مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم، شماره سی و چهار - بهار ۱۳۹۸

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه و شناسایی جهش در ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم‌به دارو و ارتباط آن با ناباروری زنان ایرانی

الهام سیاسی*[1]، محدثه عبدی برزگر[1]، فرناز سهراب‌وند[2]

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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

چکیده

سابقه و هدف: *کاندیدا آلبیکنس* مهم‌ترین دلیل ولوواژینال کاندیدیازیس است و مقاومت به آزول‌ها با مکانیسم‌هایی هم‌چون تغییر در ژن *ERG11* می‌تواند در این پاتوژن رخ دهد. هدف از این مطالعه بررسی جهش در ژن *ERG11* *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم‌به دارو در بیماران مبتلا به واژینیت کاندیدیایی و ارتباط آن با ناباروری در زنان ایرانی بود.

مواد و روش‌ها : با نمونه‌گیری واژینال از تعداد ۱۰۰ بیمار گونه‌های *کاندیدا البیکانس* با استفاده از روش کشت بر روی محیط کروم آگار جداسازی شدند. حساسیت دارویی بر اساس روش استاندارد انتشار دیسک تعیین شد. سپس ژنوم نمونه‌های مقاوم استخراج شد و با انجام PCR و تعیین توالی جهش در ژن *ERG11* مشخص شد. جهت بررسی تغییر خصوصیت‌های اسپرم و ارتباط با ناباروری، نمونه اسپرم نرمال با *کاندیدا آلبیکانس* حساس و مقاوم در غلظت و زمان‌های مختلف مجاورت داده شد.

یافته‌ها: 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 غلظت‌های ۱۰۰۰۰۰CFU/ml و ۱۰۰۰۰ ، مدت زمان ۴ ساعت و با ۳ بار تکرار، در میزان چسبندگی و تحرک اسپرم‌ها کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد مقاومت به دارو می‌تواند با جهش در ژن *ERG11* در *کاندیدا البیکانس* افزایش یابد و این عفونت‌های واژینیت کاندیدیایی می‌تواند با ایجاد ناباروری در زنان ارتباط داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*، *ژن ERG11*، ناباروری.

مقدمه

ناباروری، بارور نشدن یک زوج، پس از یکسال تماس جنسی منظم بدون استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری است. از دلایل ناباروری در زنان می‌توان به موارد زیر اشاره نمود، اختلال‌های هورمونی، هایپرلاکتینمی، تأثیر فاکتورهای محیطی، تغییرهایی در وزن، سن، سبک زندگی و عفونت‌ها (۵،۷،۸،۱۱،۱۳،۱۸). هم‌چنین بیش‌تر میکرو ارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، انگل‌ها، مخمرها و ویروس‌ها در ناباروری زنان نقش دارند. ۳۵٪ از زنانی که دارای مشکل‌های ناباروری هستند از اختلال‌های تخمدانی و تغییرهای التهابی مجرای تخمدانی القا شده توسط عفونت‌ها رنج می‌برند. علاوه‌بر این مشخص شده است که التهاب، لکوسیتوز سیمن و سیتوکین‌های القا شده توسط عفونت‌ها از عوامل بسیار مهم در ناباروری مردان هستند. از عفونت‌هایی که تاکنون در رابطه با ناباروری شناخته شده‌اند

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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

می‌توان به عفونت‌های *کلامیدیا تراکوماتیس، گاردنلا واژینالیس، اشریشیاکلی و سایتومگال ویروس* اشاره کرد (۶). هم‌چنین عفونت‌های قارچی از دیگر علل مؤثر در ناباروری است. از بین تمامی قارچ‌ها تنها ۶۰۰ گونه برای انسان بیماری‌زا هستند که برخی از آن‌ها باعث ایجاد عفونت‌های سیستمیک و تهدیدکننده حیات هستند که از آن جمله می‌توان به *آسپرژیلوس فومیگاتیس، کریپتوکوکوس نئوفورمنس، هیستوپلاسما کپسولاتوم و کاندیدا آلبیکانس* اشاره کرد (۲۲). *کاندیدا آلبیکنس* تاکنون از خاک، حیوانات، محیط‌های بیمارستانی و منابع غذایی جدا شده است. *کاندیدا آلبیکنس* عامل ۵۰٪ از تمامی موارد کاندیدیازیس مهاجم است. از جمله جایگاه‌هایی که محل کلونیزاسیون *کاندیدا* هستند عبارتند از کاندیدیازیس درون شکمی [1](IAC)، کاندیدیازیس کبدی–طحالی [2](HSC)، کاندیدیازیس نوزادی [3](NC) و کاندیدیازیس ادراری- تناسلی [4](GUC) ،که مهم‌ترین نوع آن کاندیدیازیس ولوواژینال است (۲۵). *کاندیدا آلبیکنس* عمده‌ترین دلیل ایجاد واژینیت و هم‌چنین بیش‌تر موارد ولوواژینال است (۲۸). *عفونت کاندیدا آلبیکنس* با تعداد محدودی از داروهای ضد قارچ درمان می‌شود که این داروها عبارتند از پلی-ان-ها، آزول‌ها و ایکینوکاندین-ها. هر یک از این عوامل دارای اهداف سلولی ویژه‌ای هستند. ۴۰ تا ۶۰٪ از بیمارانی که به کاندیدیازیس مهاجم مبتلا هستند، زنده نمی‌مانند، بنابراین درمان‌های 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 درمان‌ها (۱۶). از دیگر عوامل می‌توان 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 آلبیکنس* است (۱۴). بر اساس مطالعه‌های انجام شده انواع مکانیسم‌های مقاومت دارویی را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد که عبارتند از: کاهش اثر غلظت دارو درون سلول، تغییرهای دارو – هدف، مهار متابولیکی. مکانیسم‌های متعددی برای *مقاومت کاندیدا آلبیکنس* در برابر ترکیب‌های ضدقارچ آزولی پیشنهاد شده است که عبارتند از ۱. تغییر آنزیم هدف، که به‌وسیله ژن *ERG11* کد می‌شود. در *کاندیدا آلبیکنس* آنزیم هدف آزول‌ها، ERG11p-demethylase است چراکه یک آنزیم کلیدی در مسیر سنتز ارگوسترول است. آزول‌ها باعث مهار تشکیل دیواره قارچ‌ها می‌شوند. جهش در *ERG11* باعث کاهش تمایل آنزیم هدف به آزول‌ها می‌شود. ۲. افزایش بیان *ERG11* نیز به مقاومت در برابر عوامل ضدقارچ منجر می‌شود. مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که جهش در برخی از فاکتورهای فعال کننده ترجمه مانند upc2p می‌توانند *ERG11* را تنظیم کنند. ۳. مقاومت می‌تواند به‌دلیل کاهش تجمع دارو نیز باشد که به‌دنبال افزایش فعالیت دو پمپ خارج کننده دارو باشد که به‌وسیله ژن‌های *CDR1,CDR2* و *MDR1* کد می‌شوند و ۴. تولید بیوفیلم توسط این قارچ نیز می‌تواند منجر به مقاومت شود (۲۶). تاکنون مطالعه‌های مختلفی در رابطه با ارتباط عفونت‌های باکتریایی و ویروسی با ناباروری انجام شده است. ارتباط بین عفونت با *کاندیدا آلبیکنس* و ناباروری در مردان به اثبات رسیده است که یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های آن، کاهش حرکت اسپرم است. با توجه‌به این‌که *کاندیدا آلبیکنس* عمده‌ترین دلیل ایجاد واژینیت و هم‌چنین بیش‌تر موارد ولوواژینیت گزارش شده است، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط جهش در ژن *ERG11 کاندیدا آلبیکنس* مقاوم‌به دارو و ارتباط آن با ناباروری در زنان ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

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 آبکی انجام گرفت. جامعه مورد مطالعه را ۱۰۰ خانم مراجعه کننده به مطب متخصص زنان و زایمان در شهر تهران تشکیل می‌دادند. با استفاده از ۳ سوآپ استریل از ترشحات واژینال هر کدام از افراد، نمونه‌برداری شد. سپس سوآپ‌ها 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 گونه‌های مهم کلینیکی *کاندیدا* (*کاندیدا کروزه‌ای، کاندیداتروپیکالیس، کاندیدا البیکنس*) است (محیط کشت تهیه شده از شرکت پرونادیسا کشور اسپانیا). نمونه‌های سوآپ موجود

[1] intra-abdominal candidiasis
[2] Hepatosplenic candidiasis
[3] Neonatal Candidiasis
[4] Genitourinary Candidiasis

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

درسرم فیزیولوژی بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کشت داده شدند، کشت تلقیح شده، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و بعد از گذشت ۴۸ ساعت کلنی‌های 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 مربوطبه *کاندیدا کروزه‌ای* و رنگ آبی مربوط به *کاندیدا تروپیکالیس* بود.

تعیین حساسیت دارویی *کاندیدا* به‌روش انتشار دیسک (دیسک دیفیوژن)

برای این منظور از محیط مولر هینتون آگار (تهیه شده از شرکت پرونادیسا کشور اسپانیا)، لوله حاوی نیم مک فارلند، لوله‌های حاوی یک سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل، دیسک‌های 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 نیم‌مک‌فارلند، یک سوآپ استریل را آغشته به سوسپانسیون نموده در سطح پلیت محیط مولر هینتون آگار ۳ بار به‌طور کامل با زاویه ۶۰ درجه و به‌طور یکنواخت در سطح پلیت تلقیح شد. در مرحله بعد دیسک های آنتی‌بیوتیکی 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 سانتی‌متر از کناره پلیت و از یکدیگر قرار داده شدند. پلیت‌ها در حالت معکوس به-مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله عدم رشد با خط‌کش اندازه‌گیری گردید و با توجه‌به جدول استاندارد دیسک‌ها، نتایج تست آنتی‌بیوگرام به-صورت مقاوم (Resistant)، نیمه حساس (Intermediate) و حساس (Susceptible) تهیه گردید.

استخراج ژنوم از *کاندیدا البیکانس*

جداسازی ژنوم از نمونه های *کاندیدا البیکانس* 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

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 به‌مقدار ۸/۵ µl، بود. از برنامه دستگاه ترمو سایکلر که شامل: دمای واشرست اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، دمای واشرست ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۲/۶ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی-گراد ۸۰ ثانیه و دمای اتصال نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه بود و با ۴۰ چرخه تکرار انجام گرفت، استفاده شد.

الکتروفورز و مشاهده باند حاصل از PCR

پس از اتمام واکنش‌های PCR، محصول واکنش، الکتروفورز گردید. برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. سپس با رنگ‌آمیزی به‌وسیله 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 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. هم‌چنین ویال حاوی آب مقطر به‌جای ژنوم قارچ، به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز جهش‌های موجود در نمونه‌های مثبت

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

بررسی تأثیر نمونه‌های *کاندیداآلبیکنس* بر خصوصیت‌های اسپرم

در این آزمایش یک نمونه *کاندیدا آلبیکانس* حساس و یک نمونه مقاوم انتخاب شد و با تعداد صفر ,۱۰۰۰،۱۰۰۰۰،۱۰۰۰۰۰ CFU\ml به‌مدت ۱ تا ۴ ساعت در مجاورت مایع سمن نرمال قرار داده شد و توسط میکروسکوپ نوری دوربین‌دار و نرم‌افزار

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

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

۱ – Motility %: درصد اسپرم‌های متحرک

۲-Motile Sperm Concentration: درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده

۳-Agglutination: چسبندگی اسپرم‌های به هم (سر به‌دم، سر به‌سر، دم به‌دم)

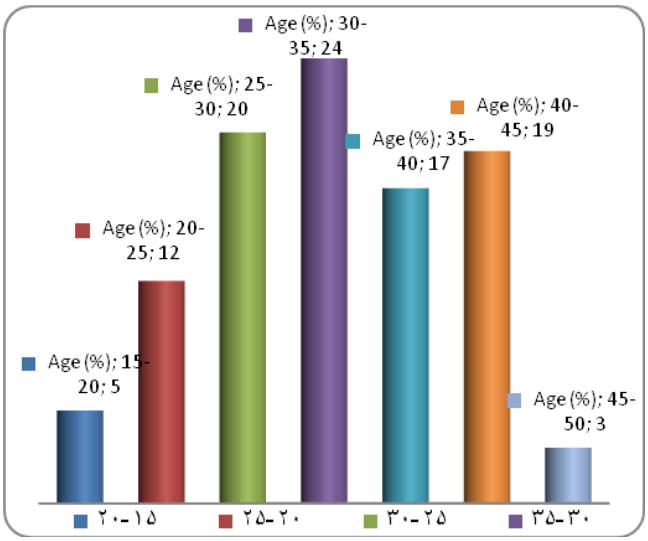
تجزیه وتحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ و آزمون T-test استفاده شد و نتایج با ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

بررسی جمعیت مورد مطالعه از نظر سنی

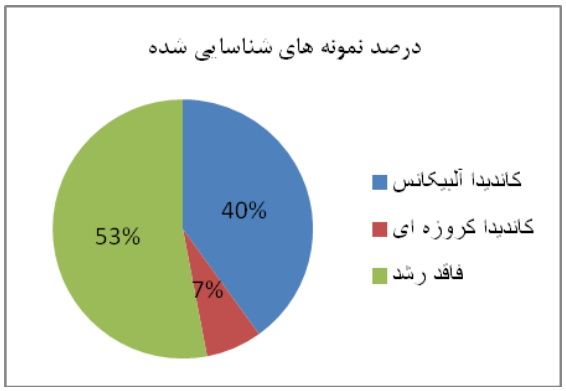
در این مطالعه بیش‌ترین افراد در گروه سنی ۳۵-۳۰ سال و کم‌ترین تعداد نیز در گروه سنی ۴۰-۴۵ سال قرار داشتند. نمودار سنی افراد مورد بررسی در نمودار ۱ آورده شده است.



نمودار ۱- نمودار سنی افراد مورد مطالعه

شناسایی گونه‌های کاندیدایی

با استفاده از محیط کشت کروم آگار نمونه‌های 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 آلبیکنس*، ۷ مورد *کاندیدا کروزه‌ای* بودند و۵۳ مورد نیز در این محیط رشد نکردند (نمودار ۲).



نمودار۲- نمودار شناسایی گونه های کاندیدا در نمونه های اخذ شده از بیماران

میزان مقاومت گونه‌های کاندیدا به فلوکونازول و کتوکونازول

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

جدول ۱- فراوانی گونه‌های مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* با انجام تست آنتی-بیوگرام

آنتی بیوتیک	تعداد نمونه های مقاوم (درصد فراوانی)	تعداد نمونه های 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

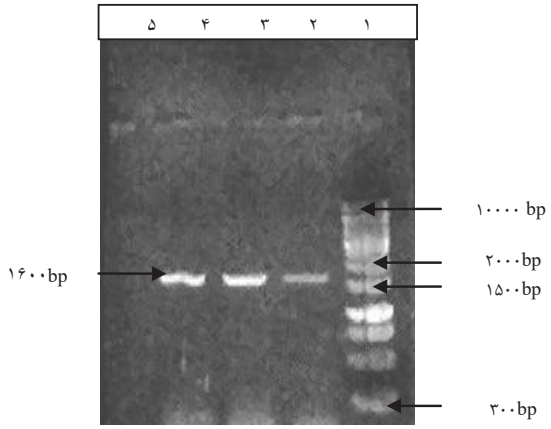
بعد از الکتروفورز ژنوم تخلیص شده و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل با دستگاه ژل‌داک مشاهده گردید و باند ژنوم تخلیص شده مشخص شد.

نتایج تکثیر ژن *ERG11* با PCR

پس از تکثیر ژن *ERG11*، محصول PCR روی ژل اگاروز ۲٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برامید با دستگاه

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

ژل‌داک باندهای bp ۱۶۰۰ مربوطبه تکثیر ژن مورد مطالعه مشاهده شد.



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

تعیین توالی و یافتن جهش‌ها در ژن *ERG11*

بعد از تکثیر ژن موردنظر با پرایمرهای اختصاصی، نمونه‌ها برای توالی‌یابی و بررسی نقاط جهش به شرکت فراپژوه 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 نمونه های *کاندیدا آلبیکنس* بر خصوصیت‌های فیزیولوژیک اسپرم

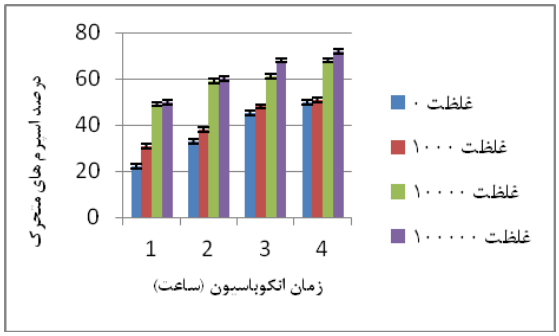
– درصد اسپرم‌های متحرک

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) (نمودار۴).

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

سویه	Conversion	Insertion	Deletion	Transversion
I	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	C→815—816 A→ 825—826 A→1044—1045		
II	A→T 384 G→t 385 A→T 852 T→A 984 A→T 987 A→G 1218	TTT→390-39 A→875-6 G→954-955 A→1032-33 A→1038-39 A→1044-45		

*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 ازنوع تبدیل (Conversion) و ۳ موتاسیون از نوع اضافه شدن (Insertion) است.

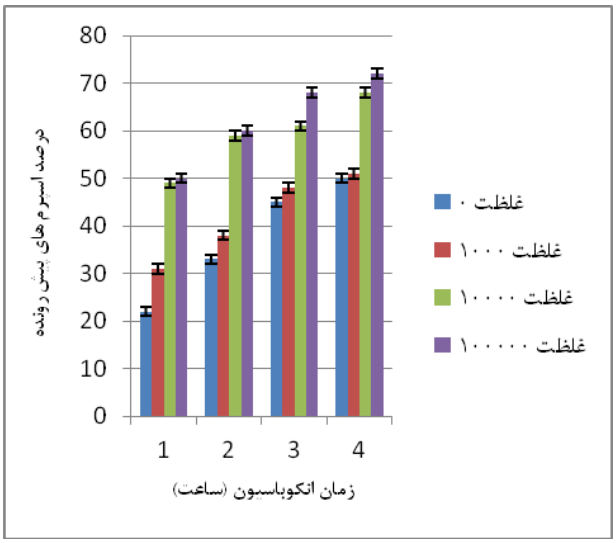


نمودار ۴- درصد اسپرم های متحرک (P<0.05) معنی‌دار

– درصد اسپرم های پیش‌رونده

نتایج نشان داد که 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 (نمودار۵).

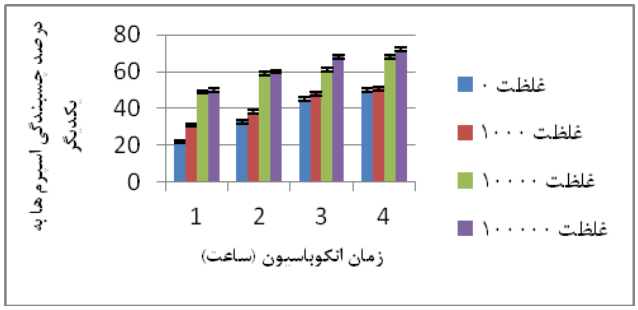
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021



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

– درصد چسبندگی اسپرم‌ها به یکدیگر

نتایج نشان داد که 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 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، کسانیکه 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 مقاوم‌به 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 جدایه-های کلینیکی *کاندیدا آلبیکنس*، امکان ارائه راه‌کارهای درمانی مناسب‌تر در آینده را فراهم می‌سازد (۱). در این مطالعه ارتباط جهش در ژن *ERG11 کاندیدا آلبیکنس* مقاوم‌به 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* مقاوم‌به 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 مقاوم‌به 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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

و همکاران از بین ۲۳ نمونه *کاندیدا آلبیکنس* 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 آلبیکنس* بود و از این بین تنها ۲ مورد نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند، نشان می‌دهد عفونت با *کاندیدا البیکانس* رو به افزایش است ولی از نظر مقاومت به دارو درصد کم‌تری را نشان داده است که می‌تواند در نتیجه توجه‌به 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 *ERG11p* و اشغال جایگاه اتصال سوبسترا باعث مهار سیتوکروم P450 می‌شوند. جهش در *ERG11* می‌تواند به‌واسطه تغییرهای ساختاری تمایل آزول‌ها را به این پروتئین از طریق ممانعت از ورود آزول‌ها به داخل ساختارش کاهش دهد (۱۷). تغییرهای ساختاری در *ERG11p* نتیجه جهش-هایی است که در نواحی خاصی از ژن *ERG11* به نام نقاط داغ رخ می‌دهد. نقاط داغ جهش پذیری 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 آمینه-های گلایسین و سرین در نوکلئوتید شماره ۴۶۴ و گلایسین و آلانین در نوکلئوتید شماره ۱۲۹ باعث افزایش مقاومت‌به فلوکونازول می‌شوند (۲۴). Xu و همکاران در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم‌به فلوکونازول جهش‌ها در اسید آمینه-های گلایسین و ترئونین در نوکلئوتید شماره ۴۸۷ و سیستئین و ترئونین در نوکلئوتید شماره۹۱۶ را در ژن *ERG11* گزارش دادند (۲۷). هم‌چنین در گزارش Lee که در مورد ژن‌های عامل مقاومت دارویی در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* 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 آلبیکنس* مقاوم‌به 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. جهش-های ایجاد شده در دو سویه مقاوم بیش‌تر از نوع تبدیل و اضافه 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 آلبیکنس* حرکت اسپرم را به‌شدت کاهش می‌دهد و علاوه‌بر 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 آلبیکنس* می‌تواند از طریق اختلال در حرکت اسپرم و نیز اپرماتوزوآ منجر به ناباروری در مردان شود (۲۱). در مطالعه حاضر نیز با بررسی *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم و حساس بر روی اسپرم‌های نرمال این نتیجه به‌دست آمد که بعد از مدت زمان ۴ ساعت مجاورت اسپرم‌ها با غلظت‌های ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ با *کاندیدا آلبیکنس* میزان اسپرم‌های متحرک و درصد چسبندگی اسپرم‌ها به‌هم و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده نسبت‌به 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 به‌دلیل کاهش تمایل دارو به *ERG11* و مهار بیوسنتز ارگوسترول است. بنابراین با وجود دلایل ژنتیکی مقاومت در *کاندیدا آلبیکنس* لازم است از داروهای جایگزین مناسب جهت درمان سریع‌تر و مؤثرتر در مبتلایان استفاده شود. هم‌چنین *کاندیدا آلبیکنس* که مهم‌ترین دلیل واژینیت کاندیدایی 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.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به‌خصوص 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 می-گردد.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021

منابع

1. 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.
2. Berman J. Candida albicans. Current Biology 2012; 22(16): 1-3.
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.
4. 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.
5. 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 gyneco obstet. 2016; 293(4): 907-14.
6. 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.
7. 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.
8. George K, Kamath MS. Fertility and age. J hum reprod sci. 2010; 3(3): 121.
9. Hasanpour ZZ, Bayat M, Roudbar MS. Evaluating the adherence of fluconazole resistance candida albicans species in comparison with candida galbrata species on vagina and intestine cell lines. New cell molecul biotech J. 2015; 5 (17): 74-80.
10. Horn F, Heinekamp T, Kniemeyer O, Pollmächer J, Valiante V, Brakhage AA. Systems biology of fungal infection. Fron Microb. 2012; 3: 1-20.
11. 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.
12. 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.
13. Legro RS. A 27-year-old woman with a diagnosis of polycystic ovary syndrome. Jama. 2007; 297(5): 509-19.
14. Lepak AJ, Andes DR. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. Cold Sprin Harb pers med. 2015; 5(5): 1-23.
15. 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.
16. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). Inten care med. 2014; 40(9): 1303-12.
17. ManastIr 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.
18. Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. Endocrin metabo clin North America. 2008; 37(1): 67-99.
19. Mayer FL, wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence 2013; 4(2): 119–28.
20. 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.
21. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. Genital tract infections and infertility. Europ J Obste Gyneco Reprod Bio. 2008; 140(1): 3-11.
22. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microb Rev. 2007; 20: 133-63.
23. 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.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:41 +0430 on Thursday June 17th 2021