جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۴
صفحات: ۱۹۱ – ۲۰۰

فعالیت استرازی در کاندیدا آلبیکنس و برخی از خصوصیات آن

مجید ریاضی پور* Ph.D. ، علیرضا خسروی Ph.D. ، لطیف موسوی*** Ph.D.**
عباس لطفی** Ph.D.**

چکیــده

هدف: بررسی فعالیت استرازی کاندیدا آلبیکنس در شرایط مختلف و تعیین برخی از خصوصیات آن به منظور تعیین شرایط اپتیمم برای این فعالیت آنزیمی بوده است.

روش بررسی: یک استرین کاندیدا آلبیکنس با کشت در شرایط مختلف تکثیر، با استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای خرد و دیواره سلولی و مایع سیتوپلاسمی آن تفکیک گردید. فعالیت استرازی مایع رویی محیط کشت، دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی با استفاده از یک روش رنگ سنجی با به کار بردن معرف فست ویوله B اندازه‌گیری شد. سپس تاثیر برخی از متغییرها بر این فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و شرایط اپتیمم آن تعیین گردید.

یافته‌ها: مایع سیتوپلاسمی سلول‌های کاندیدا آلبیکنس پس از رشد در محیط Yeast Peptone Glucose (YPG) فعالیت استرازی نشان داد که دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، pH ۷٫۵ ، بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و زمان واکنش ۹۰ دقیقه شرایط اپتیمم برای فعالیت آن را فراهم کرد. حداکثر این فعالیت در برابر آلفا نفتیل استات و به دنبال آن بتا نفتیل استات مشاهده شد و با افزایش تعداد کربن سوبسترا فعالیت آنزیمی به ترتیب در برابر آلفا نفتیل کاپریلات، آلفا نفتیل لائورات و آلفا نفتیل پالمیتات کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: کاندیدا آلبیکنس دارای نوعی فعالیت استرازی است که محیط القاء کننده لیپاز تاثیری بر بیان آن ندارد، مقدار آن در عصاره محیط کشت غیر قابل اندازه‌گیری، در دیواره سلولی ناچیز و در عصاره سیتوپلاسمی به حداکثر می‌رسد. مطالعه بیشتر این فعالیت آنزیمی به عنوان ابزار تشخیصی یا هدف درمانی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، فعالیت آنزیمی، استراز

مقــدمــه

تعداد افراد مستعد به عفونت‌های فرصت‌طلب همچون کاندیدیازیس در سال‌های اخیر بطور قابل توجهی افزایش یافته است. برخی از بیماران در معرض خطر عبارتند از افراد تحت درمان برای کانسر، بیماران دریافت کننده پیوند و مبتلایان به ایدز، اگرچه عملکرد ضعیف ایمنی میزبان

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۱۲/۱۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۸۴/۷/۵
* استادیار گروه میکروبیولوژی – دانشکده پزشکی – دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...«عج» – تهران ـایران
گروه قارچ‌شناسی – دانشکده دامپزشکی – دانشگاه تهران * گروه علوم‌زیستی – دانشکده علوم – دانشگاه امام حسین «ع»
**** گروه بیوشیمی – دانشکده پزشکی – دانشگاه تربیت مدرس
آدرس پست الکترونیکی: Riazipoor@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شایع‌ترین علت عفونت‌های شدید کاندیدا به حساب می‌آید اما این قارچ هم باید صفاتی داشته باشد که تبدیل آن از کومنسال بی‌خطر به یک پاتوژن مهاجم را تسهیل کند. (۱) مطالعه آنزیم‌های کاندیدا آلبیکنس با اهداف مختلف دنبال شده است که مهمترین آنها بررسی نقش آنزیم‌ها بعنوان فاکتور ویرولانس در این قارچ بوده است. (۲-۷) همچنین به آنزیمهای ک.آلبیکنس بعنوان ابزاری برای شناسایی گونه یا استرین (۸-۱۰) و نیز بعنوان روشی برای تایپ کردن زیر گونه‌های این قارچ توجه شده است. (۱۱-۱۴) برخی از آنزیم‌های ک.آلبیکنس بعنوان عامل ویرولانس مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند. بنظر می‌رسد آندسته از آنزیم‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند که در سایر میکروارگانیزم‌ها از جمله برخی از دیگر قارچ‌ها، باکتریها و انگل‌ها بعنوان فاکتور ویرولانس شناخته شده‌اند و به جستجوی آنزیم‌های اختصاصی این ارگانیزم کمتر توجه شده است. وابستگی تغذیه و حیات قارچ‌ها به آنزیم‌های ترشحی، توجه محققین را بیشتر به این نوع آنزیم‌ها معطوف کرده است اما تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که آنزیمهای داخل سلولی کاندیدا آلبیکنس نیز در بیماری‌زایی این قارچ موثر هستند و ممکن است هدف قرار دادن مسیر متابولیسم این آنزیم‌ها روشی امید بخش برای درمان کاندیدیازیس باشد. (۲، ۴، ۷) استرازها (EC ۳،۱،۱،۱) و لیپازها (EC ۳،۱،۱،۳) می‌توانند هیدرولیز باندهای استری تری گلیسرول‌ها را کاتالیز کنند. تفاوت اساسی بین استرازها و لیپازها اختلاف توانایی آنها در عمل کردن بر روی سوبستراهای محلول است. لیپازها باندهای استری در حد فاصل بین فاز نامحلول تری گلیسرول و فاز مایعی که آنزیم در آن حل شده است را هیدرولیز می‌کنند. در مقابل استرازها بر روی سوبستراهای محلول عمل می‌کنند. (۱) به عبارت دیگر استرازها استرهای کربوکسیلیک محلول و لیپازها استرهای کربوکسیلیک نامحلول را هیدرولیز می‌کنند.

تجربه ما نشان داد که مایع سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس دارای نوعی فعالیت استرازی است که گزارشی در مورد آن منتشر نشده است. در این مطالعه برخی از خصوصیات این فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت تا شرایط اپتیمم برای کارکرد مطلوب آن تعیین و امکان بکارگیری این اطلاعات در مطالعات بعدی فراهم شود.

روش بررسی

کاندیدا آلبیکنس . مخمر مورد مطالعه از گروه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد و هویت آن با استفاده از تست تشکیل لوله زایا (Germ tube formation test) و تست تولید کلامیدوکنیدی (Chlamidoconidia production test) ، مورد تائید قرار گرفت. (۱۶)

کشت . برای تهیه سلول تازه، ایزوله ک.آلبیکنس بر روی پلیت سابورو دکستروز آگار استریک و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از ۴۸ ساعت سلول‌های رشد یافته جمع‌آوری، سه بار شستشو، و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سوسپانسیون شد. سپس سلول‌های تازه به تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر به ارلن‌های یک لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط‌های زیر اضافه و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه بمدت ۷۲ سا عت انکوبه شد (سه ارلن برای هر محیط کشت).

محیط YNB-Tween ۸۰. یست نیتروژن بیس (Yeast Nitrogen Base) ۷ گرم، توئین ۸۰ به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر، آب مقطر تا حجم یک لیتر، pH ۷ علاوه بر آن، غلظت‌های مختلف توئین ۸۰ (از ۰/۱ تا ۳ درصد) و pH های مختلف (از ۴ تا ۸) آزمایش شد. (۱۵) همچنین توئین‌های ۲۰،۴۰،۶۰ و ۶۵ با غلظت‌های مختلف و در pHهای مختلف برای بررسی امکان القای استرازها مورد آزمایش قرار گرفت.

محیط YPG . عصاره مخمر ۱۰ گرم، پپتون ۲۰ گرم، گلوکز

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲۰ گرم، آب مقطرتا حجم یک لیتر، pH ۷

جمع‌آوری سلولها. در ساعتهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از انکوباسیون، یک ارلن از هر محیط کشت برداشت و سلول‌های آن با استفاده از سانتریفیوژ (g ۵۰۰ ، ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری و با بافر فسفات ۱۰ میلی مولار ، pH ۷/۵ سه بار شستشو شده و مایع رویی محیط کشت نیز تا استفاده بعدی در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شد.

شکستن سلول‌ها . برای خرد کردن سلولهای کاندیدا آلبیکنس با کمی تغییر از روش سایش با پرلهای شیشه‌ای(glass perlen) استفاده شد. (۱۷) برای این کار، سلولهای شسته شده، پرل‌های شیشه‌ای به قطر ۰/۵ میلی‌متر و بافر شکننده (Breaking buffer) (تریس۶۲/۵ میلی‌مولار، دی‌تیوتریتول ۱ میلی‌مولار، فنیل‌متیل‌سولفونیل فلورایدPMSF) ۰/۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، گلیسرول ۱۵٪ ، pH ۶/۸) به ترتیب به نسبت حجمی ۲:۱:۱ در لوله‌های شیشه‌ای ۱۵۰×۲۰ میلی‌متری مخلوط و با حداکثر سرعت (۲۸۰۰ دور در دقیقه) تا شکستن بیش از ۸۰ درصد از سلولها بر روی شیکر رومیزی دوران داده شد. لوله‌ها پس از هر یک دقیقه دوران، بمدت چند دقیقه در داخل یخ مذاب قرار می‌گرفت تا از گرم شدن نمونه ممانعت شود.

تفکیک دیواره سلولی و مایع سیتوپلاسمی . ۱- با سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون سلول‌های خرد شده بمدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰g و در ۴ درجه سانتی‌گراد سلول‌های سالم حذف شد. ۲- سپس مایع رویی بمدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰ g و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. ۳- رسوب حاصل سه بار شستشو، در مقدار کمی بافر حل و بعنوان نمونه "دیواره سلولی" تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۴- مایع رویی مرحله دو بمدت یک ساعت در ۱۰۰۰۰۰ g در ۴ درجه سانتی‌گراد اولترا سانتریفوژ شد و مایع‌رویی حاصل بعنوان نمونه "عصاره سیتوپلاسمی" تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین . برای اندازه‌گیری میزان پروتئین عصاره‌های سیتوپلاسمی از روش برادفورد و بعنوان استاندارد از سرم آلبومین گاوی استفاده شد.

سوبسترا . برای اندازه‌گیری فعالیت استرازی از پنج نوع سوبسترا شامل: آلفا نفتیل استات (α-NA) ، بتا نفتیل استات (β-NA)، آلفانفتیل کاپریلات (α-NC) ، آلفانفتیل لائورات-α) (NL و آلفانفتیل پالمیتات (α-NP) (سیگما) استفاده شد. استوک ۱۰۰ میلی مولار این سوبستراها در ان- پروپانول تهیه و تا زمان استفاده در دمای۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی . برای این کار از یک روش کلری متری (۱۵،۱۹) با کمی تغییر استفاده شد. بطور خلاصه سوبسترا از استوک ۱۰۰ میلی مولار به لوله در حال دوران حاوی بافر با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد اضافه شد. برای حل کردن آلفانفتیل کاپریلات ، آلفانفتیل لائورات و آلفانفتیل پالمیتات به ترتیب مقادیر ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/۳ درصد ترایتون X-۱۰۰ به بافر اضافه گردید. (۱۸) پس از تنظیم دمای لوله، نمونه مورد آزمایش اضافه و در صورت لزوم حجم واکنش با استفاده از بافر به یک میلی لیتر می‌رسید. پس از گرماگذاری و طی شدن مدت زمان انکوباسیون، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات واکنش خاتمه داده شد. سپس برای مرئی کردن آلفانفتول آزاد شده، ۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۲ درصد فست ویوله B اضافه و با استفاده از طیف سنج میزان جذب در طول موج۵۲۰ نانومتر در مقابل بلانک (حاوی همه اجزای واکنش بجز نمونه فعال) اندازه گیری می‌شد.

تعیین شرایط اپتیمم . با توجه باینکه در مورد فعالیت استرازی داخل سلولی ک.آلبیکنس گزارش قبلی وجود نداشت، با استفاده از آلفانفتیل استات به عنوان سوبسترا، تاثیر برخی از متغیرها مورد آزمایش قرار گرفت تا شرایط مناسب برای حداکثر فعالیت آنزیمی مشخص گردد :

۱. بافر و مولاریته بافر . برای تعیین بافر مناسب، واکنش آنزیمی در حضور دو بافر رایج که در اغلب مطالعات مشابه مورد استفاده قرار گرفته‌اند یعنی بافرفسفات و بافر تریس (۲۱،۲۰) با مولاریته‌های مختلف آزمایش و مقایسه شد.

۲. مولاریته سوبسترا . محلول سوبسترا با مولاریته های ۰/۲۵ ، ۰/۵۰ ، ۰/۷۵ ، ۱ ، ۱/۲۵، ۱/۵ و ۱/۷۵ میلی مولار تهیه و با مقادیر ثابتی از نمونه (۱۰ ، ۲۰ ، ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر ازعصاره سیتوپلاسمی) واکنش داده شد.

۳. pH . برای تعیین مناسب‌ترین pH برای فعالیت استرازی عصاره های سلولی کاندیدا آلبیکنس بافر دارای pH های مختلف تهیه و فعالیت آنزیم در هر یک از آنها اندازه‌گیری شد. برای pH های ۶/۵ تا ۹ از بافر فسفات و بافر تریس و برای pH های ۴ تا ۶/۵ از بافر تریس- سیتریک اسید استفاده شد.

۴. دمای واکنش . میزان واکنش آنزیمی در دماهای ۴، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد و مناسب‌ترین دما برای انجام واکنش‌های بعدی مشخص گردید.

۵. زمان واکنش . پس از مشخص شدن اسیدیته مناسب و نیز مناسبترین مولاریته سوبسترا ، زمان مناسب برای انجام واکنش تعیین شد. برای این کار واکنش در فواصل زمانی معین ختم و میزان فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد. با رسم منحنی زمان در برابر میزان جذب (۵۲۰ نانومتر)، زمان انکوباسیون مناسب مشخص گردید.

۶. طول مدت کشت . برای بررسی تاثیر مدت زمان کشت ک.آلبیکنس بر میزان فعالیت آنزیمی، در ساعتهای ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ بعد از کشت فعالیت استرازی اندازه‌گیری شد و زمان مناسب برای انکوباسیون کشت‌ها تعیین گردید.

منحنی استاندارد فعالیت آنزیمی . با توجه باینکه فعالیت استرازی در برابر سوبستراهای مورد استفاده منجر به آزاد شدن آلفا نفتول می‌شود، از مقادیر مختلف آلفا نفتول خالص(سیگما) و جذب آنها پس از اضافه کردن معرف فست ویوله B در طول موج ۵۲۰ نانومتر به عنوان منحنی استاندارد استفاده شد.

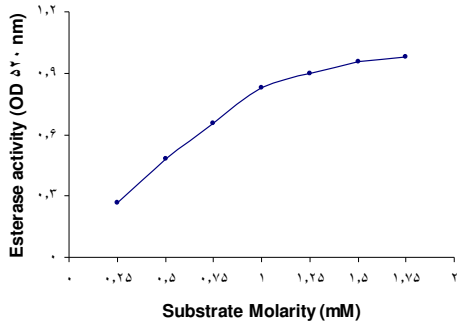
فعالیت استرازی اختصاصی . مقدار آنزیمی که قادر است در مدت زمان یک دقیقه مقدار یک میکرومول سوبسترا را هیدرولیز نموده و یک میکرومول آلفا نفتول تولید نماید به عنوان واحد فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد. میزان فعالیت اختصاصی در برابر سوبستراهای مورد استفاده نیز بر مبنای غلظت پروتئین نمونه‌های مورد آزمایش محاسبه شد. بنابراین میزان آنزیم موجود در هر میلی‌گرم پروتئین که قادر باشد یک میکرومول سوبسترا را هیدرولیز نموده و یک میکرومول آلفا نفتول تولید نماید بعنوان واحد فعالیت استرازی اختصاصی تعریف شد.

یافته‌ها

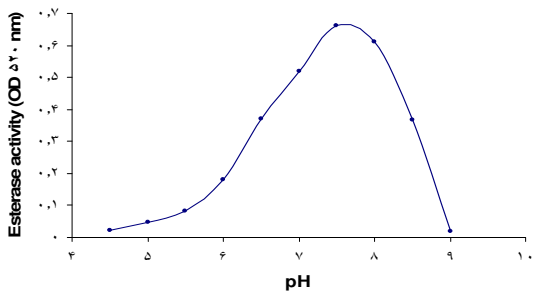
نتایج نشان داد که از بین فیلتره کشت، دیواره سلولی و عصاره سلولی کاندیدا آلبیکنس که از دو محیط کشت مختلف تهیه شده بود تنها مایع سیتوپلاسمی سلول‌های رشد یافته بر روی محیط YPG دارای فعالیت استرازی قابل اندازه‌گیری در برابر سوبستراهای بکار رفته در این مطالعه بود و فیلتره کشت هیچیک از دیگر محیط‌ها فعالیت آنزیمی قابل اندازه‌گیری نشان نمی‌دهد.

نتایج مربوط به تاثیر نوع بافر ومولاریته بافر بر میزان فعالیت آنزیمی نشان داد که از دو بافر مورد آزمایش ، بافر فسفات با مولاریته ۱۰ میلی مولار مناسب ترین نتیجه را فراهم می‌نماید و افزایش مولاریته آن با میزان فعالیت آنزیمی رابطه معکوس نشان می‌دهد. در مورد بافر تریس بیشترین فعالیت آنزیمی در غلظت ۱۰۰ میلی مولار این بافر رخ می‌داد اما در هر حال نسبت به بافر فسفات بطور قابل ملاحظه ای کمتر بود.

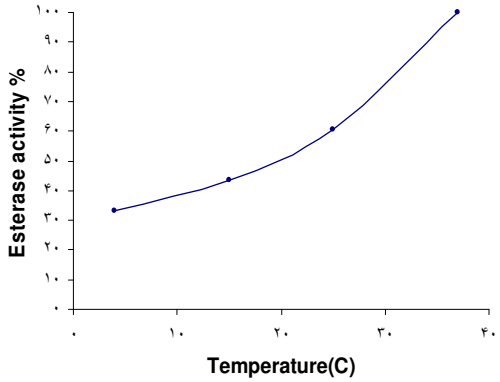
نمودار ۱ اثر تغییر مولاریته سوبسترا را بر فعالیت آنزیمی



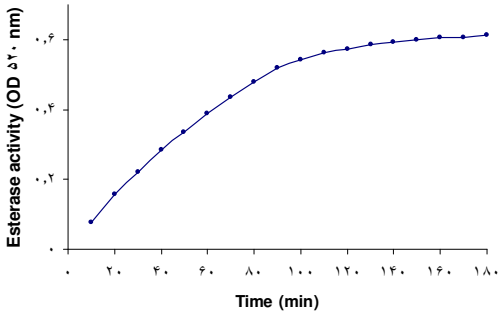
نمودار ۱. تاثیر غلظت سوبسترا بر فعالیت استرازی عصاره سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس در برابر آلفا نفتیل استات.



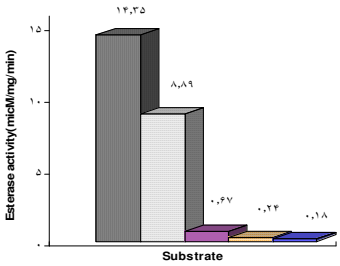
نمودار ۲. فعالیت استرازی عصاره سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس در برابر آلفا نفتیل استات در pH های مختلف.



نمودار ۳. فعالیت استرازی عصاره سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس در برابر آلفا نفتیل استات در دماهای مختلف.



نمودار ۴. تاثیر طول زمان واکنش بر فعالیت استرازی عصاره سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس در برابر آلفا نفتیل استات.



α-NA, β-NA, α -NC, α -NL, α -NP

نمودار ۵. فعالیت استرازی ویژه عصاره سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس(میکرومول بر میلی گرم پروتئین در دقیقه) در برابر ۵ نوع سوبسترای سنتتیک (از چپ به راست : آلفا نفتیل استات ، بتا نفتیل استات، آلفانفتیل کاپریلات، آلفانفتیل لائورات، و آلفانفتیل پالمیتات).

نشان می‌دهد. روی محور افقی مولاریته سوبسترا بر حسب میکرومول و در محور عمودی فعالیت استرازی بصورت میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر (که بیانگر مقدار آلفا نفتول آزاد شده است) مشاهده می‌شود. با افزایش مولاریته سوبسترا تا غلظت یک میلی مول، فعالیت آنزیمی به صورت خطی سیر

صعودی نشان داد اما در غلظت‌های بالاتر از یک میلی مولار منحنی به حالت افقی در می‌آمد. بنابراین غلظت یک میلی‌مولار به عنوان غلظت اپتیمم در نظر گرفته شد.

نمودار ۲ اثر pH بافر را بر فعالیت آنزیمی نشان می‌دهد. چنان که ملاحظه می‌شود ۷/۵ pH مناسبترین نتیجه را بدست می‌دهد. گذشته از کاهش فعالیت آنزیمی در pHهای بالاتر از حد اپتیمم، هیدرولیز خود بخود سوبسترا نیز در pHهای قلیایی افزایش می‌یابد بطوری که بعد از ۸/۵ pH سوبسترا تقریبا بطورکامل هیدرولیز می‌شود و امکان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در این شرایط وجود ندارد. نمودار ۳ بیانگر تاثیر دما بر میزان فعالیت آنزیمی است و نشان می دهد با افزایش دمای انکوباسیون، میزان فعالیت آنزیم نیز افزایش می‌یابد و در ۳۷ درجه سانتی گراد به اوج خود می‌رسد.

نمودار ۴ زمان اپتیمم برای انجام واکنش آنزیمی را نشان می‌دهد. با ادامه دادن زمان انکوباسیون، منحنی فعالیت آنزیمی تا دقیقه ۹۰ بصورت خطی ادامه می یابد و پس از آن از حالت خطی خارج شده به شکل افقی میل می‌کند. بنابر این زمان ۹۰ دقیقه برای انجام این واکنش آنزیمی مناسب تشخیص داده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مایع سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس در زمانهای ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت نشان داد که میزان این فعالیت در زمانهای مذکور با یکدیگر یکسان است و تفاوتهای ناچیز مشاهده شده از نظر آماری اهمیت ندارد . بنابراین برای سنجش آنزیم در مایع سیتوپلاسمی ایزوله‌ها می‌توان سلولها را در هر یک از زمانهای مذکور برداشت نمود. با وجود این برای یکسان بودن شرایط در همه آزمایش‌ها برای مقایسه فعالیت آنزیمی در شرایط مختلف از کشت ۴۸ ساعته کاندیدا آلبیکنس استفاده شد.

نمودار ۵ فعالیت ویژه عصاره سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس در برابر ۵ نوع سوبسترای مورد آزمایش را نشان می‌دهد. مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی در برابر این پنج نوع سوبسترا بیانگر بیشترین میزان فعالیت در برابر آلفا نفتیل استات با ۱۴/۳۵ و کمترین میزان فعالیت در برابر آلفا نفتیل پالمیتات با ۰/۱۸ میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه است. با افزایش طول زنجیره کربوکسیل سوبسترا فعالیت آنزیمی کاهش می یافت به طوری که فعالیت استرازی ویژه در برابر آلفا نفتیل استات، آلفا نفتیل کاپریلات ، آلفا نفتیل لائورات و آلفا نفتیل پالمیتات به ترتیب معادل ۱۴/۳۵ ، ۰/۶۷ ، ۰/۲۴ ، ۰/۱۸ میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بود. آزمون آماری نشان داد که اختلافات مشاهده شده بین این ۵ نوع سوبسترا بجز اختلاف بین آلفا نفتیل کاپریلات و آلفا نفتیل پالمیتات معنی دار است ($P<0/0001$)

بحث

مطالعه در مورد آنزیم‌های کاندیدا آلبیکنس بیشتر بر آنزیم‌های ترشحی معطوف بوده است. از بین آنزیم‌های خارج سلولی که بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند می‌توان به پروتئینازها (۲۲)، فسفولیپازها (۳) و لیپازها (۱) اشاره کرد. تولید و ترشح آنزیم‌های خارج سلولی تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و میکروارگانیزم بر حسب شرایط و برای آداپته کردن خود با شرایط محیطی میزبان بیان آنها را تنظیم می‌کند اما آنزیم های داخل سلولی که برای تداوم حیات میکروارگانیزم ضروری هستند ممکن است در هر شرایطی تولید شوند. به نظر می رسد در مواردی که هدف یابی‌های تشخیصی یا درمانی مورد نظر باشد، هدف‌های داخل سلولی از اعتبار بیشتری برخوردار باشند. تغییرات شدید استرین به استرین که در مورد آنزیم‌های ترشحی گزارش شده است (۲۲،۳،۱) و این واقعیت که اغلب داروهای ضد قارچ رایج همچون داروهای پلی ان و آزول، مسیرهای متابولیک داخل سلولی را هدف قرار می‌دهند نیز این ادعا را تقویت می‌کند. اگر چه مهار آنزیم‌های خارج سلولی ممکن است پاتوژنز و ویرولانس

را تحت تاثیر قرار دهد اما الزاما حیات میکروارگانیزم را تهدید نمی کند. بعلاوه پاتوژن هایی همچون ک.آلبیکنس که فاکتورهای ویرولانس خارج سلولی متعدد دارند ممکن است با مهار یک یا حتی چند فاکتور همچنان قدرت بیماری زایی خود را حفظ کنند.

اگرچه در مورد فعالیت استرازی خارج سلولی کاندیدا آلبیکنس مطالعات محدودی انجام شده است (۱۵،۹) اما بر اساس اطلاعات ما از چنین فعالیت آنزیمی در درون سلول این مخمر گزارشی وجود ندارد. این مطالعه اولین گزارش از فعالیت استرازی داخل سلولی ک.آلبیکنس را ارائه می‌کند. نتایج ما نشان داد که از بین فیلتره کشت، دیواره سلولی و عصاره سلولی کاندیدا آلبیکنس که از دو محیط کشت مختلف تهیه شده بود تنها مایع سیتوپلاسمی سلولهای رشد یافته بر روی محیط YPG دارای فعالیت استرازی قابل اندازه گیری در برابر سوبستراهای بکار رفته در این مطالعه بود و فیلتره هیچ کدام از محیط های کشت فعالیت آنزیمی قابل دیتکت نشان نمی داد. در مورد محیط YNB-Tween ۸۰ انتظار می‌رفت فعالیت آنزیمی فیلتره کشت حداقل در برابر یکی از سوبستراها یعنی آلفا نفتیل پالمیتات ملاحظه شود چنان که گزارشی در این مورد وجود دارد. (۱۵) اما تغییر شرایط کشت از جمله تغییر ترکیب محیط کشت، تغییر pH، زمان‌های مختلف انکوباسیون و نیز تغییر دادن شرایط اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی همچون آزمایش فعالیت آنزیمی در pH های مختلف، دماهای متفاوت ، مقادیر مختلف نمونه، تریت‌های مختلف بر روی فیلتره کشت نشان داد که در فیلتره کشت سلول‌های ک.آلبیکنس رشد یافته در محیط یست نیتروژن بیس-توئین ۸۰ هیچگونه فعالیت آنزیمی وجود ندارد. همچنین مایع سیتوپلاسمی و دیواره سلولی سلولهای رشد کرده در این محیط فاقد فعالیت آنزیمی بود. سلولهای رشد یافته روی محیط کشت YPG دارای فعالیت استرازی بودند که مایع سیتوپلاسمی آنها فعالیت قابل توجهی نشان داد و فعالیت آنزیمی دیواره سلولی آنها بسیار ناچیز بود. Tsuboii و همکاران نشان دادند که گونه‌های ک.آلبیکنس بر روی محیط یست نیتروژن بیس-توئین ۸۰ (YNB-Tween ۸۰) یک کربوکسیل استراز خارج سلولی ترشح می‌کنند که ظاهراً میزان آن در گونه‌های پاتوژن بیشتر است. تولید این استراز به وسیله لیپیدهایی نظیر توئین ۸۰ القا و فعالیت اپتیمم آن بر روی آلفا نفتیل پالمیتات و در ۵/۵ pH ظاهر می‌شد. این استراز تری الئین، تری پالمیتین و آلفا لسیتین را هیدرولیز نمی‌کرد بنابراین به عنوان یک منواستر هیدرولاز تشخیص داده شد. (۱۵) Rudek با استفاده از پلیت‌های حاوی توئین کیفیت فعالیت استرازی را در گونه‌های کاندیدا که اغلب از عفونت‌های انسانی جدا می‌شوند تعیین نمود. ۸ گونه کاندیدا از نظر توانایی هیدرولیز توئین‌های مختلف بررسی شدند. در این مطالعه الگوی رسوب ناشی از واکنش اسیدهای چرب آزاد شده از توئین با یونهای کلسیم محیط کشت در تشخیص برخی از گونه ها مفید ارزیابی شده است. (۹)

داده‌های ما نشان داد که فعالیت استرازی با افزایش طول زنجیره اسید چرب سوبسترا کاهش می یابد. با توجه باینکه حلالیت سوبستراهای مورد مطالعه با افزایش تعداد کربن عامل هیدروکسیل آنها (از $C_۲$ تا $C_{۱۶}$) کاهش می‌یابد، بدست آوردن این نتیجه دور از انتظار نیست. این یافته تائید می‌کند که آنزیم ما یک استراز واقعی است زیرا با کاهش حلالیت سوبستراها و میل آنها به هیدرولیز شدن بوسیله لیپازها بجای استرازها ، از میزان فعالیت آن کاسته می‌شود. (۱، ۲۳)

فعالیت آنزیمی کاندیدا بیشتر برای ارتباط دادن آن با ویرولانس و نقش آن در پاتوژنز مورد توجه قرار گرفته است. اما می‌توان برای تشخیص بیماری، تعیین هویت قارچ عامل و اهداف درمانی هم از آنزیم‌ها بویژه انواع داخل سلولی استفاده نمود. فعالیت استرازی داخل سلولی در همه ایزوله هایی که ما مورد مطالعه قرار داده‌ایم قابل دیتکت بود (داده‌ها ارائه نشده است) این یافته نشان می‌دهد که این آنزیم(ها) احتمالاً از

لوازم فرایندهای بیولوژیک سلول بوده، ممکن است یک هدف درمانی مناسب به حساب آید بنابراین ترکیباتی که بتوانند این پروتئین و یا مسیر بیوسنتر آن را مورد هدف قرار دهند ممکن است قابلیت استفاده درمانی داشته باشند.

تشخیص سریع و دقیق کاندیدیازیس سیستمیک یکی از زمینه‌های تحقیقی دارای اولویت در کاندیدیازیس محسوب می‌شود. اهداف تشخیصی متعدد از جمله گلوکان‌ها و مانوپروتئین‌های دیواره سلولی و نیز چندین پروتئین سیتوپلاسمی برای این منظور آزمایش شده است اما نتایج چندان راضی کننده نیست. ممکن است استراز دیتکت شده در مطالعه ما قابلیت استفاده به عنوان یک هدف تشخیصی را داشته باشد. با تخلیص و تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آن می‌توان سودمندی آن را مورد بررسی قرار داد.

با توجه به اینکه فعالیت استرازی مورد مطالعه ما تغییرات کمی استرین به استرین (داده‌ها ارائه نشده است) و نیز پلی مورفیسم قابل توجهی نشان می‌دهد (۲۴) ، ممکن است بتوان از این ویژگی به عنوان ابزاری برای تفکیک استرین‌های ک.آلبیکنس و نیز نشان دادن روابط اپیدمیولوژیک آنها استفاده نمود. این بررسی‌ها توسط تیم ما در حال انجام است.

نتیجـه‌گیری: مایع سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنسپس از رشد در محیط **YPG** نوعی فعالیت استرازی نشان می‌دهد. این فعالیت در برابر آلفانفتیل استات محلول در بافر فسفات یک میلی مولار و pH۷/۵ پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در ۷ درجه سانتی گراد به حد مطلوب می رسد. ممکن است این آنزیم ابزاری مفید برای تشخیص عفونت های سیستمیک کاندیدا آلبیکنس و بررسی روابط استرینی این مخمر و یا هدفی مناسب برای درمان کاندیدیازیس باشد.

References

۱. Hube B, Stehr F, Bossenz M. Serceted lipases of Candida albicans: cloning, charachterisation and expression analysis of a new geng family with at least ten members. Arch Microbiol ۲۰۰۰; ۱۷٤, ۳٦۲-۳۷٤

۲. Bruckmann A, Kunkel W, Hartl A, Wetzker R, Eck R. A phosphatidylinositol ۳-kinase of candida albicans influences adhesion, filamentous growth and virulence. Microbiol ۲۰۰۰; ۱٤٦ (Pt۱۱): ۲۷۵۵-٦٤.

۳. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis.Clin Microbiol Rev ۲۰۰۰; ۱۳(۱): ۱۲۲-٤۳.

٤. Guhad FA, Csank C, Jensen HE, Thomas DY, Whiteway M, Hau J. Reduced pathogenicity of a Candida albicans MAP kinase phosphatase (CPP۱) mutant in the murine mastitis model. APMIS ۱۹۹۸; ۱۰٦(۱۱): ۱۰٤۹-۵۵

۵. Kaminishi H, Hagihara Y, Hayashi S, Cho T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by Candida albicans. Infect Immun ۱۹۸٦; ۵۳(۲): ۳۱۲-۳۱٦.

٦. Kothavade RJ, Panthaki MH. Evaluation of phospholipase activity of Candida albicans and its correlation with pathogenicity in mice. J Med Microbiol ۱۹۹۸; ٤۷(۲): ۹۹-۱۰۲.

۷. Mio T, Kokado M, Arisawa M, Yamada-Okabe H. Reduced virulence of Candida albicans mutants lacking the GNA۱ gene encoding glucosamine- ٦- phosphate

۱۵. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H, Induction of an extracellular esterase from Candida albicans and some of its properties. Infec Immun ۱۹۹٦; ۲۹۳٦-٤۰.

۱٦. Kwon-Chung KJ, Benbett JE, Medical Mycol. Lea & Febiger ۱۹۹۲; ۲۸۰-۳۳۷

۱۷. Victoria Elorza M, Murgui A, Sentandreu R. Dimorphism in Candida albicans: Contribution of manoproteins to the architecture of yeast and mycolial cell walls. J Gen Microbiol ۱۹۸٥ ; ۱۳۱, ۲۲۰۹-۱٦.

۱۸. Kok RG, Christoffeb VM, Vosman B, Hellingwerf KJ. Growth Phase-dependent expression of the lipolytic system of Acinetobacter calcoaceticus BD٤۱۳: cloning of a gene encoding one of the esterases. J Gener Microbiol ۱۹۹۳; ۱۳۹: ۲۳۲۹-٤۲.

۱۹. Whitaker JF. A rapid and spesific method for the determination of pancreatic lipase in serum and urine. Clin Chim Acta ۱۹۷۳; ٤٤: ۱۳۳-۱۳۸.

۲۰. Li CY, Lam KW,Yam LT. Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem ۱۹۷۳; ۲۱: ۱-۱۲.

۲۱. Munger JS, Shi GP, Mark EA, Chin DT, Gerard C, Chapman HA. A serin esterases released by human alveolar macrophages is closely related to liver microsomal carboxylesterases. J Biol Chem ۱۹۹۱; ۲٦٦: ۱۸۸۳۲-۳۸.

۲۲. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev ۲۰۰۳;٦۷(۳): ٤۰۰-۲۸.

acetyltransferase. Microbiol ۲۰۰۰; ۱٤٦ (Pt۷): ۱۷٥۳-۸.

۸. Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, de Montclos H, Gille Y. Rapid identification of Candida albicans by using Albicans ID and fluoroplate agar plates. J Clin Microbiol ۱۹۹٤; ۳۲(۱۲): ۳۰۳٤-۳٦.

۹. Rudek W. Esterase activity in Candida species. J Clin Microbiol ۱۹۷۸ ; ۸(٦): ۷٥٦-۷٥۹.

۱۰. Sangar VK, Cortes JM, Self LW. Acid phosphatase production as an aid in rapid characterization of Candida species. Am J Med Technol ۱۹۷٥٤۱(۹): ۳۲۷-۳۳۲.

۱۱. Bernhardt H, Zimmermann K, Knoke M, Schwesinger G. Enzymatic activities of Candida albicans strains from different locations. Mycoses ۱۹۹۱; ۳٤ Suppl ۱: ٦۹-۷۱.

۱۲. Krzeminska-Jaskowiak E, Pietkiewicz K, Ozdowska B. [Utilization of enzymatic activity in strains of Candida isolated from the vagina for typing and evaluation of pathogenicity). Med Dosw Mikrobiol ۱۹۹٤; ٤٦(۳): ۲۲٥-۳۱.

۱۳. Sono E, Masuda T, Takesako K, Kato I, Uchida K, Murayama SY, Yamaguchi H. Comparison of acid proteinases from Candida tropicalis, C.parapsilosis and C. albicans.Microbiol Immunol ۱۹۹۲; ۳٦(۱۰): ۱۰۹۹-۱۱۰٤.

۱٤. Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping Candida albicans. J Med Vet Mycol ۱۹۸٦; ۲٤(٥): ٤۱٥-٤۱۷.

۲۳. Tsujita T, Shirai K, Saito Y, Okuda H. Relationship
between lipase and esterase. Prog Clin Biol Res ۱۹۹۰; ۳٤٤: ۹۱۵-۹۳۳.

۲٤. Riazipour M, Khosravi AR, Mousavi ML, Lotfi A. Carboxylesterases polymorphism in Candida albicans strains, ۸th Cong. Eur. Conf Med Mycol ۲۰۰۲; Abstrc.