Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Study of Lipase genes expression *(Lip2,3,5)* in *Candida albicans* isolated from patients

Mansoureh Ghaffari[1], Fatemeh Noorbakhsh[1], Reza Kachuei[2]

1. Department of Microbiology, Biological Science College, Varamin-pishva branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran
2. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

Article Information

Article history:
Received: 2017/02/08
Accepted: 2017/05/28
Available online: 2017/06/07

Article Subject:
Medical Mycology

IJMM 2017; 11(2): 53-60

Corresponding author:

Dr. Fatemeh Noorbakhsh

Department of Microbiology, Biological Science College, Varamin-pishva branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran

Tel: 0989122043654

Email:
niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

Abstract

Background and Aims: *Candida*, is a fungal flora in human that can be colonized on the skin and mucosal surfaces. Various factors are involved in causing disease by *candida*, one of the most important of these factors, are secreted hydrolytic enzymes and aspartyl proteinase enzymes are as a potential factor, but other secretion of hydrolytic enzymes such as phospholipase and lipase are also important pathogen factors. In this study, gene expression of *LIP2*, *LIP3* and *LIP5* were studied in isolated *C. albicans* in 100 samples from patients.

Materials and Methods: A total of 100 strains of *C. albicans* was isolated in 2015-2016 years by morphology and molecular methods, from clinical samples. After extracting RNA from them by RNX-Plus kit, expression of *LIP2*, *LIP3* and *LIP5*genes was evaluated by using RT-PCR test.

Results: From 100 clinical isolates of *C. albicans*, *LIP2* gene expressed 55%, *LIP3* gene 41% and *LIP5* gene 48%. Among the positive samples, 24 cases (33.80%) were expressed three genes at the same time.

Conclusions: In this study, frequency of lipase genes was different in strains of *C.albicans*. Lipase gene was not expressed in 30% of cases. It can be concluded that other genes than lipase gene can be involved in the pathogenesis.

KeyWords: *Candida albicans*, Lipase encoding genes, *LIP2*, *LIP3*, *LIP5*, RT-PCR

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Final

How to cite this article:

Ghaffari M, Noorbakhsh M, Kachuei R. Study of Lipase genes expression *(Lip2,3,5)* in *Candida albicans* isolated from patients. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (2): 53-60

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

بررسی بیان ژن‌های کد کننده لیپاز (*Lip2,3,5*) در سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از بیماران

منصوره غفاری[۱]، فاطمه نوربخش[۱]، رضا کچوئی[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۰۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷

موضوع:

قارچ شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(2): 53-60

نویسنده مسئول:

دکتر فاطمه نوربخش

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۲۰۴۳۶۵۴

پست الکترونیک:

niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: *کاندیدا* یکی از فلورهای قارچ در انسان است که می‌تواند در سطوح مخاطی و پوست کلونیزه شود. عوامل مختلفی در ایجاد بیماری توسط *کاندیداها* نقش دارند، یکی از مهم‌ترین فاکتورها، هیدرولازهای ترشحی هستند و آنزیم‌های آسپارتیل پروتئیناز به‌عنوان یک عامل بالقوه می‌باشند، ولی ترشح سایر آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند فسفولیپازها و لیپازها نیز از عوامل مهم بیماری‌زا می‌باشند. در این تحقیق به بررسی بیان ژن‌های *LIP2*، *LIP3* و *LIP5* در *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از بیماران مختلف پرداخته‌شده است.

مواد و روش کار: تعداد ۱۰۰ سویه *کاندیدا آلبیکنس* در طی سال‌های ۹۵-۱۳۹٤ به روش مورفولوژی و مولکولی از نمونه‌های بالینی جداسازی و شناسایی شد. پس از استخراج RNA آن‌ها به روش کیت RNX-Plus و سنتز cDNA، بیان ژن‌های *LIP2*، *LIP3* و *LIP5* با استفاده از تست RT-PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: در ۱۰۰ نمونه مورد آزمایش ژن *LIP2* ۵۵٪، ژن *LIP3* ۴۱٪ و ژن *LIP5* ۴۸٪ بیان شدند. در بین نمونه‌هایی که بیان ژن در آن‌ها مثبت بود، ۲٤ نمونه (۳۳/۸۰٪) هر ۳ ژن را هم‌زمان بیان کردند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، درصد فراوانی ژن‌های لیپاز در سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* متفاوت بود. در ۳۰٪ موارد ژن لیپاز بیان نگردید و می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های دیگری می‌تواند در بیماری‌زایی نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*، ژن‌های کد کننده لیپاز، *LIP2*، *LIP3*، *LIP5*، RT-PCR.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

کاندیدا یک جنس از مخمرها بوده و معمول‌ترین عامل عفونت قارچی در دنیای پزشکی محسوب می‌شود (۱،۲). بسیاری از گونه‌های *کاندیدا* جزو قارچ‌های هم‌سفره بی‌خطر و یا اندوسمبیوز در بدن میزبان ازجمله انسان بوده بااین‌حال، هنگامی‌که دفاع مخاطی یا سیستم ایمنی بدن دچار کاستی شوند، این‌گونه *کاندیدا* می‌تواند با فرصت‌طلبی موجب بیماری شود (۳). *کاندیدا* یکی از فلورهای قارچی طبیعی در انسان است که می‌تواند در سطوح مخاطی و پوست کلونیزه شود و در شرایط خاص میزبان از قبیل نقص سیستم ایمنی توانایی ایجاد بیماری را دارد. کاندیدیازیس، عفونتی است که توسط گونه‌های کاندیدا به‌خصوص *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد می‌شود. گونه‌های کاندیدا چهارمین عامل آلودگی‌های خونی و عامل ۵۰ درصد کاندیدمیا (Candidemia) و عامل ۸۰ درصد کاندیدیازیس اوروفارنژیال (Oropharyngeal Candidiasis) و واژینیت کاندیدایی است (۴-۶). برتری *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) در ایجاد عفونت‌های منتشر شونده خونی و موکوسی نشان‌دهنده وجود عوامل بیماری‌زای متفاوت در مقایسه با دیگرگونه‌های کاندیدا است (۴-۶). در طی دو دهه اخیر به دلیل استفاده وسیع از

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

آنتی‌بیوتیک‌ها، استروئیدها و سایر داروهای سرکوبگر ایمنی، فراوانی و شدت این عفونت‌ها افزایش چشمگیری یافته است (۷). امروزه بیماری کاندیدیازیس به‌عنوان یک مشکل مهم به‌خصوص در بیماران بستری در بیمارستان‌ها قلمداد می‌شود و از دو دهه گذشته با شیوع بیماری ایدز، بدخیمی‌ها و افراد ایمونو ساپرس، روزبه‌روز بر شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی سمی *کاندیدایی* خصوصاً با عوامل غیر *آلبیکنس* افزوده‌شده است (۸). فاکتورهای متعددی در آلوده کردن میزبان توسط گونه‌های *کاندیدا*، دخالت دارند که ازجمله تغییر مورفولوژیکی بین اشکال مخمر و هیف، چسبندگی و هجوم به سطح سلول، تیگموتروپیسم، تشکیل بیوفیلم، تعویض فنوتیپی و ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک به‌عنوان فاکتورهای بیماری‌زایی در *کاندیدا* معرفی می‌شوند (۹). ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند لیپاز ها و پروتئینازها می‌تواند بر بیماری‌زایی *کاندیدا آلبیکنس* مؤثر باشد. اگرچه ترشح آسپارتیل پروتئیناز (*Sap1-Sap10*) به‌عنوان یک عامل تعیین‌کننده بیماری‌زا در *کاندیدا آلبیکنس* نشان داده‌شده است، اما اطلاعات محدودی در رابطه با نقش لیپازها در عفونت کاندیدا در دسترس است (۱۰). لیپازهای ترشح‌شده *کاندیدا آلبیکنس* توسط یک خانواده ژنی با حداقل ۱۰ عضو (*LIP1-LIP10*) کدگذاری می‌شوند (۱۱).

با توجه به اینکه یکی از فاکتورهای مهم بیماری‌زا در *کاندیدا آلبیکنس* ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشد، و از میان این دسته از آنزیم‌ها، لیپاز ها کمتر موردمطالعه و بررسی قرارگرفته‌اند، در این تحقیق سعی شده است به بررسی نقش لیپاز ها در بیماری‌زایی *کاندیدا آلبیکنس* پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در اسفندماه سال ۱۳۹۴ شروع و پس از گذشت ۳ ماه در خردادماه ۱۳۹۵ در آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی تهران به پایان رسید. در میان سویه‌های متعدد کاندیدا به‌صورت تصادفی تعداد ۱۰۰ نمونه از نمونه‌های بالینی مشکوک به کاندیدا *آلبیکنس* جداشده از نمونه‌های خلط، تراشه، زیر بغل، واژن، کشاله ران، BAL (بال)، ناخن، بین انگشتان، مننژ و ادرار از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی درمانی شهر تهران تهیه گردید و کشت آن‌ها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (ساخت شرکت Merck آلمان) صورت گرفت. و سپس جهت رشد و تشکیل کلنی در دستگاه انکوباتور شرکت Pars Azma (ایران) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت‌زمان ۴۸-۲۴ ساعت قرار گرفتند.

شناسایی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*

به‌منظور تأیید نوع سویه‌های کاندیدای شناسایی‌شده از دو تست کشت در محیط کروم آگار و تکنیک PCR-RFLP استفاده گردید. ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت مربوطه ساخت شرکت Cinagene (ایران) انجام شد و سپس با استفاده از پرایمرهای یونیورسال *ITS1* و *ITS4* ساخت همان شرکت تست PCR انجام گردید و درنهایت در تست PCR-RFLP از آنزیم محدود محدودالاثر MSP1 ساخت شرکت Cinagene استفاده گردید که این آنزیم الگوهای برش خاص هرگونه را ارائه می‌دهد (۱۲). همچنین جهت تشخیص با روش فنوتیپی نمونه‌های جداشده بر روی محیط کشت کاندیدا کروم آگار ساخت شرکت Merck کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از کشت نمونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* و تشکیل کلنی بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار، استخراج RNA انجام شد. ابتدا با استفاده از دستگاه هموژنایزر و سپس گریندر (ساخت ژاپن) دیواره قارچ تخریب شد و سپس با استفاده از کیت RNX-PLUS ساخت شرکت سیناژن RNA استخراج شد. با اطمینان یافتن از خالص بودن RNA، سنتز cDNA از روی آن بر طبق کیت ساخت شرکت Vivantis (آلمان) و بر اساس دستورالعمل آن صورت گرفت.

انجام RT-PCR

برای بررسی بیان ژن لیپاز در *کاندیدا آلبیکنس*، از پرایمرهای *LIP2*، *LIP3*، *LIP5* از مقاله استفاده شد (۱۳) و سپس با استفاده از نرم‌افزار Blast در NCBI صحت آن موردبررسی قرار گرفت و سپس جهت ساخت به شرکت سیناژن سفارش داده شد. توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورداستفاده در جدول ۱ نشان داده‌شده است.

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

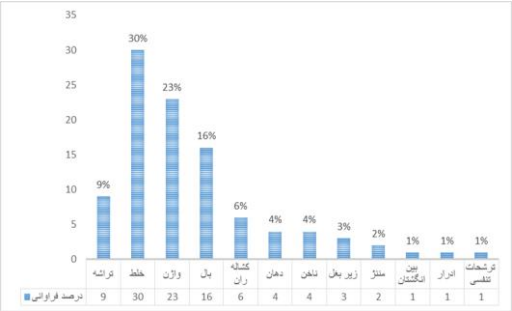
جدول ۱: توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای *LIP2*، *LIP3*، *LIP5*

پرایمر	توالی	اندازه باند
LIP2-S	5′-GCTGAAAATTGTTTGGCTG-3′	۴۵۰ جفت باز
LIP2-AS	5′-GGAAGTACAGGTGAGTAG-3′	
LIP3-S	5′-TCTTGTGGATGACTTCTAC-3′	۵۰۱ جفت باز
LIP3-AS	5′-AGCAACTTGGGCATCATC-3′	
LIP5-S	5′-GTGTTTGAGGAATTTGATG-3′	۳۶۲ جفت باز
LIP5-AS	5′-ATAGCTTCAGTGAGGTGAC-3′	

پس از سنتز cDNA، جهت بررسی بیان ژن‌های *LIP2*، *LIP3*، *LIP5* تست RT-PCR انجام شد، مواد مورداستفاده شامل ۱۲/۵ Master Mix (Tris HCl با غلظت ۵ میلی مول، mgcl2 با غلظت ۲ میلی مول،dNTP با غلظت ۰/۲ میلی مول، آنزیم Taq DNA Polymerase با غلظت ۱ واحد)، پرایمرهای سنس و آنتی سنس هر یک ۱۰ میکرو مول، cDNA ۱ نانوگرم و آب مقطر استریل ۴/۵ میکرولیتر بود و در ۳۵ سیکل حرارتی شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۵۰ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بدین‌صورت که این ژن‌ها توسط پرایمرهای طراحی‌شده تکثیر یافتند و محصولات حاصل از عمل PCR الکتروفورز شدند.

یافته‌ها

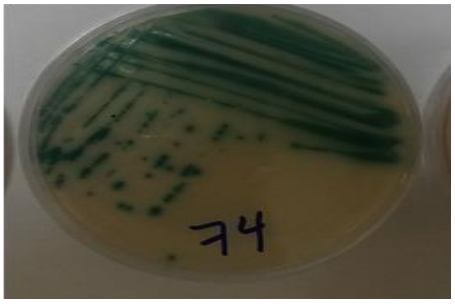
در این مطالعه نمونه‌های بالینی جداشده از واژن (۲۳ نمونه)، خلط (۳۰ نمونه)، بال (۱۶ نمونه)، تراشه (۹ نمونه)، دهان (۴ نمونه)، ناخن (۴ نمونه)، بین انگشتان (۱ نمونه)، کشاله ران (۶ نمونه)، زیر بغل (۳ نمونه)، ادرار (۱ نمونه)، ترشحات (۱ نمونه) و مننژیت (۲ نمونه) بودند (نمودار ۱)، ۵۶ مورد از نمونه‌های جداشده از بیماران مربوط به زنان و ۴۴ مورد مربوط به بیماران مرد بود.



نمودار ۱: درصد فراوانی سویه‌های کاندیدا آلبیکنس موردبررسی

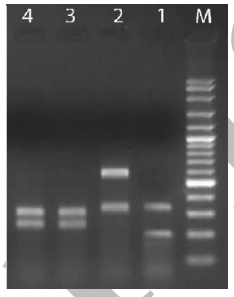
نتایج تشخیص *کاندیدا آلبیکنس*

رنگ کلنی گونه *کاندیدا آلبیکنس* بر روی محیط کروم آگار سبز روشن بود (شکل ۱).



شکل ۱: کلنی سبز *کاندیدا آلبیکنس* رشد یافته بر روی محیط کروم آگار

سویه‌های کاندیدا آلبیکنس پس از تکثیر توسط پرایمرهای *ITS1* و *ITS4* باندی به‌اندازه ۵۰۰ جفت باز و پس از برش توسط آنزیم MSP1 باندهایی با سایز ۲۹۷ و ۲۳۸ جفت باز تشکیل دادند (شکل ۲).

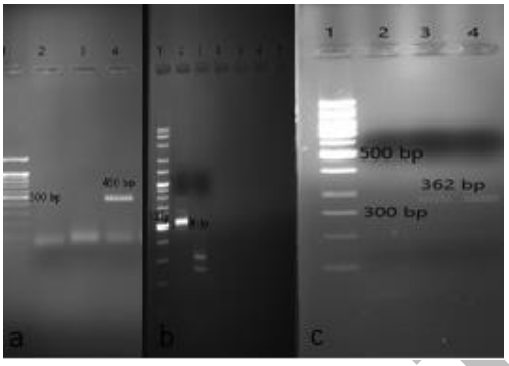


شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR-RFLP گونه‌های کاندیدا: lane1: کاندیدا تروپیکالیس، lane2: کاندیدا گلابراتا، lane3: کاندیدا آلبیکنس

نتایج الکتروفورز محصولات RT-PCR

درنتیجه بیان ژن *LIP2*، *LIP3* و *LIP5* به ترتیب باندهایی با اندازه ۴۵۰، ۵۰۱ و ۳۶۲ جفت باز (bp) تشکیل شدند (شکل ۳).

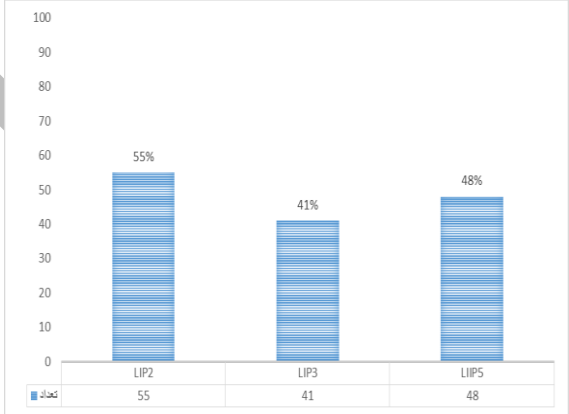
Final Proof



شکل ۳: بیان ژن a: *LIP2*، b: *LIP3* و c: *LIP5* در نمونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* موردمطالعه

مقایسه بیان هر سه ژن *LIP*

به‌طورکلی از ۱۰۰ نمونه موردبررسی، در ۷۱ نمونه بیان ژن مشاهده شد و در ۲۹ مورد هیچ بیان ژنی صورت نگرفت. در ۵۵ مورد ژن *LIP2*، ۴۱ مورد ژن *LIP3* و ۴۸ مورد ژن *LIP5* بیان شدند (نمودار ۲).



نمودار ۲: درصد فراوانی ژن‌های *LIP* در نمونه‌های موردبررسی

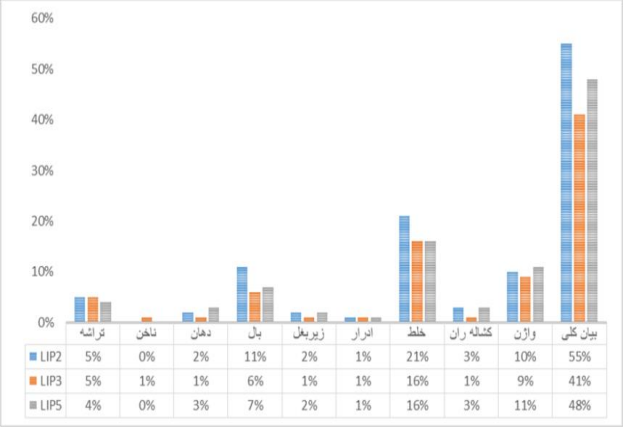
در ۲۴ نمونه (۳۳/۸۰٪) هر ۳ ژن *LIP* به‌طور هم‌زمان بیان شدند. ژن‌های *LIP* 2,3 در ۳۳ نمونه (۴۶/۴۷٪)، ژن‌های *LIP2,5* در ۳۴ نمونه (۴۷/۸۸٪) و ژن‌های *LIP3,5* در ۲۹ نمونه (۴۰/۸۴٪) بیان مشترک داشتند. در ۱۱ نمونه (۱۶/۹۰٪) فقط ژن *LIP2*، در ۳ نمونه (۴/۲۲٪) فقط ژن *LIP3* و در ۶ نمونه (۸/۴۵٪) فقط ژن *LIP5* بیان‌شده است. در ۲۴ نمونه بالینی هر سه ژن به‌طور هم‌زمان بیان شدند و بیشترین نمونه‌ها مربوط به نمونه‌های خلط بوده است که در ۱۱ مورد (۳۶/۶۶٪) بیان مشترک داشتند.

بیشترین نمونه‌هایی که دو ژن *LIP2* و *LIP3* در آن‌ها مثبت بوده مربوط به نمونه خلط می‌باشد که در ۱۴ نمونه (۴۲/۴۲٪) خلط این دو ژن بیان مثبت داشتند.

بیشترین نمونه‌هایی که دو ژن *LIP2* و *LIP5* در آن‌ها مثبت بوده مربوط به نمونه خلط می‌باشد که در ۱۶ نمونه خلط (۴۷/۰۵٪) این دو ژن بیان مثبت داشتند.

بیشترین نمونه‌هایی که دو ژن *LIP3* و *LIP5* در آن‌ها مثبت بوده مربوط به نمونه خلط می‌باشد که در ۱۲ نمونه خلط (۴۱/۳۷٪) این دو ژن بیان مثبت داشتند.

بیان ژن *LIP2* در نمونه‌های بالینی بیشتر از دو ژن دیگر است که نشان می‌دهد بیشتر از دو ژن دیگر در بیماری‌زایی نقش دارد، همچنین مطابق نمودار فراوانی بیان سه ژن ۳۳/۸۰٪ بود و بیشترین فراوانی بیان هم‌زمان دو ژن *LIP2* و *LIP5* بود که بیشترین موارد در نمونه‌های خلط مشاهده شد (نمودار ۳).



نمودار ۳: نمودار بیان کلی ژن‌ها در نمونه‌های بالینی

بحث

امروزه قارچ‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب ازجمله عفونت‌های تهدیدکننده زندگی در بیماران نقص سیستم ایمنی می‌باشند. مخمرها و در رأس آن‌ها گونه‌های *کاندیدا* معمول‌ترین قارچ‌هایی هستند که از عفونت‌های انسانی جدا می‌شوند (۱۴). *کاندیدا*، پاتوژن فرصت‌طلبی است که قادر به ایجاد بیماری در افراد دارای نقص ایمنی و یا ایمنی تضعیف‌شده می‌باشد. کاندیدیازیس، عفونتی است که توسط گونه‌های مختلف کاندیدایی، به‌خصوص *کاندیدا آلبیکنس*، ایجاد می‌شود (۱۵). در مطالعات متعددی محققان با استفاده از روش مولکولی به شناسایی گونه‌های مهم بیماری‌زای *کاندیدایی* در مبتلایان به کاندیدیازیس حاد،

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

Final Proof

ولوواژینیت، عفونت قارچی خون، کاندیدمیا، کاندیدوری و تراشه ناخن پرداختند و عامل اغلب موارد عفونت را مخمر *کاندیدا آلبیکنس* گزارش نمودند (۲۱-۱۶).

در این مطالعه نیز با روش PCR-RFLP و کشت در محیط کروم آگار شناسایی *کاندیدا آلبیکنس* در نمونه‌های بالینی انجام شد. مطابق با تحقیقات سایر محققان *کاندیدا آلبیکنس* به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب بوده که از عفونت‌های مختلف قابل جداسازی می‌باشد. بیشترین نمونه‌هایی بالینی آلوده به *کاندیدا آلبیکنس* شامل خلط، واژن و بال (برونونکوآلوئولار لاواژ) بود و سایر نمونه‌ها (ادرار، کشاله ران، مننژ، زیر بغل، ناخن و دهان) از آلودگی کمتری برخوردار بود.

نقش پروتئازهای آسپارتیل و فسفولیپاز B به‌طور گسترده درطی عفونت *کاندیدا آلبیکنس* موردبررسی قرارگرفته است (۲۲،۲۳)، اما نقش سایر آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند لیپازها کمتر موردبررسی قرارگرفته است. لیپازهای *کاندیدا آلبیکنس* توسط یک خانواده ژنی با حداقل ۱۰ عضو (*LIP1-LIP10*) کدگذاری می‌شوند، بیان ژن خانواده لیپاز در محیط‌های کشت مختلف در سطح mRNA به‌طور متفاوتی تنظیم می‌گردد (۱۱).

فعالیت لیپازهای ترشحی در *کاندیدا آلبیکنس* اولین بار توسط Fu و همکارانش در سال ۱۹۹۷ بررسی شد. آن‌ها در این بررسی ژن *LIP1* مخمر *کاندیدا آلبیکنس* را در *ساکارومیسس سرویزیه* کلون و شناسایی کردند. تا آن زمان نقش لیپاز در بیماری‌زایی عفونت‌های کاندیدایی ناشناخته بود، Fu و همکارانش نشان دادند کلون‌های *ساکارومیسس* بر روی سوبسترای تری گلیسیرید فعالیت لیپولیتیک دارد که مربوط به فسفولیپاز نبود بلکه ژن کدکننده پروتئینی با فعالیت لیپازی بود (۲۴). Ogawa و همکارانش گزارشی دادند مبنی بر اینکه گونه‌هایی که بیماری‌زایی بیشتری داشتند مانند *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با گونه‌هایی که کمتر بیماری‌زا بودند، دارای سطح بالاتری از فعالیت لیپاز هستند (۲۵).

بررسی بیان ژن‌های خانواده لیپاز در عفونت تجربی، نشان داد بیان این ژن وابسته به مرحله عفونت‌زایی و نوع بافت آلوده‌شده در مدل تجربی کاندیدیازیس است. به‌طوری‌که ژن‌های *LIP5* و *LIP8* عمدتاً در سلول‌های کبدی و کلیه و *LIP2* و *LIP9* تنها در مرحله آخر عفونت پوست مصنوعی بیان می‌گردند، با مقایسه مرحله اولیه عفونت تا مرحله نهایی عفونت در کلیه، مشخص شد تفاوت‌هایی در بیان ژن لیپاز وجود دارد که این موضوع نشان‌دهنده این است که بیان ژن‌های لیپاز به مرحله عفونت بستگی دارد (۲۶).

بیان بیش‌ازحد بعضی از ژن‌های آنزیمی مسئول ویرولانس *کاندیدا*، ممکن است در ایجاد مقاومت به فلوکونازول نیز نقش داشته باشند، به‌طوری‌که در جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* حساس به فلوکونازول *LIP8* بیان متوسطی داشته درحالی‌که در جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول بیان این ژن بیشتر بود و بررسی میزان بیان ژن لیپاز در عفونت‌زایی *کاندیدا آلبیکنس* در حالات بالینی مختلف به شکل تجربی نشان‌دهنده این است که افزایش میزان بیان ژن لیپاز در مرحله عفونت‌زایی این مخمر نقش آن را در بیماری‌زایی بیشتر نشان می‌دهد (۲۷).

در مطالعه‌ای که Gacser و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام دادند بیان ده نوع لیپاز تولیدشده توسط گونه‌های *کاندیدا* به روش RT-PCR گزارش گردید و این آنزیم نقش مهمی در بیماری‌زایی داشته و به‌عنوان فاکتور حدت کاندیدا بوده و بیان ژنی بسیار بالا در مطالعات مولکولی داشته است (۱۰). همچنین Lan و همکاران نشان دادند که بیان بیش‌ازحد ژن لیپاز ۵ در بیماری‌زایی *کاندیدا آلبیکنس* نقش دارد (۲۸). درحالی‌که Hamari از سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* وحشی آزمایشگاهی و سویه‌های جهش‌یافته حذفی هتروزیگوت و هموزیگوت استفاده کرد و نشان داد حذف *LIP5* هیچ تأثیری بر روی فیزیولوژی یا قدرت عفونت‌زایی *کاندیدا آلبیکنس* در محیط تجربی ندارد (۲۹). ژن‌های *LIP1,LIP4* در *کاندیدا تروپیکالیس* به‌عنوان ژن‌های ویرولانس مهمی هستند، ولی بیان متفاوتی در مراحل پلانکتونیک و تشکیل بیوفیلم دارند و هیچ نقشی در اتصال کاندیدا به سطح سلول ایفا نمی‌کنند (۳۰).

Park و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی نقش آنزیم‌های هیدرولیتیک در بیماری‌زایی قارچ‌های پاتوژن انسانی *کاندیدا آلبیکنس*، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و مالاسزیا پرداختند. آن‌ها در این مطالعه نشان دادند که ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند فسفولیپازها و لیپازها، از میان سایر عوامل، به‌عنوان یک عامل مهم بیماری‌زایی قارچ شناخته‌شده است (۳۱)، همچنین نشان داده شد که ترشح لیپاز خارج سلولی در *کاندیدا پاراپسیلوزیس* نقش مهمی در بیماری‌زایی دارد و عدم ترشح این آنزیم موجب کاهش بقا در فاگوسیت ها، عدم تخریب بافت و کاهش بیماری‌زایی در مقایسه با تیپ وحشی می‌گردد (۳۲).

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

Final Proof

مطالعه حاضر نیز بیان ژن‌های *LIP2*، *LIP3* و *LIP5* که باعث ترشح آنزیم لیپاز می‌شوند را با توجه به بیان ژنی بالا (۷۱٪) به‌عنوان یکی از فاکتورهای بیماری‌زای *کاندیدا آلبیکنس* معرفی کرده است و بین سه ژن موردمطالعه بیان ژن *LIP2* بالاترین میزان مشاهده شد که نشان‌دهنده اهمیت این ژن در ترشح آنزیم لیپاز می‌باشد.

در این مطالعه میزان بیان ژن‌ها به مقدار بالاتری در نمونه‌های خلط و سپس در واژن مشاهده شدند که با توجه به میزان بالاتر نمونه‌های بالینی موردمطالعه ارتباط بین بیماری‌زایی این مخمر را با ترشح لیپاز نشان می‌دهد و همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود بیان دو ژن *LIP2* و *LIP5* در اکثر نمونه‌های موردمطالعه بالاتر بود که احتمالاً به دلیل اهمیت بیشتر این دو ژن در پاتوژنز می‌باشد. در این مطالعه ژن *LIP2* در *مخمرهای جداشده از* خلط و بال بیان بیشتری را نسبت به دو ژن دیگر داشتند که با توجه به اینکه نمونه‌های دستگاه تنفسی هستند به نظر می‌رسد احتمالاً به‌عنوان ویرولانس مهم‌تری مطرح باشد. همان‌طوری که در بالا ذکر شد به‌طورکلی بیان سه ژن لیپاز در نمونه‌های بالینی به میزان بالایی حدود ۷۱٪ مشاهده شد، بنابر ژن‌های لیپاز به‌عنوان یک عامل ویرولانس نقش مهمی در پاتوژنز عفونت *کاندیدا آلبیکنس* دارد.

هدف از این مطالعه بررسی فراوانی بیان ژن‌های *LIP* می‌باشد. نتایج نشان داد که به‌طورکلی در ۷۱ نمونه ژن‌های *LIP* بیان گردید. بنابراین میزان فراوانی این ژن نسبتاً بالاست. در حدود یک‌چهارم از نمونه‌های موردبررسی هر سه ژن به‌طور هم‌زمان بیان شدند و در ۲۹ تا ۳۴ درصد موارد دو ژن با یکدیگر بیان شدند درحالی‌که فراوانی بیان یک ژن به‌تنهایی بسیار کمتر مشاهده شد، که نشان می‌دهد برای ترشح آنزیم لیپاز محصول چندین ژن با یکدیگر همکاری می‌کنند. *کاندیدا آلبیکنس* می‌تواند نقاط مختلف بدن را آلوده کند و این میکروارگانیسم در پاسخ به ایمنی بدن و شرایط محیطی بیان ژن‌هایش را تغییر می‌دهد، درنتیجه بیان ژن *LIP* به نوع عفونت بستگی دارد. این مطالعه فقط بر روی بیان سه ژن انجام‌شده و همان‌طور که می‌دانیم ده ژن در ترشح این آنزیم شرکت دارند که با مطالعات بیشتر باید نقش و ارتباط آن‌ها با یکدیگر و پاتوژنز عفونت موردمطالعه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از زحمات کلیه پرسنل آزمایشگاه بیولوژی مولکولی قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که ما را مورد لطف قرار داده و در انجام این پروژه همکاری نموده صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایم.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Manolakaki D, Velmahos G, Kourkoumpetis T, Chang Y, Alam HB, De Moya MM,; et al. Candida infection and colonization among trauma patients. Virulence. 2010; 1 (5): 367–375.
2. Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on Candida Albicans. Chin. J. Integr. Med. 2015; 23(3): 201-207.
3. Kourkoumpetis T, Velmahos G, Ziakas PD, Tampakakis E, Manolakaki D, Coleman JJ, et al. The effect of cumulative length of hospital stay on the antifungal resistance of Candida strains isolated from critically ill surgical patients. Mycopathologia.2011; 171(2): 85-91.
4. Bauters TG, Dhont MA, Temmerman MI, Nelis HJ. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. Am J Obstet Gynecol.2002; 187(3): 569-74.
5. Boatto HF, Moraes MSD, Machado AP. Relationship of laboratory results with clinical signs and symptoms of patients with vulvovaginal candidiasis and the significance of the sexual partners for the maintenance of the infection. Rev Bras Ginecol Obstet.2007; 29(2): 80-4.
6. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin. Infect. Dis.2009; 48(12):1695-1703.
7. Reise E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D C, ebeaupuis J P, et al. 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med Mycol. 36 (Suppl.1): 249-25.
8. Yun-liang Y, Shu-Ying L, Hsiao-Hsu C, Hsiu-jung L. Tsary H. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of Candida species from 1990 to 2002 in Taiwan. BMC Infect Dis.2005; (5)99:1-5.

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 4:22 +0430 on Saturday August 19th 2017

9. yun- liangY.Virulence factors of candida species, J Microbiol Immunol Infect.2003; 36(4);223-8.

10. Gacser A, Stehr F, Kroger C, Kredics L, Schafer W and Nosanchk JD. Lipase 8 affects the pathogenesis of Candida albicans. Infect Immun.2007; 75(10):4710-18.

11. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schkfer W. Secreted lipases of Candida albicans: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members**.** Arch. Microbiol.2000;174:362-374.

12. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2006;47(3):225-9.

13. Schofield DA, Westwater C, Warner T, Balish E. Differential Candida albicans lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 244(2):359-365.

14. Neppelenbroek KH, Campanha NH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Seó RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting Methods for discrimination between C.albicans and C. dubliniensis. Oral Dis. 2006; 12(3): 242-53.

15. Bodey GP, AnaissieEy, Edwards JE. Definition of Candida infection - In: Bedey GP, ed. Candidiasis: pathogenesis,Diagnosis, and Treatment. New York, Raven Press.1993; 407-408.

16. Skandari A, Mesbahnaming AR,Yadgari MH. Identification of important pathogenic yeast Candida species in acute candidiasis using PCR. Trauma Monthly.2008; Volume 13 (2); 115 - 123.

17. Mohammadi R, Nazeri M, Mesdaghinia E, Mirhendi H. Identification of Candida Species among Patients with Vulvovaginal Candidiasis in Kashan by PCR-RFLP Method. Journal of Isfahan Medical School.2012; 29 (165):p1[in Persian]

18. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol. 1997; Jun;35(6):1353-60.

19. Pakshir K, Moghadami M, Emami M, Kordbacheh P. Prevalence and identification of etiological agents of funguria in foley catheterized patients. Journal of Medical Research (JMR) 2004; 2(3):33-41. [in Persian]

20. Karami A, Jozepanahi M, Mobaien AR, Ahadi S. Frequency of Candiduria in patients Hospitalized in Intensive Care Units. Journal of Kerman University of Medical Sciences (Kmus journa)l. 1390; 18(3): 228-234. [in Persian]

21. Hashemi J,Zaini F, Charsizadeh A, DaieGhazvini R, GeramiShoar M. Prevalence of candida and non-candida yeasts isolated from patients with yeast fungal infections in Tehran labs. Tehran Univ Med J. 2011; 69 (1):55-62. [in Persian]

22. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B.. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis**.** Microbiol Mol Biol Rev.2003; 67(3):400-428.

23. Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices**.** Clin Microbiol Rev.2004; 17(2):255-267.

24. FuY, Ibrahim AS, Fonzi W, Zhou X, Ramos CF, Ghannoum MA. Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast Candida albicans. Microbiology. 1997; 143(2):331-340.

25. Ogawa H, Nozawa Y, Rojanavanich V, Tsuboi R, Yoshiike T, Banno Y, et al. Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infections. J Med Vet Mycol.1992; 30(1), 189-196.

26. Stehr F, Felk A, Gacser A, Kretschmar M, Mkhnss B, Neuber K, et al. Expression analysis of the Candida albicans lipase gene family during experimental infections and in patient samples**.** FEMS Yeast Res. 2004; 4(4-5):401-408.

27. NasrollahiOmran 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. Medical Laboratory Journal. 2015; 8 (5):90-96. [in Persian]

28. Lan DM, Yang N, Wang WK, Shen YF, Yang B, Wang YH. A Novel Cold-Active Lipase from Candida albicans:Cloning, Expression and Characterization of the Recombinant Enzyme. Int J Mol Sci. 2011; 12(6): 3950-65.

29. Hamari Z, Tóth A, Pintér L, Németh T, Horváth P, Ambrus V, et al. Investigation of the role of Lip5 – a member of the secreted lipase gene family – in the virulence of Candida albicans. Acta Biologica Szegediensis. 2013; 57(1):25-30.

30. Yu S, Li W, Liu X, Che J, Wu Y , Lu J. Distinct expression levels of ALS, LIP,and SAP genes in Candida tropicalis with diverse virulent activities Front.microbiol. 2016;7:1175.

31. Park M, Do E, Jung WH. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. Mycobiology.2013; 41(2):67-72.

32. Toth R, Toth A, Vagvölgyi C, Gacser A. Candida parapsilosis Secreted Lipase as an Important Virulence Factor. Current Protein and Peptide Science, 2017, 18, 1-7.

Final Proof