

مطالعه و شناسایی جهش در ژن *ERG11* کاندیدا/آلبیکنس مقاوم به دارو و ارتباط آن با

ناباروری زنان ایرانی

الهام سیاسی*^۱، محدثه عبدی برزگر^۱، فرناز سهرابوند^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲. گروه مامایی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: کاندیدا/آلبیکنس مهم ترین دلیل ولوواژینال کاندیدیازیس است و مقاومت به آزولها با مکانیسم هایی هم چون تغییر در ژن *ERG11* می تواند در این پاتوژن رخ دهد. هدف از این مطالعه بررسی جهش در ژن *ERG11* کاندیدا/آلبیکنس مقاوم به دارو در بیماران مبتلا به واژینیت کاندیدیایی و ارتباط آن با ناباروری در زنان ایرانی بود.

مواد و روش ها: با نمونه گیری واژینال از تعداد ۱۰۰ بیمار گونه های کاندیدا/آلبیکنس با استفاده از روش کشت بر روی محیط کروم آگار جداسازی شدند. حساسیت دارویی بر اساس روش استاندارد انتشار دیسک تعیین شد. سپس ژنوم نمونه های مقاوم استخراج شد و با انجام PCR و تعیین توالی جهش در ژن *ERG11* مشخص شد. جهت بررسی تغییر خصوصیت های اسپرم و ارتباط با ناباروری، نمونه اسپرم نرمال با کاندیدا/آلبیکنس حساس و مقاوم در غلظت و زمان های مختلف مجاورت داده شد.

یافته ها: از ۱۰۰ نمونه بیمار، ۴۰ نمونه کاندیدا/آلبیکنس جداسازی شد که ۲ مورد مقاوم به فلوکونازول و کتوکونازول بودند. در این ۲ مورد جهش ژن *ERG11* از نوع تبدیلی و افزایشی بود. در غلظت های ۱۰۰۰۰۰ CFU/ml و ۱۰۰۰۰۰، مدت زمان ۴ ساعت و با ۳ بار تکرار، در میزان چسبندگی و تحرک اسپرم ها کاهش معنی داری مشاهده شد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد مقاومت به دارو می تواند با جهش در ژن *ERG11* در کاندیدا/آلبیکنس افزایش یابد و این عفونت های واژینیت کاندیدیایی می تواند با ایجاد ناباروری در زنان ارتباط داشته باشد.

واژه های کلیدی: کاندیدا/آلبیکنس، ژن *ERG11*، ناباروری.

مقدمه

دلایل ناباروری در زنان می توان به موارد زیر اشاره نمود، اختلال های هورمونی، هایپرلاکتینمی، تأثیر فاکتورهای محیطی، تغییرهایی در وزن، سن، سبک زندگی و عفونت های (۵،۷،۸،۱۱،۱۳،۱۸). همچنین بیش تر میکرو ارگانیسم ها از جمله باکتری ها، انگل ها، مخمرها و ویروس ها در ناباروری زنان نقش دارند. ۳۵٪ از زنانی که دارای مشکل های ناباروری هستند از اختلال های تخمدانی و تغییرهای التهابی مجرای تخمدانی القا شده توسط عفونت ها رنج می برند. علاوه بر این مشخص شده است که التهاب، لکوسیتوز سیمن و سیتوکین های القا شده توسط عفونت ها از عوامل بسیار مهم در ناباروری مردان هستند. از عفونت هایی که تاکنون در رابطه با ناباروری شناخته شده اند

ناباروری، بارور نشدن یک زوج، پس از یکسال تماس جنسی منظم بدون استفاده از روش های پیشگیری از بارداری است. از

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۲

می توان به عفونت های کلامیدیا تراکوماتیس، گاردنلا واژینالیس، اشریشیاکلی و سایتومگال ویروس اشاره کرد (۶). همچنین عفونت های قارچی از دیگر علل مؤثر در ناباروری است. از بین تمامی قارچ ها تنها ۶۰۰ گونه برای انسان بیماری زا هستند که برخی از آن ها باعث ایجاد عفونت های سیستمیک و تهدیدکننده حیات هستند که از آن جمله می توان به آسپرژیلوس فومیگاتیس، کریپتوکوکوس نئوفورمنس، هیستوپلاسما کپسولاتوم و کاندیدا آلبیکانس اشاره کرد (۲۲). کاندیدا آلبیکانس تاکنون از خاک، حیوانات، محیط های بیمارستانی و منابع غذایی جدا شده است. کاندیدا آلبیکانس عامل ۵۰٪ از تمامی موارد کاندیدایازیس مهاجم است. از جمله جایگاه هایی که محل کلونیزاسیون کاندیدا هستند عبارتند از کاندیدایازیس درون شکمی^۱ (IAC)، کاندیدایازیس کبدی-طحالی^۲ (HSC)، کاندیدایازیس نوزادی^۳ (NC) و کاندیدایازیس ادراری-تناسلی^۴ (GUC)، که مهم ترین نوع آن کاندیدایازیس ولوواژینال است (۲۵). کاندیدا آلبیکانس عمده ترین دلیل ایجاد واژینیت و همچنین بیش تر موارد ولوواژینال است (۲۸). عفونت کاندیدا آلبیکانس با تعداد محدودی از داروهای ضد قارچ درمان می شود که این داروها عبارتند از پلی-ان-ها، آزول ها و ایکینوکاندین-ها. هر یک از این عوامل دارای اهداف سلولی ویژه ای هستند. ۴۰ تا ۶۰٪ از بیمارانی که به کاندیدایازیس مهاجم مبتلا هستند، زنده نمی ماندند، بنابراین درمان های ضدقارچی مورد استفاده با شرایط مطلوب فاصله زیادی دارند. چندین عامل که در افزایش مرگ و میر مؤثر است، عبارتند از پیچیدگی وضعیت بیماران، وجود چندین بیماری میکروبی در یک بیمار و نیز عدم تطبیق پذیری درمان ها (۱۶). از دیگر عوامل می توان به فقدان پاسخ دارویی اشاره کرد که ارتباطی با فاکتورهای بالینی مانند فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک (PK/PD) دارو ندارد، بلکه ناشی از مقاومت دارویی در کاندیدا آلبیکانس است (۱۴). بر اساس مطالعه های انجام شده انواع مکانیسم های مقاومت دارویی را می توان به سه دسته تقسیم کرد که عبارتند از: کاهش اثر غلظت دارو درون سلول، تغییرهای دارو - هدف، مهار متابولیکی. مکانیسم های متعددی برای مقاومت کاندیدا آلبیکانس در برابر ترکیب های ضدقارچ آزولی پیشنهاد شده است که عبارتند از ۱. تغییر آنزیم هدف،

که به وسیله ژن *ERG11* کد می شود. در کاندیدا آلبیکانس آنزیم هدف آزول ها، ERG11p-demethylase است چراکه یک آنزیم کلیدی در مسیر سنتز ارگوسترول است. آزول ها باعث مهار تشکیل دیواره قارچ ها می شوند. جهش در *ERG11* باعث کاهش تمایل آنزیم هدف به آزول ها می شود. ۲. افزایش بیان *ERG11* نیز به مقاومت در برابر عوامل ضدقارچ منجر می شود. مطالعه های قبلی نشان داده اند که جهش در برخی از فاکتورهای فعال کننده ترجمه مانند *upc2p* می تواند *ERG11* را تنظیم کنند. ۳. مقاومت می تواند به دلیل کاهش تجمع دارو نیز باشد که به دنبال افزایش فعالیت دو پمپ خارج کننده دارو باشد که به وسیله ژن های *CDR1, CDR2* و *MDR1* کد می شوند و ۴. تولید بیوفیلیم توسط این قارچ نیز می تواند منجر به مقاومت شود (۲۶). تاکنون مطالعه های مختلفی در رابطه با ارتباط عفونت های باکتریایی و ویروسی با ناباروری انجام شده است. ارتباط بین عفونت با کاندیدا آلبیکانس و ناباروری در مردان به اثبات رسیده است که یکی از مهم ترین مکانیسم های آن، کاهش حرکت اسپرم است. با توجه به این که کاندیدا آلبیکانس عمده ترین دلیل ایجاد واژینیت و همچنین بیش تر موارد ولوواژینیت گزارش شده است، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط جهش در ژن *ERG11* کاندیدا آلبیکانس مقاوم به دارو و ارتباط آن با ناباروری در زنان ایرانی بود.

مواد و روش ها

نمونه گیری

این مطالعه پژوهشی، بر روی زنان غیر باردار و در محدوده باروری مبتلا به واژینیت کاندیدیایی با علائم قرمزی و سوزش، خارش ترشحات سفید رنگ (پنیری) و رقیق آبی انجام گرفت. جامعه مورد مطالعه را ۱۰۰ خانم مراجعه کننده به مطب متخصص زنان و زایمان در شهر تهران تشکیل می دادند. با استفاده از ۳ سوآپ استریل از ترشحات واژینال هر کدام از افراد، نمونه برداری شد. سپس سوآپ ها در سرم فیزیولوژیک استریل قرار داده شدند و در توسط آیس بگ به آزمایشگاه منتقل گردید.

کشت روی محیط کروم آگار

محیط کشت کروم آگار محیط انتخابی و افتراقی برای جداسازی و شناسایی گونه های مهم کلینیکی کاندیدا (کاندیدا کروزه ای، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا آلبیکانس) است (محیط کشت تهیه شده از شرکت پرونادیسا کشور اسپانیا). نمونه های سوآپ موجود

¹ intra-abdominal candidiasis

² Hepatosplenic candidiasis

³ Neonatal Candidiasis

⁴ Genitourinary Candidiasis

برای تکثیر ژن *ERG11* از ژنوم باکتری *کاندیدا آلبیکنس*، توالی پرایمر چپ (F) و توالی پرایمر راست (R) شامل (۲۳):

F- *ERG11*- GTTGAAACTGTCATTGATGG
R- *ERG11*- TCAGAACACTGAATCGAAAG

استفاده شد. مواد مورد استفاده در واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ µl شامل: پرایمر چپ (F) و پرایمر راست (R) هر کدام به مقدار ۱ µl، Taq DNA Polymerase (Master Mix) به مقدار ۱۲/۵ µl، DNA نمونه به مقدار ۲ µl، آب دوبار تقطیر شده به مقدار ۸/۵ µl، بود. از برنامه دستگاه ترمو سایکلر که شامل: دمای واشرست اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، دمای واشرست ۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۲/۶ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، دمای طولی سازی ۷۲ درجه سانتی-گراد ۸۰ ثانیه و دمای اتصال نهایی ۷۲ درجه سانتی-گراد ۵ دقیقه بود و با ۴۰ چرخه تکرار انجام گرفت، استفاده شد.

الکتروفورز و مشاهده باند حاصل از PCR

پس از اتمام واکنش های PCR، محصول واکنش، الکتروفورز گردید. برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. سپس با رنگ آمیزی به وسیله اتیدیوم برامید باندهای حاصل از محصول PCR برای ژن مورد نظر مشاهده شد. سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (PTCC 89-70) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در تمامی مراحل آزمایشها از این سویه استاندارد به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. همچنین ویال حاوی آب مقطر به جای ژنوم قارچ، به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز جهش های موجود در نمونه های مثبت

بعد از تکثیر ژن مورد نظر با پرایمرهای اختصاصی، برای بررسی نقاط جهش تعیین نمونه ها تعیین توالی شدند. جهش های ایجاد شده با مقایسه توالی نمونه ها با توالی ژن اصلی موجود در بانک NCBI مشخص شد.

بررسی تأثیر نمونه های *کاندیدا آلبیکنس* بر خصوصیت های

اسپرم

در این آزمایش یک نمونه *کاندیدا آلبیکنس* حساس و یک نمونه مقاوم انتخاب شد و با تعداد صفر، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰ CFU/ml به مدت ۱ تا ۴ ساعت در مجاورت مایع سمن نرمال قرار داده شد و توسط میکروسکوپ نوری دوربین دار و نرم افزار

در سرم فیزیولوژی بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کشت داده شدند، کشت تلقیح شده، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شده و بعد از گذشت ۴۸ ساعت کلنی های ظاهر شده از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ پیگمان تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند. براساس دستورالعمل محیط کشت، رنگ سبز مربوط به *کاندیدا آلبیکنس* و رنگ بنفش مربوط به *کاندیدا کروزه ای* و رنگ آبی مربوط به *کاندیدا تروپیکالیس* بود.

تعیین حساسیت دارویی *کاندیدا* به روش انتشار دیسک (دیسک دیفیوژن)

برای این منظور از محیط مولر هینتون آگار (تهیه شده از شرکت پرونادیسا کشور اسپانیا)، لوله حاوی نیم مک فارلند، لوله های حاوی یک سی سی سرم فیزیولوژی استریل، دیسک های آنتی-بیوتیکی (فلوکونازول و کتوکونازول)، سوش قارچی خالص در محیط کشت مناسب، استفاده شد. برای تلقیح سوسپانسیون قارچی به محیط کشت، پس از تهیه سوسپانسیون برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند، یک سوآپ استریل را آغشته به سوسپانسیون نموده در سطح پلیت محیط مولر هینتون آگار ۳ بار به طور کامل با زاویه ۶۰ درجه و به طور یکنواخت در سطح پلیت تلقیح شد. در مرحله بعد دیسک های آنتی بیوتیکی توسط پنس ظریفی که از قبل در الکل قرار گرفته و بعد با شعله استریل و سرد شده بود، در سطح پلیت به فاصله ۲ سانتی متر از کناره پلیت و از یکدیگر قرار داده شدند. پلیت ها در حالت معکوس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری گردید و با توجه به جدول استاندارد دیسک ها، نتایج تست آنتی بیوگرام به صورت مقاوم (Resistant)، نیمه حساس (Intermediate) و حساس (Susceptible) تهیه گردید.

استخراج ژنوم از *کاندیدا آلبیکنس*

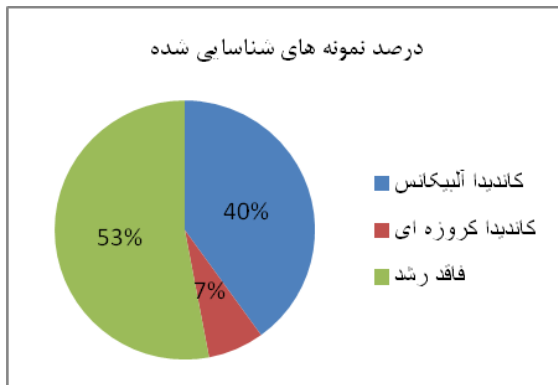
جداسازی ژنوم از نمونه های *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از کیت استخراج DNA (تهیه شده از شرکت فاورژن کشور تایوان) انجام شد.

آنالیز ژنوم تخلیص شده با استفاده از الکتروفورز

ژنوم تخلیص شده با ژل الکتروفورز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی گردید.

انجام واکنش PCR

کاندیدا/ کروزه ای بودند و ۵۳ مورد نیز در این محیط رشد نکردند (نمودار ۲).



نمودار ۲- نمودار شناسایی گونه های کاندیدا در نمونه های اخذ شده از بیماران

میزان مقاومت گونه های کاندیدا به فلوکونازول و کتوکونازول

از بین ۴۰ نمونه مبتلا به کاندیدا/ آلبیکانس تنها ۲ مورد نسبت به فلوکونازول و کتوکونازول مقاوم بودند. تفسیر نتایج براساس قطر هاله عدم رشد صورت گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی گونه های مقاوم کاندیدا/ آلبیکانس با انجام تست آنتی- بیوگرام

آنتی بیوتیک	تعداد نمونه های مقاوم (درصد فراوانی)	تعداد حساس (درصد فراوانی)	تعداد نمونه های مورد مطالعه (درصد فراوانی)
فلوکونازول	۲ (۵٪)	۳۸ (۹۵٪)	۴۰ (۱۰۰٪)
کتوکونازول	۲ (۵٪)	۳۸ (۹۵٪)	۴۰ (۱۰۰٪)

نتایج استخراج ژنوم

بعد از الکتروفورز ژنوم تخلیص شده و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل با دستگاه ژل داگ مشاهده گردید و باند ژنوم تخلیص شده مشخص شد.

نتایج تکثیر ژن ERG11 با PCR

پس از تکثیر ژن ERG11 محصول PCR روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برامید با دستگاه

اسپرم آنالایزر CASA از نظر فاکتورهای زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. (آزمون به تعداد ۳ بار تکرار شد).

- ۱- Motility %: درصد اسپرم های متحرک
- ۲- Motile Sperm Concentration: درصد اسپرم های دارای حرکت پیشرونده
- ۳- Agglutination: چسبندگی اسپرم های به هم (سر به دم، سر به سر، دم به دم)

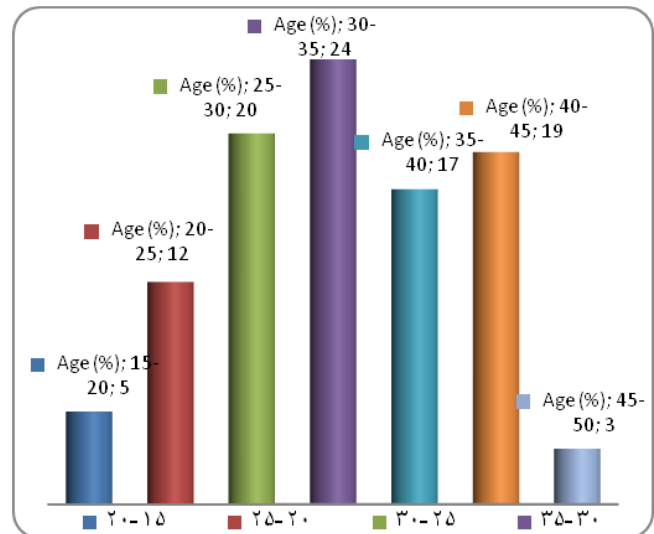
تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ و آزمون T-test استفاده شد و نتایج با (P < 0.05) معنی دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

بررسی جمعیت مورد مطالعه از نظر سنی

در این مطالعه بیشترین افراد در گروه سنی ۳۵-۳۰ سال و کمترین تعداد نیز در گروه سنی ۴۰-۴۵ سال قرار داشتند. نمودار سنی افراد مورد بررسی در نمودار ۱ آورده شده است.



نمودار ۱- نمودار سنی افراد مورد مطالعه

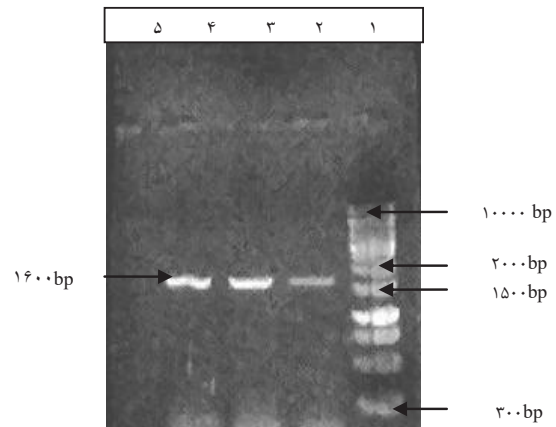
شناسایی گونه های کاندیدایی

با استفاده از محیط کشت کروم آگار نمونه های جدا شده از بیماران مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه ۱۰۰ جدایه از زنان مراجعه کننده به مطب متخصصین زنان و زایمان بررسی شدند. که از این بین ۴۰ مورد کاندیدا/ آلبیکانس، ۷ مورد

ژل داک باندهای ۱۶۰۰ bp مربوط به تکثیر ژن مورد مطالعه مشاهده شد.

جدول ۴- جهش‌ها در ژن *ERG11* در ۲ نمونه مقاوم کاندیدا آلبیکنس

Transversion	Deletion	Insertion	Conversion	سویه
		C→815-816 A→825-826 A→1044-1045	T→G 152 G→C 822 A→C 848 T→A 849 C→T 851 A→C 852 C→T 913 T→C 958 A→C 1130 A→T 1473	I
		TTT→390-39 A→875-6 G→954-955 A→1032-33 A→1038-39 A→1044-45	A→T 384 G→t 385 A→T 852 T→A 984 A→T 987 A→G 1218	II



شکل ۱- تکثیر ژن *ERG11* در نمونه‌های کلینیکی، چاهک شماره ۱. مارکر مولکولی ۱ Kb، چاهک شماره ۲ و ۳ تکثیر ژن در نمونه‌های بیمار. چاهک شماره ۴ کنترل مثبت. چاهک شماره ۵ کنترل منفی.

تعیین توالی و یافتن جهش‌ها در ژن *ERG11*

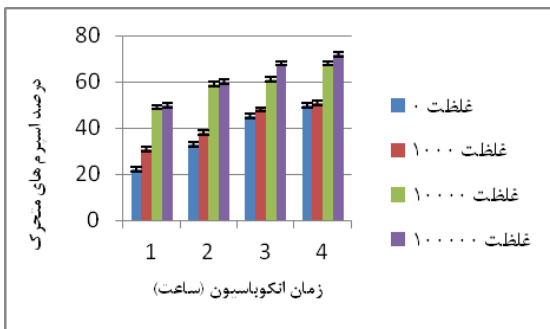
بعد از تکثیر ژن مورد نظر با پرایمرهای اختصاصی، نمونه‌ها برای توالی‌یابی و بررسی نقاط جهش به شرکت فرایزوه فرستاده شدند. سپس جهش‌های مشخص شده در توالی‌های مورد نظر با توالی ژن اصلی موجود در NCBI مقایسه شدند. جهش‌های ایجاد شده از نوع اضافه شدن (Insertion) و تبدیل (Conversion) بازهای نوکلئوتیدی بودند. نتایج نشان داد که در یکی از سویه‌ها بیش‌تر جهش‌ها از نوع تبدیل (Conversion) و درصد کم‌تری از نوع اضافه شدن (Insertion) بازهای نوکلئوتیدی است ولی در سویه دیگر کمابیش جهش تبدیل برابر با اضافه شدن است که در جدول شماره (۴) آورده شده است.

بررسی تأثیر نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس بر خصوصیت‌های فیزیولوژیک اسپرم

- درصد اسپرم‌های متحرک

نتایج نشان داد که تأثیر کاندیدا آلبیکنس مقاوم و حساس تفاوت بارز در تعداد کل اسپرم‌های متحرک دارد و در غلظت‌های ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ CFU/ml و مدت زمان ۴ ساعت مجاورت میزان اسپرم‌های متحرک در مقایسه با گروه کنترل منفی از کاهش معنی‌داری برخوردار بود ($P < 0.05$) (نمودار ۴).

*در سویه اول (I) ← ۱۰ موتاسیون از نوع تبدیل (Conversion) و ۳ موتاسیون از نوع اضافه شدن (Insertion) بود و در سویه دوم (II) ← ۶ موتاسیون از نوع تبدیل (Conversion) و ۳ موتاسیون از نوع اضافه شدن (Insertion) است.



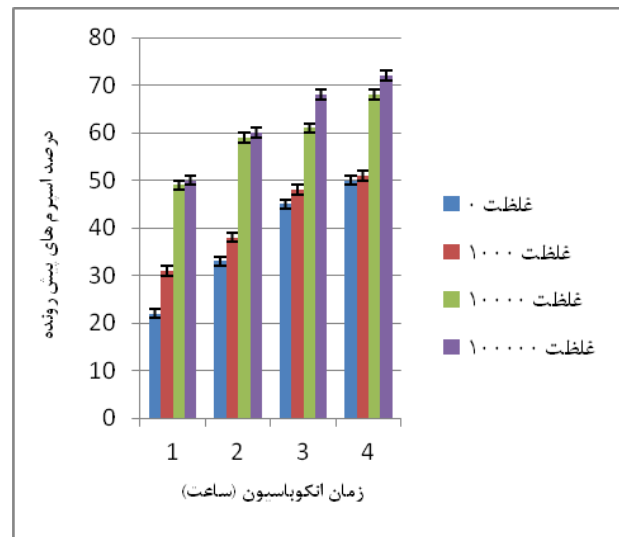
نمودار ۴- درصد اسپرم‌های متحرک ($P < 0.05$) معنی‌دار

- درصد اسپرم‌های پیش‌رونده

نتایج نشان داد که تأثیر کاندیدا آلبیکنس مقاوم و حساس تفاوت مشخصی در اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده داشت و در غلظت‌های ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ CFU/ml و مدت زمان ۴ ساعت مجاورت میزان اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده در مقایسه با گروه کنترل منفی از کاهش معنی‌داری برخوردار بود ($P < 0.05$) و با کاهش کل اسپرم‌های متحرک هم‌خوانی داشت (نمودار ۵).

دهانی یا واژینال و عفونت‌های سیستمیک تهدید کننده حیات (۱۹). علیرغم مطالعه‌های متعدد هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست که چطور *کاندیدا آلبیکنس* از یک وضعیت بی‌ضرر به یک پاتوژن مهاجم تبدیل می‌شود. توانایی تبدیل از وضعیت رشد مخمری به رشد *pseudohyphal* یا *hyphal* برای *کاندیدا آلبیکنس* از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۰). چندین شرایط محیطی از جمله دمای بالای ۳۷ درجه سانتی-گراد، PH برابر با ۷ یا بیشتر، سطوح CO₂ بالای ۵٪ یا وجود سرم این تبدیل را تسریع می‌کند (۱۵). این بیماری در زنانی که در سنین باروری هستند، زنان مبتلا به دیابت ملیتوس، کسانی که از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف استفاده می‌کنند یا از درمان‌هایی که باعث تغییرهای هورمونی می‌شود بهره می‌برند و اشخاص دچار نقص ایمنی بیش‌تر گزارش شده است. فلوکونازول یکی از داروهای اصلی ضدقارچی درمان عفونت‌های کاندیدیایی است. با این وجود درمان طولانی مدت و مصرف بی‌رویه داروهای خانواده آزول باعث ایجاد جدایه‌های مقاوم به یک یا چند داروی آزولی شده است. ایجاد جدایه‌های مقاوم یکی از معضلات اصلی در درمان *کاندیدا آلبیکنس* است. بنابراین شناسایی علت مقاومت به داروهای آزولی در جدایه‌های کلینیکی *کاندیدا آلبیکنس*، امکان ارائه راه‌کارهای درمانی مناسب‌تر در آینده را فراهم می‌سازد (۱). در این مطالعه ارتباط جهش در ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به دارو و ارتباط آن با ناباروری در زنان ایرانی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که از بین ۴۰ نمونه مبتلا به *کاندیدا آلبیکنس* تنها ۲ مورد نسبت به فلوکونازول و کتوکونازول مقاوم بودند. بررسی مولکولی در این ۲ مورد نشان داد که جهش از نوع تبدیل و اضافه شدن در ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به دارو وجود دارد و بین *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم و حساس تفاوت معنی‌دار در تأثیر بر خصوصیت‌های فیزیولوژیک اسپرم مشاهده شد ($P<0/05$).

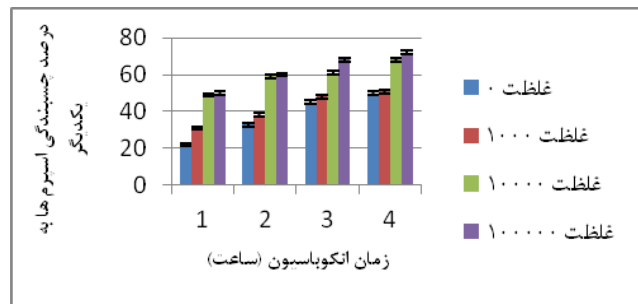
در مطالعه Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص شد که در بین ۳۰۲ نمونه *کاندیدا آلبیکنس* حدود ۸/۵٪ موارد مقاوم به فلوکونازول بودند (۲۶). در مطالعه Nasrollahi و همکاران در سال ۱۳۹۳ از ۴۶ نمونه *کاندیدا آلبیکنس* مورد ارزیابی ۱۴ مورد به فلوکونازول مقاوم بودند (۲۰). در مطالعه Hasanpour و همکاران نیز که در سال ۱۳۹۳ صورت گرفت مشخص شد که از ۱۶۰ سوآپ واژینال اخذ شده از بیماران مشکوک به کاندیدیازیس، ۱۵ مورد از نوع *آلبیکنس* بودند که همه آن‌ها نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند (۹). در مطالعه Balabandi



نمودار ۵- درصد اسپرم‌های پیش‌رونده ($P<0.05$) معنی‌دار

- درصد چسبندگی اسپرم‌ها به یکدیگر

نتایج نشان داد که *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم و حساس تفاوت در میزان چسبندگی اسپرم‌ها ایجاد می‌کند و در غلظت‌های ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ CFU/ml و مدت زمان ۴ ساعت مجاورت میزان چسبندگی اسپرم‌ها به هم در مقایسه با گروه کنترل منفی از کاهش معنی‌داری برخوردار بود ($P<0.05$) و با نتایج مربوط به کاهش کل اسپرم‌های متحرک و اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده هم‌خوانی داشت (نمودار ۶).



نمودار ۶- درصد چسبندگی اسپرم‌ها به هم ($P<0.05$) معنی‌دار

بحث

کاندیدا آلبیکنس یک پاتوژن فرصت‌طلب است که به‌صورت بی‌ضرر در سیستم ادراری تناسلی، پوست و دستگاه گوارش باقی می‌ماند. تغییر در شرایط میزبان مانند افت سیستم ایمنی و عدم تعادل در میکروفلور طبیعی منجر به رشد این پاتوژن می‌شود (۲). *کاندیدا آلبیکنس* می‌تواند باعث ایجاد دو نوع عفونت در انسان شود: عفونت‌های سطحی مانند کاندیدیازیس

نوع اضافه شدن است و در سویه دوم ۶ جهش از نوع تبدیل و ۶ جهش از نوع اضافه شدن صورت گرفته است و در نوکلئوتیدهای متفاوت از سایر تحقیقات ذکر شده مشاهده شده‌اند که می‌تواند در نتیجه تفاوت ژنتیکی بین سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق با جدایه‌های بررسی شده در سایر کشورها باشد.

در خصوص تأثیر عفونت کاندیدیایی بر پارامترهای اسپرم نرمال و در نتیجه اثر بر روند باروری مطالعه‌های انجام گرفته است. در تحقیق Burrello و همکاران نشان داده شده است که کاندیدا/آلبیکس حرکت اسپرم را به شدت کاهش می‌دهد و علاوه بر آن نفوذپذیری غشای میتوکندری در اسپرم‌های مواجهه یافته کاهش و در عوض آپوپتوز در این اسپرم‌ها افزایش می‌یابد (۳). Pellati و همکاران که به بررسی عفونت دستگاه تناسلی و ارتباط آن با ناباروری در زنان و مردان پرداختند دریافتند که کاندیدا/آلبیکس می‌تواند از طریق اختلال در حرکت اسپرم و نیز اپرماتوزوآ منجر به ناباروری در مردان شود (۲۱). در مطالعه حاضر نیز با بررسی کاندیدا/آلبیکس مقاوم و حساس بر روی اسپرم‌های نرمال این نتیجه به دست آمد که بعد از مدت زمان ۴ ساعت مجاورت اسپرم‌ها با غلظت‌های ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ با کاندیدا/آلبیکس میزان اسپرم‌های متحرک و درصد چسبندگی اسپرم‌ها به هم و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده نسبت به کنترل منفی کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند. بنابراین می‌تواند به‌عنوان عاملی برای ایجاد ناباروری در زوج‌ها مطرح باشد.

نتیجه‌گیری

وجود جهش در ژن‌هایی مانند *ERG11* نشان‌دهنده کاهش عملکرد داروهای آزولی مانند فلوکونازول در درمان عفونت‌های کاندیدیایی به دلیل کاهش تمایل دارو به *ERG11* و مهار بیوسنتز ارگوسترول است. بنابراین با وجود دلایل ژنتیکی مقاومت در کاندیدا/آلبیکس لازم است از داروهای جایگزین مناسب جهت درمان سریع‌تر و مؤثرتر در مبتلایان استفاده شود. همچنین کاندیدا/آلبیکس که مهم‌ترین دلیل واژینیت کاندیدیایی در زنان است بر روی اسپرم‌ها تأثیر گذاشته و باعث کاهش حرکت و چسبندگی آن‌ها می‌گردد، بنابراین می‌تواند عاملی برای ایجاد ناباروری در بانوانی که به این گونه عفونت واژینیت مبتلا شده‌اند، باشد.

و همکاران از بین ۲۳ نمونه کاندیدا/آلبیکس جدا شده از زنان مبتلا ۲۰ مورد به فلوکونازول مقاوم بودند (۱). مقایسه نتایج فوق با تحقیق حاضر که از ۱۰۰ نمونه اخذ شده از زنان، ۴۰ مورد کاندیدا/آلبیکس بود و از این بین تنها ۲ مورد نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند، نشان می‌دهد عفونت با کاندیدا/آلبیکس رو به افزایش است ولی از نظر مقاومت به دارو درصد کم‌تری را نشان داده است که می‌تواند در نتیجه توجه به کنترل مصرف داروهای آزولی در عفونت‌های واژینیت در سال‌های اخیر باشد.

هم‌چنین مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد مقاومت به آزول‌ها شناسایی شده است. آزول‌ها با اتصال اتم N خود به گروه هم موجود در *ERG11* و اشغال جایگاه اتصال سوبسترا باعث مهار سیتوکروم P450 می‌شوند. جهش در *ERG11* می‌تواند به واسطه تغییرهای ساختاری تمایل آزول‌ها را به این پروتئین از طریق ممانعت از ورود آزول‌ها به داخل ساختارش کاهش دهد (۱۷). تغییرهای ساختاری در *ERG11* نتیجه جهش‌هایی است که در نواحی خاصی از ژن *ERG11* به نام نقاط داغ رخ می‌دهد. نقاط داغ جهش‌پذیری در این ژن شامل آمینو اسیدهای ۱۰۵ تا ۱۶۵، ۲۶۶ تا ۲۸۷ و ۴۰۵ تا ۴۸۸ است (۴). سنگلارد و همکاران مشاهده کردند که جهش در اسید آمینه‌های گلیسین و سرین در نوکلئوتید شماره ۴۶۴ و گلیسین و آلانین در نوکلئوتید شماره ۱۲۹ باعث افزایش مقاومت به فلوکونازول می‌شوند (۲۴). Xu و همکاران در جدایه‌های کاندیدا/آلبیکس مقاوم به فلوکونازول جهش‌ها در اسید آمینه‌های گلیسین و ترئونین در نوکلئوتید شماره ۴۸۷ و سیستئین و ترئونین در نوکلئوتید شماره ۹۱۶ را در ژن *ERG11* گزارش دادند (۲۷). هم‌چنین در گزارش Lee که در مورد ژن‌های عامل مقاومت دارویی در جدایه‌های کاندیدا/آلبیکس است، نشان داده شد که در جدایه‌های مقاوم، بیان بیش از حد ژن *ERG11* عامل مقاومت دارویی است. هم‌چنین بیان شد که جهش‌های هموزیگوس اغلب در جدایه‌های مقاوم و جهش‌های هتروزیگوس اغلب در جدایه‌های حساس مشاهده می‌شوند (۱۲). در مطالعه حاضر نتایج تعیین توالی و یافتن جهش‌ها در ژن *ERG11* کاندیدا/آلبیکس مقاوم به دارو نشان داد در هر دو سویه مقاوم جداسازی شده بیش‌تر جهش‌ها در بازهای پورینی است و چند جهش در بازهای پیریمیدینی رخ داده که باعث ایجاد مقاومت به فلوکونازول و کتوکونازول شده است. جهش‌های ایجاد شده در دو سویه مقاوم بیش‌تر از نوع تبدیل و اضافه

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به خصوص دانشکده علوم زیستی و مسئولین بیمارستان- ها و مراکز درمانی و آزمایشگاهی تهران که در انجام کارهای آزمایشگاهی و تهیه نمونه‌های این تحقیق کمال همکاری و مساعدت لازم را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری فراوان می‌گردد.

منابع

- Balabandi S, Khazaei KZ, Ranji N. Correlation between ERG11 Gene Mutations and Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Strains Isolated from Rasht in Years 2015-2016. *A M U J*. 2017; 20(124): 13-22.
- Berman J. *Candida albicans*. *Current Biology* 2012; 22(16): 1-3.
- Burrello N, Salmeri M, Perdichizzi A, Bellanca S, Pettinato G, D'Agata R, et al. *Candida albicans* experimental infection: effects on human sperm motility, mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Reproductive Bio Med Online*. 2009; 18(4): 496-501.
- Debnath S, Addya S. Structural basis for heterogeneous phenotype of ERG11 dependent Azole resistance in *C. albicans* clinical isolates. *Spring plus*. 2014; 3(1): 660.
- Dressler N, Chandra A, Spineli LM, Schippert C. BMI and season are associated with vitamin D deficiency in women with impaired fertility: a two-centre analysis. *Arch gynecol obstet*. 2016; 293(4): 907-14.
- Eggert-Kruse W, Reuland M, Johannsen W, Strowitzki T, Schlehofer R. Cytomegalovirus (CMV) infection—related to male and/or female infertility factors? *Fertil Steril*. 2009; 91(1): 67-82.
- Eniola OW, Adetola AA, Abayomi BT. A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *J Microb Biotech Res*. 2017; 2(3): 379-85.
- George K, Kamath MS. Fertility and age. *J hum reprod sci*. 2010; 3(3): 121.
- Hasanpour ZZ, Bayat M, Roudbar MS. Evaluating the adherence of fluconazole resistance *Candida albicans* species in comparison with *Candida glabrata* species on vagina and intestine cell lines. *New cell molec biotech J*. 2015; 5 (17): 74-80.
- Horn F, Heinekamp T, Kniemeyer O, Pollmächer J, Valiante V, Brakhage AA. Systems biology of fungal infection. *Fron Microb*. 2012; 3: 1-20.
- Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum reprod update*. 2007; 13(3): 209-23.
- Lee M-K, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J antimicrob chem*. 2004; 53(2): 217-24.
- Legro RS. A 27-year-old woman with a diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Jama*. 2007; 297(5): 509-19.
- Lepak AJ, Andes DR. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cold Spring Harb pers med*. 2015; 5(5): 1-23.
- Liu H. Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in *Candida albicans*, a commensal and a pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2002; 292: 299-311.
- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoed-Ndam L, Wolff M, et al. Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Inten care med*. 2014; 40(9): 1303-12.
- Manastır L, Ergon MC, YUcesoy M. Investigation of mutations in Erg11 gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses*. 2011; 54(2): 99-104.
- Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrin metabo clin North America*. 2008; 37(1): 67-99.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4(2): 119-28.
- Nasrollahi Omran A, Nazemi A, Kihanian SH, Aryana N. Lipase Gene Expression of Resistant and Sensitive *Candida Albicans* to Fluconazole Isolated from Patients Suffering from Oral Candidiasis and Vaginal Candidiasis. *Medl Lab J*. 2015; 8(5): 90-6.
- Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. Genital tract infections and infertility. *Europ J Obste Gynecol Reprod Bio*. 2008; 140(1): 3-11.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microb Rev*. 2007; 20: 133-63.
- Rahimi H, Roudbar MS, Kachouei R, Roudbari M. Expression of *Candida albicans* ALS 2 and ALS 9 genes from women with vaginal candidiasis by RT-PCR. *Moda J medl sci*. 2013; 16(2): 39-49.

24. Sanglard D, Ischer Fo, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob agen chem.* 2003; 47(8): 2404-12.
25. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MJSM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J med microb.* 2013; 62(1): 10-24.
26. Wang B, Huang LH, Zhao JX, Wei M, Fang H, Wang DY, et al. ERG11 mutations associated with azole resistance in *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidosis patient. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015; 5(11): 909-14.
27. Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2008; 61(4): 798-804.
28. Zhang JY, Liu JH, Liu FD, Xia YH, Wang J, Liu X. Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. *Mycoses* 2014; 57(10): 584-91.