

نقش دما، pH و میزان غلظت گلوکز بر میزان تولید لوله زایا در شرایط برون تنی (In vitro) توسط قارچ کاندیدا آلبیکنس

چکیده

زمینه و هدف: توانایی کاندیدا آلبیکنس برای تولید لوله زایا در مجاورت با سرم انسان از مهمترین مکانیسمهای بیماریزاست و شروعی برای تغییر حالت این قارچ از شکل مخمیری به شکل رشته ای محسوب می شود که تحت تاثیر بعضی عوامل محیطی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر بعضی عوامل محیطی مانند دما، pH و میزان غلظت گلوکز بر میزان تولید لوله زایا توسط گونه کاندیدا آلبیکنس در شرایط برون تنی بوده است.

روش بررسی: تست تولید لوله زایا (Germ tube) با سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) با استفاده از سرم انسان دارای قند نرمال در حرارت، pH و غلظتهای مختلف گلوکز در آزمایشگاه انجام یافت و شروع تولید اولین سلولهای تولید کننده لوله زایا و همچنین میانگین درصد سلولهای واجد لوله زایا پس از دو ساعت محاسبه گردید. میانگین درصد سلولهای واجد لوله زایا در شرایط مختلف یا به عبارتی میزان تحریک قارچ برای تبدیل از حالت مخمیری به رشته ای از نظر آماری (One-way ANOVA) مقایسه شدند.

یافته ها: تولید لوله زایا در حرارت ۳۷ درجه، pH برابر ۵/۶ و در غلظت ۳۰ mg/ml گلوکز دارای بالاترین میزان در مقایسه با سایر شرایط محیطی و تغذیه ای بود ($P=0/0001$). همچنین این شرایط منجر به کوتاهترین زمان برای مشاهده اولین سلولهای مخمیری کاندیدا واجد لوله زایا در شرایط برون تنی شده بود. **نتیجه گیری:** به نظر می رسد که در بدن میزبان هم همین شرایط باعث تحریک قارچ به تولید لوله زایا در بدن، بخصوص در افراد دیابتی و در نتیجه باعث تشدید قدرت تهاجمی قارچ مشابه شرایط برون تنی شود.

واژه های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، لوله زایا، برون تنی، دما، pH، گلوکز

عباسعلی جعفری ندوشن

استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی،
دانشکده پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید
صدوقی یزد

نویسنده مسئول: عباسعلی جعفری ندوشن

تلفن: ۰۳۵۱ ۸۲۴۱۷۵۱

پست الکترونیک:

jafariabbas@ssu.ac.ir

آدرس: یزد، صفاییه، خیابان بوعلی، دانشکده
پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

وصول مقاله: ۸۷/۱/۲۰

اصلاح نهایی: ۸۷/۳/۱۲

پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۷

مقدمه

پیشرفتهای جدید تکنولوژی پزشکی مانند رادیوتراپی، کموتراپی، پیوند اعضا و همچنین افزایش میزان بقا و جمعیت بیماران ایمنوساپرس، افراد مبتلا به بدخیمیا و ایدزها منجر به گسترش و شیوع بیماریهای قارچی فرصت طلب در طول چنددهه گذشته شده است (۱ و ۲). کاندیدیازیس از جمله بیماریهای قارچی فرصت طلب و دارای علائم بالینی بسیار متنوع است که می تواند از پوست و ناخن گرفته تا مخاط دهان، واژن و ارگانهای داخلی (کاندیدیازیس سیستمیک) را درگیر نماید. عامل این بیماری یعنی گونه های مختلف کاندیدا، چهارمین عامل شایع از عوامل عفونتهای بیمارستانی است (۳). گونه های مختلف کاندیدا از جمله کاندیدا آلیکنس بخشی از فلورنرمال میکروبی بدن انسان است که در سطوح جلدی و مخاطی، پوست، دهان، دستگاه گوارش و واژن انسان به صورت فلور نرمال و همزیست وجود دارد. به علاوه گونه های مختلف کاندیدا از جمله کاندیدا آلیکنس به طور طبیعی زمانی که سیستم ایمنی بدن ضعیف شود و یا تعادل میکروبی فلورنرمال بدن به هم می خورد، تغییر حالت داده، تبدیل به فرم فرصت طلب بیماریزا و مهاجم می شود. بعلاوه کاندیدا یکی از عوامل بیماریزای مهاجم قارچی در دیابتها، بدخیمیا، نوزادان نارس و افراد مبتلا به ایدز می باشد (۴ و ۵ و ۶ و ۷).

گونه کاندیدا آلیکنس مهمترین گونه مهاجمی (ویرولانته) بیماری کاندیدیازیس است و تعدادی از عوامل ویرولانته در کاندیدا آلیکنس وجود دارد که به صورت تجربی نیز اثبات شده است (۸ و ۹). در میان این عوامل توانایی تغییر مورفولوژی کاندیدا آلیکنس از حالت بلاستوکونیدیا (فرم مخمری) به فرم میسلالیال با شروع تولید لوله زایا توسط این قارچ موضوع بسیاری از تحقیقات گسترده ست (۷). از جنس کاندیدا تنها دو گونه کاندیدا آلیکنس و کاندیدا دابلنسیس علاوه بر توانایی تولید میسلوم کاذب توانایی تولید لوله زایا یا جرم تیوب نیز دارند که در بیماریزایی این قارچها مهم است که اولی از شایعترین و مهمترین عامل کاندیدا کاندیدیازیس و دومی از گونه های جدا شده از دهان بیماران مبتلا به ایدز است که اخیرا شناخته شده است (۷).

میسلوم کاذب مشابه بلاستوکونیدی با عمل جوانه زدن تشکیل می شود، هر چند که سلول جدید متصل به سلول مادر بوده، طویل

می شود. برعکس جرم تیوب رشد خارج سلولی بلاستوکونیدیها ست که به وسیله رشد راسی یک سلول و به دنبال آن تشکیل دیواره عرضی در پشت نوک روینده آن به وجود می آید. در حقیقت لوله زایا مقدمه و شروع تشکیل میسلوم حقیقی است که دارای دیواره های موازی می باشد (۹ و ۱۰ و ۱۱ و ۱۲ و ۱۳). در شرایط *In vivo* تغییر مورفولوژیک مخمری به میسلالیال از جمله جرم تیوب به وسیله شرایط محیطی و یا تغذیه ای (مانند حرارت، pH و منبع کربن) تقویت می شود (۱ و ۲ و ۱۴).

در مطالعه حاضر تاثیر بعضی عوامل محیطی مانند دما، pH و میزان غلظت گلوکز بر میزان تولید جرم تیوب (لوله زایا) توسط گونه کاندیدا آلیکنس در شرایط برون تنی (*In vitro*) بررسی شده است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی مداخله ای بوده که بر اساس تست استاندارد تولید لوله زایا (*Germ tube test*) در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) اجرا گردیده است و در حقیقت برای تشخیص افتراقی کاندیدا آلیکنس از سایر گونه های کاندیدا در مجاورت با سرم انسان، حرارت ۳۷ درجه به کار می رود (۷). این تست برای بررسی نقش عوامل محیطی دما، pH و همچنین اهمیت غلظت گلوکز بر میزان تحریک تولید لوله زایا در شرایط کنترل شده و در ۵ تکرار انجام یافت. برای این منظور سوش استاندارد کاندیدا آلیکنس (ATCC 10231) بر روی محیط ساپورودکستروز آگار (Merck, Germany) کشت تهیه و سپس کلنیهای تازه آن با استفاده از یک لوپ استریل داخل لوله های آزمایش محتوی ۰/۵ میلی لیتر سرم انسان (سرم فردی با قند خون نرمال معادل میزان گلوکز ۹۰ mg/dl ناشتا) سوسپانسیون 1×10^5 CFU/ml تهیه گردید. برای بررسی نقش عوامل مذکور این سوسپانسیون در شرایط مختلف کنترل شده به مدت ۲ ساعت نگهداری و آزمایش شدند. این شرایط شامل درجه حرارت های ۲۷، ۳۲، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتیگراد، pH های برابر ۵/۵، ۶، ۶/۵ و ۷ در مجاورت با غلظتهای صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ mg/ml گلوکز خالص (Merck, Germany) بوده است. برای تنظیم pH از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال و با کمک میکروپیپت استفاده شد. در موارد

و مقدار $0/05 \leq P$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تولید لوله زایا در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، pH برابر ۶/۵ و در غلظت ۳۰ mg/ml گلوکز بالاترین میزان بوده (جدول شماره ۱ تا ۳) و همچنین در این شرایط کوتاهترین زمان (به دقیقه) برای مشاهده اولین مخمرهای دارای لوله زایا مورد نیاز بود (جدول شماره ۴).

با آزمون آماری One-way ANOVA تفاوت بین میانگین درصد سلولهای دارای لوله زایا در دماهای مختلف، pHهای مختلف و غلظتهای مختلف مورد بررسی از نظر آماری معنی دار بود ($P=0/001$).

با آزمون آماری Tukey برای مقایسه دو به دو هر کدام از پارامترهای مختلف مورد آزمایش، به استثنای تفاوت بین میانگین سلولهای داری لوله زایا در دو غلظت صفر و ۱۰ میلیگرم گلوکز ($P=0/394$)، در سایر موارد مقایسه دو به دو پارامترها دارای تفاوت آماری معنی دار بود ($P=0/001$).

افزایش حجم احتمالی تعداد نهایی سلولهای کاندیدا در سوسپانسیون سلولی اصلاح گردید. در این آزمایشها سعی شد که با تغییر هر پارامتر مورد بررسی سایر پارامترها ثابت نگهداشته شود. پس از تهیه سوسپانسیون مخمری (1×10^5 CFU/ml) با شرایط فوق در فواصل ۱۰ دقیقه ای و حداکثر تا ۲ ساعت یک قطره از سوسپانسیون تست را بر روی یک لام هموسیتومتر (توما) زیر میکروسکوپ قرار داده، با پوشاندن با یک لامل تمیز در زیر میکروسکوپ باعدسی شماره ۴۰ و ۱۰ بررسی شدند. کوتاهترین زمانی که رشته های ظریف مشخصه جرم تیوب (لوله زایا) در اطراف سلولهای مخمری مشاهده می شد در هر آزمایش ثبت و در نهایت پس از ۲ ساعت میانگین درصد سلولهای مخمری واجد لوله زایا در ۵ میدان دید برای هر شرایط آزمایش شمارش و میانگین و انحراف معیار آنها محاسبه گردید.

برای هر شرایط مورد آزمایش ۵ تکرار (از ۵ کلنی مختلف) کاندیدا آلیکنس آزمایش شده و میانگین درصد سلولهای واجد لوله زایا در شرایط مختلف با تست آماری One-way ANOVA مقایسه

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار درصد سلولهای *C. albicans* واجد لوله زایا پس از دو ساعت در حرارت های مختلف مورد بررسی

انحراف معیار	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	دما (درجه سانتیگراد)
۰	۱	۲۷
۱/۱۴	۷/۶	۳۲
۴/۱	۴۵	۳۷
۲/۸	۳۲/۸	۴۲

جدول شماره ۲: میانگین و انحراف معیار درصد سلولهای *C. albicans* واجد لوله زایا پس از دو ساعت در pH مختلف مورد بررسی

انحراف معیار	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	pH
صفر	صفر	۵/۵
۱/۴	۲۲	۶
۱/۶	۶۰	۶/۵
۱/۹	۳۴/۸	۷

جدول شماره ۳: میانگین و انحراف معیار درصد سلولهای *C. albicans* واجد لوله زایا پس از دو ساعت در غلظتهای مختلف گلوکز مورد بررسی

انحراف معیار	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	غلظت گلوکز (mg/ml)
۱/۶	۲۱	صفر
۱/۶	۲۵	۱۰
۵/۶	۵۷/۲	۲۰
۴/۸	۸۸/۶	۳۰

جدول شماره ۴: میانگین و انحراف معیار زمان شروع تولید لوله زایا (دقیقه) در شرایط مختلف مورد بررسی توسط کاندیدا آلبیکنس

دما		
انحراف معیار	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	درجه سانتیگراد
۱۵/۸	۹۰	۲۷
۷/۱	۷۰	۳۲
۱۴/۸	۳۲	۳۷
۱۱/۴	۴۶	۴۲
PH		
انحراف معیار	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	pH میزان
۱۱/۴	۶۶	۵/۵
۷/۱	۲۰	۶
۴/۵	۱۲	۶/۵
۷/۱	۳۰	۷
غلظت گلوکز		
انحراف معیار	میانگین سلولهای واجد لوله زایا	غلظت (Mg/ml)
۱۱/۴	۳۶	صفر
۷/۱	۳۰	۱۰
۴/۵	۱۸	۲۰
۴/۷	۱۲	۳۰

بحث

باعث تخریب سلول بیگانه خوار شود (۱۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعدادی از عوامل محیطی و تغذیه ای مانند PH، حرارت و غلظت گلوکز می تواند در شرایط آزمایشگاهی (برون تنی) بر میزان تولید لوله زایا یا در حقیقت میزان قدرت تهاجمی و بیماریزایی قارچ موثر باشد. در مطالعه حاضر تاثیر عامل محیطی PH و درجه حرارت و یک عامل تغذیه ای یعنی میزان غلظت گلوکز به عنوان منبع کربن مورد نیاز قارچ در شرایط برون تنی آزمایش و ارزیابی شد.

توانایی تغییر حالت قارچ از فرم مخمری به فرم میسلالی (تولید لوله زایا) در حقیقت نوعی مکانیسم تهاجمی قارچ در بدن میزبان محسوب می شود که در بیماریزایی گونه های کاندیدا آلبیکنس موثر می باشد (۱ و ۲). به علاوه مطالعات جدیدی بیانگر این است که این پدیده (تولید لوله زایا) یکی از مکانیسمهای فرار قارچ کاندیدا آلبیکنس از سیستم ایمنی سلولی محسوب می شود، زیرا به کمک این مکانیسم این قارچ می تواند بیگانه خواری را مهار و

بعلاوه میزان تولید لوله زایا در شرایط بی هوازی (غلظت CO₂ برابر ۱۰٪) در مقایسه با شرایط هوازی بیشتر بوده است. Cheng و همکاران در مطالعه ای بر روی واکنش کاندیدا آلیکنس در مجاورت بامیزان بالای استروژن میزان نشان دادند که تیترا بالای استروژن می تواند باعث تشدید در سرعت تولید لوله زایا و افزایش طول لوله زایا در این قارچ شود. آنها نشان دادند که تیترا بالای استروژن می تواند باعث تحریک این قارچ به ایجاد واژینیت کاندیدیایی در خانمها شود (۲۱).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر به نظر می رسد که در بدن میزبان هم غلظت بالای گلوکز و کاهش pH باعث تحریک قارچ به تولید لوله زایا در بدن، به خصوص در افراد دیابتی و در نتیجه باعث تشدید ویرولانسی قارچ مشابه با شرایط برون تنی می شود. به همین دلیل کنترل قند خون در بیماران دیابتی در جلوگیری از ابتلا به کاندیدیازیس به طور مؤثر کمک می کند.

تشکر و قدردانی

از آقایان حسین زرینفر و علی جالی که در انجام این تحقیق با بنده همکاری داشته اند تقدیر و تشکر بعمل می آید.

حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، pH برابر ۶/۵ و غلظت ۳۰ mg/ml گلوکز باعث تحریک تولید لوله زایا توسط کاندیدا آلیکنس شد که این افزایش میزان تولید لوله زایا در مقایسه با سایر شرایط از نظر آماری معنی دار بود (P=۰/۰۰۱). تحریک تولید لوله زایا در pH برابر ۶/۵ و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد مشابه با نتایج مطالعات دیگر (۱۶ و ۱۷) بوده، تاثیر غلظت گلوکز که در این مطالعه بررسی شده است، مشابه مطالعه Casanova و همکاران است که در مطالعه آنها از 3-acetyl-D-glucose amine و Hemin به عنوان منبع کربن برای تحریک تولید لوله زایا به کار رفته بود (۱۸). غلظت بالای گلوکز در تحریک تولید لوله زایا در این مطالعه ممکن است نشان دهنده اهمیت بیماریزایی بالای این قارچ در بیماران دیابتی باشد.

در این مطالعه غلظت صفر گلوکز در لوله آزمایش معادل غلظت خون فرد با میزان گلوکز طبیعی (سرم فرد نرمال برای تست استفاده شده)، غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم در هر میلی لیتر در لوله آزمایش به ترتیب معادل میزان غلظت سرمی گلوکز فردی با میزان ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلیگرم در هر دسی لیتر سرم می باشد.

افزایش سرعت در تولید و میزان تولید لوله زایا در غلظتهای بالای گلوکز در مطالعه حاضر ممکن است نشان دهنده بیماریزای شدن این قارچ و افزایش قدرت مهاجمی آن در بیماران دیابتی باشد. بیماری دیابتی از جمله عوامل مستعد کننده و زمینه ساز برای بیماریزای شدن قارچها از جمله کاندیدا بوده و ممکن است باعث بروز علائم بالینی جلدی، جلدی-مخاطی و منتشره کاندیدیازیس در دیابتیها شود (۷، ۱۵).

در مطالعات مشابهی تاثیر تحریک کننده و افزایش یافته میزان تولید لوله زایا با کاندیدا آلیکنس بر عوامل مختلفی مانند همین (Hemin) (۱۸)، داروهای ضد قارچی (۱۹)، بعضی آمینواسیدها (۸) و یک عامل گرفته شده از پلاکت (۲۰) در شرایط برون تنی آزمایش شده و نشان داده شده است. در این مطالعه برای آزمایشهای تولید لوله زایا در شرایط آزمایشگاهی از سرم انسان استفاده شد.

Isibok و همکاران (۱۴) در مطالعه ای نشان دادند که استفاده از سرم انسان برای تست لوله زایا در مقایسه با سرم گاو و گوسفند مفیدتر است.

References

- 1) Warnock DW. *Trends in the epidemiology of invasive fungal infections*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2007;48(1):1-12.
- 2) Galle F, Catania MR, Liguori G. *Nosocomial candida infections: epidemiology of candidaemia*. J Prev Med Hyg. 2006;47(3):119-26
- 3) De Marie S. *New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections 2000*;85(1):88-93.
- 4) Ray D, Goswami R, Dadhwal V, Goswami D, Banerjee U, Kochupillai N. *Prolonged (3-month) mycological cure rate after boric acid suppositories in diabetic women with vulvovaginal candidiasis*. 2007;55(4):374-7. Epub 2007;10.
- 5) Sheng WH, Wang JT, Lin MS, Chang SC. *Risk factors affecting in-hospital mortality in patients with nosocomial infections*. J Formos Med Assoc. 2007;106(2):110-8.
- 6) Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A. *Nosocomial fungal infections: candidemia*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;34(3):213-20
- 7) Calderone, RA. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington D.C. 2002.
- 8) Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. *Study of germ tube formation by Candida albicans after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. 2007;27;88(1):16-20. Epub 2007 . 8.
- 9) Marot-Leblond A, Grimaud L, Nail S, Bouterige S, Apaire-Marchais V, Sullivan DJ, et al. *New monoclonal antibody specific for Candida albicans germ tube*. J Clin Microbiol. 2000 ;38(1):61-7.
- 10) Merson-Davies L, Hopwood V, Robert R, Marot-Leblond A, Senet JM, Odds FC. *Reaction of Candida albicans cells of different morphology index with monoclonal antibodies specific for the hyphal form*. J Med Microbiol. 1991;35(6):321-4
- 11) Hudson DA, Sciascia QL, Sanders RJ, Norris GE, Edwards PJ, Sullivan PA, et al. *Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in Candida albicans*. Microbiology. 2004;150(Pt 9):3041-9
- 12) Ollert MW, and Calderone RA. *A monoclonal antibody that defines a surface antigen on Candida albicans hyphae cross-reacts with yeast cell protoplasts*. 1990;58(3):625-31.
- 13) Torosantucci A, Gomez MJ, Bromuro C, Casalnuovo I, Cassone A. *Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial forms of Candida albicans*. J Med Vet Mycol. 1991;29(6):361-72.
- 14) Isibor JO, Eghubare AE, Omoregie R. *Germ Tube Formation in Candida albicans: Evaluation of Human and Animal Sera and Incubation Atmosphere*. Shiraz E-Medical Journal 2005; 6(1&2). (<http://semj.sums.ac.ir/vol6/jan2005/germtube.htm>).
- 15) Ajello L and Haaay RJ. *Candida species and Blastoshizomyces, Microbiology and Microbial Infections, Ninth edition, Volum 4 (Medical Mycology)*, Arnold 1998, 423-460.
- 16) Buffo J, Herman MA, Soll DR. *A characterization of pH-regulated dimorphism in Candida albicans*. Mycopathologia. 1984;15;85(1-2):21-30.
- 17) Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A. *Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-Candida albicans germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients*. Rev Iberoam Micol. 2006;23(4):209-15.
- 18) Casanova M, Cervera AM, Gozalbo D, Martínez JP. *Hemin induces germ tube formation in Candida albicans*. Infect Immun. 1997;65(10):4360-4.
- 19) Vale-Silva LA, Buchta V, Valentová E. *Effect of subinhibitory concentration of some established and experimental antifungal compounds on the germ tube formation in Candida albicans*. Folia Microbiol (Praha). 2007;52(1):39-43.
- 20) Kennedy MJ, Calderone RA, Cutler JE, Kanabe T, Riesselman MH, Robert R, et al. *Molecular basis of Candida albicans adhesion*. J Med Vet Mycol. 1992;30 Suppl 1:95-122.
- 21) Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. *Cellular and olecular biology of Candida albicans estrogen response*. Eukaryot Cell. 2006;5(1):180-91.