن، مجاری ادراری، پوست و زیر ناخن انگشتان دست و پا زندگی می کنند (۱). کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین ارگانیسم بیماری‌زای انسانی در بین گونه‌های کاندیدایی است که موجب عفونت‌های تناسلی، پوستی، دهانی و خونی می‌شود (۲). کاندیدیازیس منتشر در سراسر جهان در طی نیمهٔ دوم قرن بیستم پیوسته در حال افزایش بوده و این افزایش نتیجهٔ گسترش میزبان‌های دچار نقص سیستم ایمنی به علت بیماری‌های زمینه‌ای (بدخیمی‌ها، ایدز، نوزادان نارس با وزن کم) یا به علت درمان‌های سرکوب کنندهٔ سیستم ایمنی (شیمی درمانی، پرتو درمانی، پیوند اعضاء، پیشگیری و درمان رد پیوند) است (۳،۴). به علاوه، موارد زیادی از بیماری در بیمارانی دیده می‌شوند که برای مدت طولانی در بخش‌های مراقبت ویژه مثل جراحی و سرطان بستری می‌شوند (۵). این وضعیت سبب ایجاد تغییراتی در اپیدمیولوژی و نمود بالینی عفونت و نیز افزایش رو به رشد این بیماری در ۴۰ سال اخیر شده است. اطلاعات حاصل از مرکز مراقبت و کنترل عوامل بیماری‌زا نشان می‌دهد که گونه‌های کاندیدایی چهارمین عامل عفونت خونی هستند و اهمیت

* دانشیار قارچ شناسی پزشکی دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل (hshokri@ausmt.ac.ir)

** استادیار گروه علوم زیست پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه پوترا مالزی

افزایش وقوع آن ممکن است در حالات مختلف خدمات پزشکی و نواحی جغرافیایی مختلف فرق کند.

کاندیدا آلبیکنس به دلیل اهمیت پزشکی برجسته‌ای که دارد، وسیع‌تر از سایر گونه‌های کاندیدایی در سطوح بیولوژی و فیزیولوژی بررسی می‌شود. انتظار می‌رود که اصول انتخاب محیطی، سبب ایجاد تفاوت‌های ظریفی در ساختمان و رفتار مخمرها شود تا با محیط‌های مختلف سازگار شوند. آنزیم‌های زیادی در کاندیدا آلبیکنس شناخته شده‌اند که در حدت آن نقش مهمی دارند. یکی از مهمترین آنها آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی (SAP) است که موجب پروتئولیز غیراختصاصی پروتئین‌های میزبان می‌شود (۶،۷) و اغلب در دفاع برابر عفونت دخالت دارد (۸). آزمایشات همانندسازی و توالی سنجی نشان داده‌اند که فعالیت پروتئولیتیک خارج سلولی توسط کاندیدا آلبیکنس ناشی از محصولات ابر خانواده‌ای شامل حداقل ۷ ایزوآنزیم (ژن‌های SAP1 تا SAP7) است. مطالعات نشان دادند که ایجاد اختلال اختصاصی در ژن‌های آسپارتیک پروتئیناز در کاندیدا آلبیکنس سبب کاهش مرگ و میر حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به این موتانت‌ها می‌شود و این آزمایشات تاییدکنندهٔ فعالیت پروتئولیتیک کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک عامل حدت مهم است (۹). اگرچه بیشتر جمعیت‌های کاندیدا آلبیکنس همزیست تمایل دارند به صورت کلونال باشند، ولی در میزبان‌های مختلف و حتی نواحی مختلف آناتومیک بدن، تغییرات کوچکی در نوع سوش دیده می‌شوند که این مورد ناشی از سیر تکاملی کوتاه مدت در نتیجه بازآرایی‌های ژنتیکی است (۱۰). قدرت سازش‌پذیری کاندیدا آلبیکنس، توانایی هر تحت جمعیتی را برای استقرار در نواحی فیزیولوژیک بدن فراهم می کند. در واقع، برتری واضح حدت کاندیدا آلبیکنس نسبت به سایر گونه‌های کاندیدا ممکن است بیانگر توانایی برتر آن در بقای درون بدن میزبان پستاندار باشد. یک شرط اولیه برای این سازش‌پذیری مربوط به قابلیت پاسخ‌دهی ارگانیسم با سیگنال‌های مختلف محیطی است که با بیان یکسری از ژن‌های مرتبط با حدت صورت می‌گیرد (۱۱).

ژن VAP مولد آنزیم آسپارتیک پروتئیناز کاندیدا آلبیکنس است که در بیماری زایی این قارچ نقش برجسته ای دارد. مهمترین نقش این ژن مولد آنزیم شامل موارد ذیل می باشد: (i) کمک به تهاجم قارچ به واسطه آسیب به پوست و مخاط، (ii) حمله به آنتی بادی ها، گرانولوسیت ها و ماکروفاژها و (iii) تامین منابع غذایی از راه هضم پروتئین ها (۷). با توجه به اینکه میزان بیان ژن VAP مولد ایزوآنزیم‌های مختلف آسپارتیک پروتئیناز در کاندیدا آلبیکنس در شرایط مختلف محیطی و عفونت‌های مختلف متفاوت است، لذا در این مطالعه سعی شده است میزان بیان ژن آسپارتیک پروتئیناز واکوئلی (VAP) در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران انسانی ایرانی و مالزیایی و موش‌های مبتلا به کاندیدیازیس منتشر تجربی مورد مطالعه قرار گیرد.

روش کار:

کشت سویه‌های کاندیدا آلبیکنس: برای انجام این مطالعه تعداد ۸ سویهٔ بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایرانی مبتلا به کاندیدیازیس منتشر، ۸ سویهٔ بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مالزیایی مبتلا به کاندیدیازیس منتشر و ۱۶ سویهٔ کنترل کاندیدا آلبیکنس (جدا شده از افراد سالم ایرانی و مالزیایی) مورد استفاده قرار گرفتند. سویه‌های مخمری فوق از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردیدند. سلول‌های مخمری بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. برای شناسایی کاندیدا آلبیکنس، از آزمایشاتی نظیر تست جرم تیوب، کروم آگار، تست بتاگلوکوزیداز، تست اوره، محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ برای تولید کلامیدوکونیدیا و همچنین تست جذب و تخمیر قندها با استفاده از کیت تجارتی RAPID (ساخت شرکت رمل آمریکا) استفاده شدند (۱۲).

ارزیابی بیان ژن VAP کاندیدا آلبیکنس در مدل موش: تعداد ۴۸ سر موش مادهٔ Balb/c (۶ هفته با وزن ۲۵ گرم) از انستیتو رازی کرج، ایران خریداری شدند. تعداد ۳ سر موش برای هر سویهٔ مخمری در نظر گرفته شدند (۴ سویه بالینی ایرانی، ۴ سویه بالینی مالزیایی، ۴ سویه حاصل از خون موش‌های عفونی شده با سویه ایرانی و ۴ سویه حاصل از خون موش‌های عفونی شده با سویه مالزیایی). تمام آزمایشات مطابق با شرایط استاندارد و اخلاق پزشکی انجام شدند. برای تزریق به حیوان آزمایشگاهی، سلول‌های مخمری بر روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت

گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. کلونی‌های مخمری از سطح محیط کشت برداشت شدند و دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) شستشو گردیدند. سوسپانسیونی از سلول‌های مخمری به میزان ۵×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام نئوبار تنظیم شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری به ورید دمی موش‌ها تزریق گردید. حدود ۵ ساعت پس از تزریق، خون حیوانات تحت آزمایش در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد. میزان ۰/۲ میلی لیتر از نمونه خون مستقیما بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) کشت داده شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز گرم‌خانه‌گذاری شدند (۱۳). سلول‌های کاندیدایی جمع‌آوری شده از این محیط برای ارزیابی بیان ژن VAP در آزمایش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش RT-PCR : الف) استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت RNX™-Plus (ساخت شرکت سیناژن ایران) صورت گرفت. به منظور استخراج RNA از کشت تازهٔ مخمر کاندیدا آلبیکنس در فاز لگاریتمی استفاده شد. همچنین میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها عاری از DNase و RNase به کار رفتند. RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل رنگ‌آمیزی شده و با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده تصویر RNA بارگذاری شده بر روی ژل آگارز، تفاوت غلظت RNAها از شدت باندها آنها مشخص شد. بدین منظور برای یکسان کردن شرایط، جذب نوری تمام نمونه‌ها توسط دستگاه بیوفتومتر قرائت شدند و سپس با دی اتیل پیروکربنات، میزان غلظت RNA قبل از سنتز cDNA و استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکسان شد. تمام نمونه‌های حاوی RNA برای از بین رفتن DNA با آنزیم DNase تیمار شدند.

ب) واکنش RT-PCR: با اطمینان یافتن از خلوص RNA، ساخت cDNA از روی آن به وسیله کیت K1621 (ساخت شرکت فرمنتاس آمریکا) و بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت. بدین ترتیب که به ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر Random hexamer primer اضافه شد. حجم نهایی این مرحله با آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات به ۱۲ میکرولیتر رسانیده شد. میکروتیوب‌های حاوی مقادیر فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس بی‌درنگ به یخ منتقل شدند. در ادامه ۴ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی مولار dNTP، ۱ میکرولیتر ریبونوکلئاز و ۱ میکرولیتر آنزیم RevertAid transcriptase M-MuLV (۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر) به میکروتیوب اضافه شد. با قرار دادن میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ ° C و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ سانتی‌گراد، واکنش متوقف می‌گردد. cDNA حاصل تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر بودند:

- **VAP/F**: (5′-TCCACCAATCTACAATGCCA-3′)
- **VAP/R**: (5′-ATTTCAGCCAATGAGGATGG-3′)
- **18S rRNA/F**: (5′-GCCAGCGAGTATTAACCTTG-3′)
- **18S rRNA/R**: (5′-ATTTCAGCCAATGAGGATGG-3′)

واکنش RT-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ترموسایکلر (ساخت شرکت بیوراد آمریکا) انجام شد. ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، مقدار ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۱۲/۵ میکرولیتر از PCR master mix (ساخت شرکت فرمنتاس آمریکا) حاوی مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت ۰/۴ میلی مولار، کلرید منیزیم با غلظت ۴ میلی مولار و آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۰/۵ واحد در هر میکرولیتر به میکروتیوب واکنش اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط بالا در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و برنامه حرارتی برای آن اعمال شد. دمای واسرشتگی اولیه الگو ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشتگی ثانویه الگو ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر به رشته الگو ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای گسترش رشته جدید ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۳۴ سیکل از مرحله دوم تا چهارم تکرار شد. دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد (۱۴).

ج) الکتروفورز ژل آگارز: محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم اتیدیوم بروماید به ازای هر میلی لیتر ژل الکتروفورز شد. یک DNA ladder با وزن ۱ kb به عنوان مارکر در این مرحله استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژلها روی دستگاه ژل داکیومنتیشن از نظر وجود باند ژن مورد نظر بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش t-student جهت تعیین تفاوت معنادار آماری بین گروه‌های مختلف با سطح معنادار کمتر از ۰/۰۵ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج:

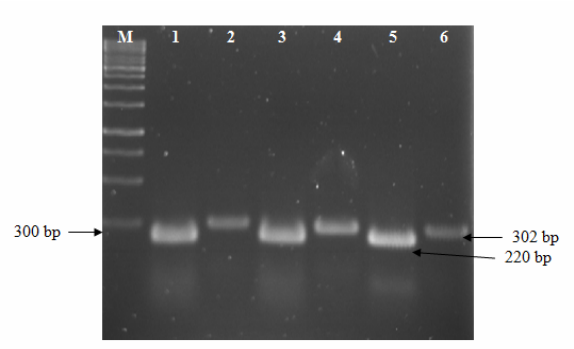
در این مطالعه، سطح بیان ژن VAP در سویه‌های بالینی و کنترل کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مالزیایی بیشتر از ایرانی بود (P<۰/۰۵). به‌علاوه، میزان بیان این ژن در نمونه‌های بالینی به طور معناداری بیشتر از نمونه‌های کنترل بود (P< ۰/۰۵). یافته‌های ما افزایش بیان ژن VAP کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های موشی در مقایسه با نمونه‌های انسانی را نشان دادند. در مقابل، هیچ تفاوت معناداری در بیان این ژن بین سویه‌های ایرانی و مالزیایی جدا شده از خون موش‌ها مشاهده نگردید.

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که میانگین نسبت ژن VAP به 18S rRNA هم در سویه‌های بالینی و و هم سویه‌های کنترل کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مالزیایی یک تفاوت معناداری را نسبت به نمونه‌های ایرانی دارد، اما این تفاوت در سویه‌های به دست آمده از خون موش‌ها مشاهده نگردید (جدول ۱).

جدول ۱: نسبت ژن VAP به ژن 18S rRNA در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایرانی و مالزیایی و همچنین موش‌های عفونی شده با سویه‌های ایرانی و مالزیایی (میانگین ± انحراف معیار)

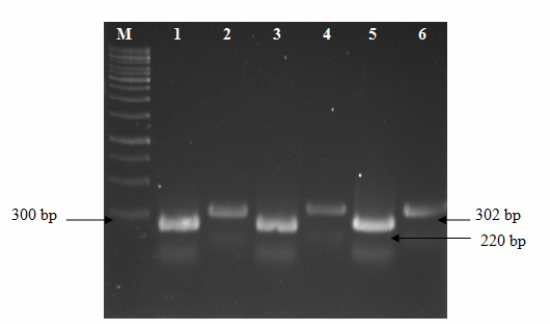
	تمام نمونه‌ها (بالینی و کنترل)	بالینی	کنترل
بیمار ایرانی	۰/۳۱ ± ۰/۲۲	۰/۴۵ ± ۰/۲۴	۰/۱۵ ± ۰/۰۶
بیمار مالزیایی	۰/۵۵ ± ۰/۲۵	۰/۷۳ ± ۰/۱۹	۰/۳۸ ± ۰/۱۷
موش عفونی شده با سویه ایرانی	۰/۵۸ ± ۰/۱۹	۰/۶۳ ± ۰/۲۲	۰/۵۳ ± ۰/۱۷
موش عفونی شده با سویه مالزیایی	۰/۷۴ ± ۰/۲۹	۰/۸۴ ± ۰/۳۵	۰/۶۵ ± ۰/۲۳

نتایج بیان ژن VAP و 18S rRNA سویه‌های بالینی به ترتیب در اشکال ۱ و ۲ نشان داده شدند. همانطور که مشاهده می‌گردد، باندهای VAP و 18S rRNA پس از الکتروفورز سویه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس به دست آمده از بیماران انسانی و خون موش‌ها بر روی ژل آگارز ظاهر شدند. مکان اختصاصی باندهای ژن VAP و 18S rRNA به ترتیب bp ۲۲۰ و ۳۰۲ مشخص گردیدند.



شکل ۱: ژل الکتروفورز ژن‌های VAP و 18S rRNA مربوط به سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس منتشر

- (M: DNA مارکر kb ۱)
- شماره‌های ۱، ۳ و ۵ مربوط به ژن VAP از نمونه‌های بالینی انسانی
- - شماره‌های ۲، ۴ و ۶ مربوط به ژن 18S rRNA از نمونه‌های بالینی انسانی



شکل ۲. ژل الکتروفورز ژن‌های VAP و 18S rRNA مربوط به سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از خون موش‌های عفونی

- (M: DNA مارکر kb ۱)
- شماره‌های ۱، ۳ و ۵ مربوط به ژن VAP از نمونه‌های بالینی موش
- - شماره‌های ۲، ۴ و ۶ مربوط به ژن 18S rRNA از نمونه‌های بالینی موش

بحث:

آنزیم آسپارتیک پروتئیناز واکوئلی توسط ژن VAP بیان می‌شود و این آنزیم یکی از عوامل مهم ایجاد کاندیدیازیس منتشر ناشی از کاندیدا آلبیکنس است (۱۲). در این مطالعه، بیان ژن VAP با استفاده از روش RT-PCR در سویه‌های بالینی و کنترل کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایرانی و مالزیایی و خون موش‌های عفونی ارزیابی شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن VAP در سویه‌های بالینی و کنترل کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مالزیایی بیشتر از ایرانی بود. به‌علاوه، بیان ژن VAP در نمونه‌های بالینی به طور معناداری بیشتر از نمونه‌های کنترل بود (P< ۰/۰۵). عوامل محیطی مختلف نظیر شرایط جغرافیایی، منشا جدایه های کاندیدا

آلبیکنس جدا شده، شدت بیماری و نوع عوامل مستعد کننده کاندیدیازیس منتشر در فرد بیمار می توانند از مهمترین فاکتورهای موثر در تفاوت بیان ژن بین دو ملیت مختلف باشند. در مجموع، اطلاعات کمی راجع به آسپارتیک پروتئیناز واکوئلی با منشاء کاندیدا آلبیکنس فرصت طلب وجود دارد. اگرچه یک ژن CAP-RA کد کنندهٔ آسپارتیک پروتئیناز توسط لوت و همکاران (۱۳) و ژن مشابه آن یعنی VAP توسط کانن و همکاران (۱۴) بررسی شده‌اند. بعید به نظر می‌رسد که VAP در کاندیدا آلبیکنس، آسپارتیک پروتئیناز ترشحی را ترشح نماید (۱۵)، بلکه در واقع یک آسپارتیک پروتئیناز واکوئلی را کد می‌نماید. از آنجا که توالی اسید آمینه VAP یک شباهت بالایی با پروتئیناز A نشان می‌دهد (۱۶،۱۷)، لذا VAP می‌تواند مثل یک پروتئیناز A در کاندیدا آلبیکنس عمل نماید. تمام میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌های بیماری‌زا، ژن‌های ضروری برای رشد اپتیمم و تطابق با تغییرات محیطی را بیان می‌کنند. بیان تفریقی این ژن‌ها وابسته به شرایط محیطی مانند مواد مغذی در دسترس، pH، منبع اکسیژن یا مواجهه با مکانیسم‌های اختصاصی دفاع میزبان مثل پپتیدهای ضدمیکروبی یا لکوسیت‌ها است (۱۹،۱۸). انجالبرت و همکاران (۲۰) ثابت کردند که هر نوع استرس محیطی شامل استرس‌های حرارتی، اسموتیک و اکسیداتیو موجب تحریک بیش از ۱۰۰ ژن اختصاصی در کاندیدا آلبیکنس می‌شود. تعدادی از این ژن‌های القا کنندهٔ رونوشت‌برداری مسئول تولید آنزیم‌های مختلفی بوده که در حفاظت و حدت سلول نقش مهمی دارند.

در مطالعه حاضر اگرچه میزان بیان ژن VAP کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های موشی بیشتر از نمونه‌های انسانی بودند، ولی تفاوت معناداری در بیان این ژن بین سویه‌های ایرانی و مالزیایی جدا شده از خون موش‌ها مشاهده نگردید. فرادین و همکاران (۱۸) نشان دادند که زمانیکه یک عفونت متعاقب تلقیح میکروارگانیسم در حیوانی ایجاد می‌شود، یک افزایشی در بیان ژن‌های دخیل در سنتز پروتئین‌ها مشاهده می‌گردد. آنها بیان نمودند که که افزایش سنتز پروتئین به خاطر تطابق سلول‌ها با شرایط محیطی جدید است. دسترسی به منابع انرژی و غذایی، دو عامل مهم سنتز پروتئین و رشد سلول در خون هستند. با توجه به اینکه کاندیدا آلبیکنس یک ارگانیسم هوازی است، به محض ورود به خون، تحت شرایط نیمه هوازی یا میکروآئروفیلیک خون، دچار بیان ژن متاثر از استرس اکسیداتیو می‌گردد. مشاهده شده است که ۴ نوع ژن در نتیجهٔ ورود کاندیدا آلبیکنس به خون تظاهر می‌یابند که در بیوسنتز پروتئین‌های آنزیمی، پاسخ استرس، تولید هایف و متابولیسم کربوهیدرات نقش دارند (۲۱).

امری ساروکلایی و همکاران (۲۲) در مطالعه‌ای ثابت نمودند که سویه‌های بالینی و کنترل کاندیدا آلبیکنس، یک افزایشی در میزان پروتئیناز A و فعالیت آنزیمی به محض ورود به محیط جدید یعنی خون نشان می‌دهند. میزان این آنزیم در تمام نمونه‌ها بعد از تزریق به موش‌ها افزایش یافت. این آزمایش تجربی نشان داد که سلول‌های کاندیدا جهت بقاء با شرایط محیطی جدید سازش می‌یابند. همچنین مشخص گردید که آنزیم پروتئیناز داخل سلولی جهت سازش‌پذیری با محیط‌های جدید ضروری است، زیرا کاهش در این آنزیم و نارسایی سایر آنزیم‌ها می‌تواند منجر به مرگ سلول گردد (۲۳). هنگامیکه مخمرهای کاندیدا آلبیکنس تحت شرایط متفاوت تغذیه‌ای و اکسیژنی در خون قرار می‌گیرند، میزان آنزیم پروتئیناز افزایش می‌یابد. این مسئله اهمیت آنزیم پروتئیناز در بقای کاندیدا آلبیکنس را نشان داده و بر میزان بیان ژن VAP در موقعیت‌های مختلف محیطی اشاره می‌نماید (۲۴).

نتیجه نهایی :

در مجموع، سویه‌های بالینی و کنترل کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایرانی و مالزیایی با موقعیت‌های جغرافیایی متفاوت، برخی تغییرات در سطوح بیان ژن VAP را نشان دادند. به علاوه، بیان تفریقی ژن VAP بین سویه‌های بالینی و کنترل بیماران ایرانی و مالزیایی و همچنین بین سویه های جدا شده از خون موش‌های عفونی و بیماران انسانی مشاهده گردید.

سپاسگزاری :

نویسنده مسئول از پرسنل آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نهایت تشکر و سپاسگزاری را می‌نماید. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

1. Ryan K, Ray CE. Sherris medical microbiology. 4th ed. New York: McGraw Hill, 2004.
2. Odds FC. Disseminated candidosis (candida septicemia). Candida and Candidosis. 2nd ed. London : Bailliere Tindall , 1988:206-30.
3. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. In: Sobel JD (ed); Fungal infections of the genitourinary tract. 1st ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003:496-9.
4. Odds FC. Candida species and virulence. Am Soc Microbiol News 1994;60:313-8.
5. Bergman OJ. Alterations in oral microflora and pathogenesis of acute oral infections during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. Scand J Infect Dis 1991;23: 355-66.
6. Schaller M, Korting HC, Schafer W, Bastert J, Chen W, Hube B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. Mol Microbiol 1999;34:169-80.
7. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P. Role of aspartic proteases in disseminated Candida albicans infection in mice. Infect Immun 1997;65:551-6.
8. Ashman RB. Protective and pathologic immune responses against Candida albicans infection. Front Biosci 2008;13:3334-51.
9. Cheng S, Nguyen MH, Zhang Z, Jia H, Handfield M, Clancy CJ. Evaluation of the roles of four Candida albicans genes in virulence by using gene disruption strains that express URA3 from the native locus. Infect Immun 2003; 71: 6101-3.
10. Khosravi AR. Immunology of fungal infections. 1st ed. Tehran : Tehran University Press, 2008.
11. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2003;67:400-28.
12. Niimi M, Niimi K, Cannon RD. Temperature-related expression of the vacuolar aspartic proteinase (APR1) gene and β-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene during Candida albicans morphogenesis. FEMS Microbiol Lett 1997;148:247-54.
13. Lott TJ, Page LS, Boiron P, Benson J, Reiss E. Nucleotide sequence of the Candida albicans aspartyl proteinase gene. Nucl Acids Res 1989;17:1779.
14. Cannon RD, Jenkinson HF, Shepherd MG. Cloning and expression of Candida albicans ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in C. albicans and in Saccharomyces cerevisiae. Mol Gen Genet. 1992;235:453-7.
15. Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in Candida species. Mol Microbiol. 1994;13:357-68.
16. Woolford CA, Daniels LB, Park FJ, Jones EW, Van Arsdell JN, Innis MA. The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulatio of Saccharomyces cerevisiae vacuolar hydrolyses. Mol Cell Biol. 1986;6:2500-10.
17. Vilanova M, Teixeira L, Caramalho I, Torrado E, Marques A, et al. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. Immunol 2004;111:334-2.
18. Fradin C, Kretschmar M, Nichterlein T, Gaillardin C, D'Enfert C, Hube B. Stage-specific gene expression of Candida albicans in human blood. Mol Microbiol. 2003;47:1523-43.
19. Inan G, Zhang Q, Li P, Wang Z, Cao Z, Zhang H, et al. A halophyte and cryophyte arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. Plant Physiol 2004;135:1-20.
20. Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in Candida albicans: absence of a general stress response. Mol Biol Cell 2003;14:1460-7.
21. Heitman J, Filler SG, Jr JED, Mitchell AP. Molecular principles of fungal pathogenesis. Washington DC: ASM Press, 2006.
22. Amri Saroukolaei S, Pei Pei C, Shokri H, Asadi F. Purification and comparison of intracellular proteinase A in Candida spp. isolates from Malaysian and Iranian patients and infected mice. J Mycol Méd 2012;22:149-59.
23. Noble SM, Johnson AD. Genetics of Candida albicans, a diploid human fungal pathogen. Ann Rev Gen 2007; 41: 193-211.
24. dEnfert C, Hube B. Candida: comparative and functional genomics. Caister: Academic Press, 2007.

Original Article

Evaluation of Vacuolar Aspartic Proteinase (VAP) Gene Expression in Candida albicans Strains Isolated from Systemic Candidiasis Patients

H. Shokri, Ph.D.*; Sh. Amri Saroukolaei, Ph.D.**

Received: 19.12.2015 Accepted: 10.5.2016

Abstract

Introduction & Objective: Vacuolar proteinase is an aspartic enzyme in Candida albicans (C. albicans) that is expressed by VAP gene and plays an important role in the development of systemic candidiasis. The aim of this study was to evaluate VAP gene expression in C. albicans strains isolated from patients with systemic candidiasis.

Materials & Methods: The evaluation of VAP gene expression was performed using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method and samples were electrophoresed in 1.5% agarose gels. In addition, a total of 48 female Balb/c mice (six-weeks old and weight of 25 g) were experimentally infected by various C. albicans strains and the level of VAP gene expression was assessed in yeasts obtained from the blood of infected mice.

Results: The level of VAP gene expression in non-Iranian strains was significantly higher than those of Iranian strains ($P<0.05$). Our results showed that VAP gene expression of C. albicans strains isolated from mice blood increased compared to human patients. A significant difference in the ratio of VAP to 18S rRNA genes was observed in both clinical and control strains of C. albicans isolated from non-Iranian patients compared to Iranian patients ($P<0.05$). The VAP and 18S rRNA bands were appeared after electrophoresis of the clinical strains of C. albicans obtained from human patients and mice blood that were about 220 and 302 bp, respectively.

Conclusion: VAP gene as producer proteinase can act as an important gene in the development of systemic candidiasis caused by C. albicans.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2016; 23 (2):103-109)

Keywords: : Candida Albicans / Systemic Candidiasis / VAP Gene

---

* Associate Professor of Medical Mycology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran. (hshokri@ausmt.ac.ir)
** Assistant Professor, Department of Biomedical Sciences, School of Medicine & Health Sciences.
University of Putra Malaysia, Selangor, Malaysia