

جداسازی و شناسایی پروتئین‌های دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و نمونه‌های کاندیدایی بیمارستانی و مقایسه الگوی الکتروفورزی آنها

احمد خلیلی * M.Sc.، محمدحسین یادگاری * Ph.D.، مجید ریاضی پور ** Ph.D.،
شهرلا رودبار محمدی *** Ph.D.، محمدرضا شکوه امیری *** M.Sc.،
آریو شاهین جعفری *** Ph.D.

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق در مرحله اول بدست آوردن الگوی پروتئینی دیواره سلولی عوامل تایید شده کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا بصورت جداگانه و در مرحله دوم بدست آوردن الگوی پروتئینی دیواره سلولی عوامل کاندیدا آلبیکنس جمع‌آوری شده از منابع بالینی بوده است. اطلاعات بدست آمده می‌تواند تشابهات و تفاوت‌های این الگوهای بدست آمده را با الگوهای استاندارد مدنظر قرار دهد.

روش بررسی: پروتئین‌های دیواره سلولی با روش سایش با گلوله‌های شیشه‌ای به دست آمدند. پروتئین‌های دیواره سلولی بعد از تخریب دیواره، جدا و به وسیله SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) دو درصد جمع‌آوری شدند. سپس از تکنیک SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Poly) و Acrylamide Gel electrophoresis) و ضریب دایس برای بررسی الگوی الکتروفورزی و میزان شباهت آنها استفاده گردید.

یافته‌ها: بیشترین شباهت پروتئین‌های دیواره سلولی بین نمونه‌های ناخن و دهان، بازو و پا، ناحیه کشاله ران و سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس با ۹۵ درصد شباهت نمایان گردید. بیشترین وزن مولکولی مشابه در پروتئین‌های دیواره سلولی در کلیه ایزوله‌ها (۳۵ و ۶۴) کیلوالتون در ۱۲ نمونه، ۲۴ کیلوالتون در ۱۰ نمونه و (۵۰ و ۲۶) کیلوالتون در ۹ نمونه دیده شد. کمترین شباهت در وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی (۲۹، ۴۲ و ۶۰ کیلوالتون) در ۸ نمونه و ۲۹ کیلوالتون در یک نمونه از کاندیدا آلبیکنس دیده شد.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده از مجموع الگوهای پروتئینی دیواره سلولی می‌تواند برای مقایسه آنها با الگوهای پروتئین‌های سیتوپلاسمی استفاده شود و نتایج جهت مطالعات در شرایط *In vitro* و مطالعات ملکولی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، دیواره سلولی، SDS-PAGE، پروتئین، کاندیدا گلابراتا.

دریافت مقاله: ۸۵/۳/۲۵، اصلاح مقاله: ۸۶/۴/۱، پذیرش مقاله: ۸۶/۴/۱۰

ک نویسنده مسئول: استادیار گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

* دانشجوی دکتری ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

** استادیار گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

** گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

** دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی

آدرس پست الکترونیکی: myadegari@yahoo.com

مقدمه

عوامل کاندیدایی از قارچ‌های فرصت‌طلبی هستند که می‌توانند در شرایط مناسب اثرات خود را در بدن انسان برجای گذارند از جمله مهمترین این عوامل کاندیدا آلبیکنس است که به صورت آندوژن در بدن انسان وجود دارد و در شرایطی که مقاومت میزبان به صورت موضعی یا منتشره کاهش یابد، این عامل به صورت پاتوژن ظاهر می‌گردد.

در گذشته کاندیدا گلابراتا به عنوان یک عامل غیر بیماری‌زا در نظر گرفته می‌شد به طوری که در افراد سالم به ندرت به صورت پاتوژن مطرح بود. اما به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و نقص ایمنی، عفونت‌های مخاطی و احشایی به وسیله این میکروارگانیسم افزایش یافته است به طوری که امروزه به عنوان دومین یا سومین عامل بیماری‌زا در بین گونه‌های کاندیدا شناخته شده است (۱-۳).

تمامی گونه‌های شناخته شده کاندیدا از نظر تولید مثل جنسی (تلئومورف) امروزه در گروه آسکومیست‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (۴). در سال ۱۹۹۵ یک گونه جدید به نام کاندیدا دوبلینینسیس شناسایی شد که تفاوت عمده آن با کاندیدا آلبیکنس اساساً در عدم واکنش DNA آن با پروب ویژه کاندیدا آلبیکنس می‌باشد (۵).

کاندیدا آلبیکنس به دلیل اهمیت ویژه، بیشتر از سایر گونه‌های کاندیدا در تمامی جنبه‌های بیولوژی و فیزیولوژی مورد بررسی قرار گرفته است. پلی‌ساکاریدها، ترکیبات اولیه در دیواره سلولی کاندیداها هستند (۶). ساختمان پلی‌ساکاریدهای مانان در دیواره کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه فراوان قرار گرفته است. ساختار مانان در دیواره‌ها به وسیله تغییرات pH و حرارت محیطی خارجی تغییر می‌کند. کاندیدا آلبیکنس به اشکال گلوبوزا، قادر به ایجاد بلاستوکونیدیا، میسلیم کاذب کوتاه و بلند و هایف حقیقی می‌باشد (۷).

اغلب عفونت‌های کاندیدایی دهان در بیمارانی رخ می‌دهد که از تضعیف و سرکوب ایمنی موضعی یا سیستمیک رنج می‌برند. بنابراین این عفونت‌های کاندیدایی دهان در اشخاص با ایمنی ضعیف و یا سرکوب شده نظیر نوزادان، اشخاص دیابتیک، بیماران

آلوده به HIV، بیماران دریافت‌کننده داروهای کورتیکواستروئید یا سیتوتوکسیک به ویژه بدخیمی‌های خونی، گیرندگان عضو یا انتقال مغز استخوان، دیده می‌شوند (۸-۱۱). از طرفی در افرادی که در معرض درمان طولانی با آنتی‌بیوتیک‌ها و استروئیدهای استنشاقی هستند، همچنین در دارندگان دندان‌های مصنوعی؛ بیماری توسعه بیشتری را نشان می‌دهد. عفونت‌های کاندیدایی همچنین در مجاری تناسلی نیز قابل مشاهده است. ولوواژینیت کاندیدایی دومین مشکل شایع در دستگاه ژنیتال خانمها می‌باشد. عفونت‌های کاندیدایی پوست و ناخن ممکن است در افراد سالم نیز دیده شوند (۱۲). Savolainen و همکاران در سال ۱۹۹۰ با استفاده از SDS-PAGE و ایمونوبلات آنتی‌ژنهای محلول در آب، سلولهای کامل و سلولهای تخریب شده کاندیدا آلبیکنس را آنالیز نمودند (۱۳). Vedyappan و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه‌ای با عنوان «پروتئین‌های سطح سلولی کاندیدا آلبیکنس، فراوری عصاره‌ها و جداسازی بهبود یافته پروتئینها» بعد از SDS-PAGE با مقایسه رنگ‌آمیزی نیترات نقره و کوماسی بلو، تمایز در رنگ‌پذیری بعضی از باندها را ملاحظه نمودند (۱۴). Rosa و همکاران در سال ۲۰۰۰ الکتروفورز مولتی لوکوس آنزیمی و الکتروفورز SDS-PAGE را برای تعیین خصوصیت ۵ گونه کاندیدای جدا شده از حفره دهان به کار بردند. داده‌ها نشان داد که SDS-PAGE در گروه‌بندی استرین‌ها در داخل گونه مربوطه کارایی بیشتری دارد (۱۵). لذا با توجه به مطالعات مختلف و اهمیت ساختمان دیواره سلولی عوامل کاندیدایی، در این تحقیق مطالعه الگوی پروتئینی دیواره سلولی نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش SDS-PAGE انجام گرفته و درصد تشابه و تفاوت‌های وزن ملکولی پروتئین‌های دیواره سلولی آنها با یکدیگر مقایسه شده است.

روش بررسی

۱. مخمرهای مورد استفاده. مخمرهای مورد استفاده در این مطالعه از مراکز درمانی بیمارستان رازی و بیمارستان امام خمینی

برای تهیه عصاره دیواره سلولی از روش Elorza تغییر یافته استفاده شد (۱۶). بعد از شکستن سلول‌ها جهت رسوب دادن دیواره سلولی از SDS ۲٪ استفاده گردید. با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار، نمونه‌ها سانتریفوژ شده و مایع رویی در مجاورت استون قرار گرفت و با استفاده از کیسه دیالیز، عمل دیالیز انجام گردید.

۵- سنجش پروتئین. پروتئین‌های بدست آمده بعد از دیالیز با استفاده از روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۶- انجام الکتروفورز. از روش SDS-PAGE استفاده گردید و پروتئین‌های با وزن مولکولی نامعلوم به کمک پروتئین‌های استاندارد معلوم روی ژل پلی آکریل آمید با رسم منحنی کالیبراسیون مشخص شدند و مقدار R_f یا حرکت نسبی با استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

$$R_f = \frac{\text{فاصله طی شده توسط پروتئین از مبدأ}}{\text{فاصله نقطه مرجع از نقطه مبدأ}}$$

یافته‌ها

در این تحقیق ۱۱ ایزوله کاندیدا مطابق جدول ۱ استفاده شد. نتایج الکتروفورز پروتئین‌های دیواره سلولی ایزوله‌های کاندیدا با روش SDS-PAGE به شرح زیر می باشد:

تهیه گردید. ابتدا تست تولید لوله زایا (Germ tube) در مورد این مخمرها انجام شد و سپس مخمرها از نظر قدرت تولید کلامیدوکونیدی مورد بررسی قرار گرفتند. بدین ترتیب از بین کلیه نمونه‌ها ۱۱ نمونه برای تعیین الگوی پروتئینی دیواره سلولی انتخاب گردید.

۲- سوش استاندارد مورد استفاده. نمونه مورد استفاده، نمونه لیوفیلیزه PTCC-5027 سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (سوش استاندارد کاندیدا آلیکنس) بوده که پس از تولید لوله زایا و کلامیدوکونیدی در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.

۳- کشت انبوه. برای تولید انبوه از محیط کشت GYEP (گلوکز ۲٪، عصاره مخمر ۰/۳٪ و پپتون ۰/۱٪) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین (۱۰۰ IU/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ mg/ml) و کلرامفنیکل (۵۰ mg/li) استفاده شد. سوسپانسیون معمولی از نمونه‌های کاندیدا تهیه و به داخل ارلن‌ها اضافه گردید. سپس ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار منتقل گردید و با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. بعد از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها با سانتریفوژ یخچال دار در ۵ درجه سانتی گراد و دور ۵۰۰۰ جمع‌آوری و سپس ۳ بار با آب مقطر شستشو داده شده و رسوب به دست آمده به فریزر منتقل شد.

۴- خرد کردن سلول‌ها و تهیه عصاره دیواره سلولی.

جدول ۱. مشخصات ایزوله‌های مورد مطالعه

| شماره ایزوله | منبع جداسازی | وضعیت میزبان | محل جداسازی | لوله زایا | کلامیدوکونیدی |
|--------------|--------------|--------------|------------------------------|-----------|---------------|
| ۱ | انسان | بیمار | ناخن | + | + |
| ۲ | انسان | بیمار | کشاله ران | + | + |
| ۳ | انسان | بیمار | واژن | + | + |
| ۴ | انسان | بیمار | واژن | + | + |
| ۵ | انسان | بیمار | بین انگشتان پا | + | + |
| ۶ | انسان | بیمار | بین انگشتان دست | + | + |
| ۷ | - | - | سوش استاندارد کاندیدا آلیکنس | + | + |
| ۸ | - | - | کاندیدا گلابراتا | - | - |
| ۹ | انسان | بیمار | ناخن | + | + |
| ۱۰ | انسان | بیمار | کشاله ران | + | + |
| ۱۱ | انسان | بیمار | دهان | + | + |

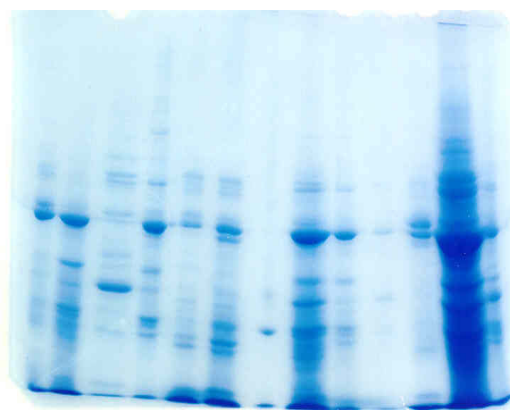
| ستون ۱ نمونه ناخن | ستون ۲ نمونه کتله ران | ستون ۳ نمونه واژن | ستون ۴ نمونه واژن | ستون ۵ نمونه بین اکستمال پا | ستون ۶ نمونه بین اکستمال دست | ستون ۷ مارکر Wide | ستون ۸ (استاندارد) کاندیدا آلیکسین | ستون ۹ (کاندیدا گلارایا) | ستون ۱۱ (نمونه ناخن) | ستون ۱۲ (نمونه کتله ران) | ستون ۱۳ (نمونه دهان) | |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------|
| M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | M _w | |
| ۶۸۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۱۰۰۵۰ | ۱۰۰۲۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۱۰۰۲۰۰ | ۹۰۰۰۰ | ۶۸۰۰۰ | ۶۸۰۰۰ | ۶۸۰۰۰ | ۱۱۰۰۰۰ | ۱۰۱۵۰۰ |
| ۶۴۰۰۰ | ۵۴۰۰۰ | ۱۰۰۲۰ | ۸۰۰۰۰ | ۶۰۰۰۰ | ۶۰۰۰۰ | ۹۰۰۰۰ | ۶۸۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۱۰۱۵۰۰ | ۶۸۰۰۰ |
| ۵۴۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۹۰۰۰۰ | ۷۲۰۰۰ | ۵۶۵۰۰ | ۵۴۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۴۴۰۰۰ | ۵۴۰۰۰ | ۵۴۰۰۰ | ۱۰۰۲۰۰ | ۶۴۰۰۰ |
| ۵۰۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۸۰۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۴۴۰۰۰ | ۵۴۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۹۰۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ |
| ۳۹۰۰۰ | ۲۱۰۰۰ | ۷۲۰۰۰ | ۵۴۰۰۰ | ۴۴۰۰۰ | ۴۴۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۲۱۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۸۰۰۰۰ | ۳۹۰۰۰ |
| ۲۵۰۰۰ | ۲۷۵۰۰ | ۶۸۰۰۰ | ۴۴۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۴۲۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۲۹۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۷۲۰۰۰ | ۲۵۰۰۰ |
| ۲۷۵۰۰ | ۲۶۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۴۲۰۰۰ | ۲۱۰۰۰ | ۳۹۰۰۰ | ۱۴۰۰۰ | ۲۱۰۰۰ | ۲۶۰۰۰ | ۱۴۰۰۰ | ۱۴۰۰۰ | ۶۸۰۰۰ | ۲۷۵۰۰ |
| ۲۶۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۳۹۰۰۰ | ۲۷۵۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۲۷۵۰۰ | ۲۷۵۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۶۵۰۰۰ | ۲۶۰۰۰ |
| ۲۴۰۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۴۶۵۰۰ | ۲۵۰۰۰ | ۲۶۰۰۰ | ۳۱۰۰۰ | ۲۶۰۰۰ | ۲۶۰۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۶۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ |
| ۱۹۸۰۰ | ۱۹۸۰۰ | ۳۹۰۰۰ | ۲۱۰۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۹۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۵۴۰۰۰ | ۵۰۰۰۰ |
| | | ۲۵۰۰۰ | ۲۷۵۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۵۰۰۰۰ | ۳۹۰۰۰ |
| | | ۳۱۰۰۰ | ۲۶۰۰۰ | ۱۹۸۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۲۲۵۰۰ | ۳۹۰۰۰ | ۳۹۰۰۰ |
| | | ۲۶۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ | ۱۴۰۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۳۵۰۰۰ | ۳۵۰۰۰ |
| | | ۲۴۰۰۰ | ۲۱۵۰۰ | ۱۴۰۰۰ | ۱۴۰۰۰ | ۱۴۰۰۰ | ۱۹۹۰۰ | ۱۹۹۰۰ | ۱۹۹۰۰ | ۱۹۹۰۰ | ۳۱۰۰۰ | ۳۱۰۰۰ |
| | | ۱۴۰۰۰ | | | | | ۱۹۸۰۰ | ۱۹۸۰۰ | ۱۹۸۰۰ | ۱۹۸۰۰ | ۲۶۰۰۰ | ۲۶۰۰۰ |
| | | | | | | | | | | | ۲۴۰۰۰ | ۲۴۰۰۰ |
| | | | | | | | | | | | ۲۳۵۰۰ | ۲۳۵۰۰ |
| | | | | | | | | | | | ۱۹۸۰۰ | ۱۹۸۰۰ |
| | | | | | | | | | | | ۱۴۰۰۰ | ۱۴۰۰۰ |

جدول ۲. نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین های دیواره سلولی

آنها (جدول ۲) از ۱۴ تا ۱۱۰ کیلو دالتون متغیر است، مشاهده شد. نتایج بررسی درصد تشابه وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی. نتایج درصد تشابه وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی با توجه به مقایسه هر کدام از نمونه‌ها با نمونه دیگر بصورت جدا به دست آمد (جدول ۳).

در این بین کمترین درصد تشابه بین ستون‌های ۵ (نمونه انگشتان پا) و ستون‌های ۱۱ (نمونه ناخن) با ۵۵ درصد تشابه و بالاترین درصد تشابه بین ستون‌های ۱ (نمونه ناخن) و ۱۳ (نمونه دهان)، ستون‌های ۲ (نمونه کشاله) و ۵ (نمونه بین انگشتان پا)، ستون‌های ۳ (نمونه واژن) و ۱۳ (نمونه دهان)، ستون‌های ۵ (نمونه بین انگشتان پا) و ۶ (نمونه بین انگشتان دست) و ستون‌های ۸ (ایزوله استاندارد کاندیدا آلبیکنس) و ۱۲ (نمونه کشاله) با ۹۵ درصد تشابه مشاهده شد.

- از طرفی نتایج درصد تشابه وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی هر کدام از نمونه‌ها (بصورت جداگانه) با سایر ستون‌ها (جدول ۳) به دست آمد که بالاترین میانگین اختلاف ۲۹٪ بین ستون‌های ۴ (نمونه واژن) با سایر ستون‌های و پائین‌ترین میانگین اختلاف ۱۳٪ بین ستون ۸ (ایزوله کاندیدا آلبیکنس) با سایر ستونها بود.



تصویر ۱. SDS-PAGE پروتئین‌های دیواره سلولی

- ستون شماره ۱۰ در تصویر ۱ پروتئین‌های دیواره سلولی مورد بررسی قرار نگرفته است.

ستون های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ به ترتیب دارای ۱۰، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۷، ۷، ۷، ۹، ۱۹، ۹ باند می‌باشند.

ستون ۱: نمونه ناخن ستون ۸: نمونه PTCC-5027 کاندیدا آلبیکنس
ستون ۲: نمونه کشاله ران ستون ۹: نمونه کاندیدا گلابراتا
ستون ۳: نمونه واژن ستون ۱۰: فاقد نمونه
ستون ۴: نمونه واژن ستون ۱۱: نمونه ناخن
ستون ۵: نمونه بین انگشتان پا ستون ۱۲: نمونه کشاله
ستون ۶: نمونه بین انگشتان دست ستون ۱۳: نمونه دهان
ستون ۷: نمونه مارکر Wid

تصویر ۱ مربوط به الگوی پروتئین‌های دیواره سلولی ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا است. در این تصویر، از بین ایزوله‌ها حداقل ۷ باند و حداکثر ۱۹ باند که دامنه وزن مولکولی

جدول ۳. نتایج درصد تشابه وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی با یکدیگر

| مقایسه نمونه های دیواره سلولی | میانگین اختلاف % | میانگین تشابه % | دامنه تشابه % |
|---|------------------|-----------------|---------------|
| ستون ۱ (نمونه ناخن) با سایر ستون ها | ۲۲/۸ | ۷۷/۲ | ۶۰-۹۵ |
| ستون ۲ (نمونه کشاله) با سایر ستون ها | ۱۸ | ۸۲ | ۶۰-۹۵ |
| ستون ۳ (نمونه واژن) با سایر ستون ها | ۲۲ | ۷۷ | ۶۶-۹۵ |
| ستون ۴ (نمونه واژن) با سایر ستون ها | ۲۹ | ۷۱ | ۵۸-۹۵ |
| ستون ۵ (نمونه بین انگشتان پا) با سایر ستونها | ۲۱ | ۷۹ | ۵۵-۹۵ |
| ستون ۶ (نمونه انگشتان دست) با سایر ستونها | ۲۳ | ۷۷ | ۶۰-۸۹ |
| ستون ۸ (ایزوله استاندارد کاندیدا آلبیکنس) با سایر ستون ها | ۱۳ | ۸۷ | ۷۵-۹۴ |
| ستون ۹ (کاندیدا گلابراتا) با سایر ستون ها | ۲۸ | ۷۲ | ۶۸-۷۸ |
| ستون ۱۱ (نمونه ناخن) با سایر ستون ها | ۱۸ | ۸۲ | ۷۳-۹۰ |
| ستون ۱۲ (نمونه کشاله) با سایر ستون ها | ۳۲ | ۶۸ | ۶۸-۹۰ |
| ستون ۱۳ (نمونه دهان) با سایر ستون ها | ۲۰ | ۸۰ | ۹۰-۹۵ |

جدول ۴. بررسی درصد تشابه وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی کلیه ایزوله‌ها

| دامنه تشابه % | میانگین تشابه % | میانگین اختلاف % | میانگین تشابه پروتئین‌های دیواره سلولی کلیه ایزوله‌ها |
|---------------|-----------------|------------------|---|
| ۶۸-۸۷ | ۷۷ | ۲۳ | |

گزارش شد. نتایج بررسی درصد تشابه وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی کلیه ایزوله‌های میانگین تشابه پروتئین‌ها ۷۷ درصد و دامنه تشابه ۶۸-۸۷ درصد و میانگین اختلاف کل ایزوله‌ها ۲۳ درصد گزارش شد (جدول ۴).

جدول ۶. بررسی تعداد وزن‌های مولکولی مشابه بین پروتئین‌های دیواره سلولی کاندیدا گلابراتا با پروتئین‌های دیواره سلولی سایر نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس

| وزن مولکولی پروتئین‌های دیواره سلولی کاندیدا گلابراتا | مجموع وزن مولکولی‌های مشابه |
|---|-----------------------------|
| ۶۴۰۰۰ | ۱۰ |
| ۳۵۰۰۰ | ۱۰ |
| ۲۴۰۰۰ | ۹ |
| ۲۶۰۰۰ | ۸ |
| ۳۱۰۰۰ | ۷ |
| ۶۸۰۰۰ | ۶ |
| ۲۲۵۰۰ | ۵ |
| ۴۴۰۰۰ | ۳ |
| ۲۹۰۰۰ | ۱ |

- همچنین بالاترین میانگین تشابه ۸۷٪ بین ستون‌های ۸ (ایزوله استاندارد کاندیدا آلبیکنس) با سایر ستون‌ها و پائین‌ترین میانگین تشابه ۶۸٪ بین ستون‌های ۱۲ (نمونه اکشاله با سایر ستون‌ها) بود.

جدول ۵. بررسی وزن مولکولی‌های متشابه در پروتئین‌های دیواره سلولی

| وزن مولکولی | مجموع وزن مولکولی متشابه |
|-------------|--------------------------|
| ۶۴۰۰۰ | ۱۱ |
| ۳۵۰۰۰ | ۱۱ |
| ۲۴۰۰۰ | ۱۰ |
| ۵۰۰۰۰ | ۹ |
| ۲۶۰۰۰ | ۹ |
| ۳۱۰۰۰ | ۸ |
| ۶۸۰۰۰ | ۷ |
| ۵۴۰۰۰ | ۷ |
| ۳۹۰۰۰ | ۶ |
| ۲۷۵۰۰ | ۶ |
| ۲۲۵۰۰ | ۶ |
| ۱۹۸۰۰ | ۵ |
| ۱۴۰۰۰ | ۵ |
| ۲۱۵۰۰ | ۴ |
| ۴۴۰۰۰ | ۴ |
| ۱۰۲۰۰۰ | ۳ |
| ۸۰۰۰۰ | ۳ |
| ۹۰۰۰۰ | ۳ |
| ۷۲۰۰۰ | ۳ |
| ۴۲۰۰۰ | ۲ |
| ۲۹۰۰۰ | ۲ |
| ۶۰۰۰۰ | ۲ |

- بالاترین دامنه تشابه ۵۵-۹۵ درصد بین ستون ۵ (نمونه بین انگشتان پا) با سایر ستون‌ها و پائین‌ترین دامنه تشابه ۹۴-۷۵ درصد بین ستون ۸ (ایزوله کاندیدا آلبیکنس) با سایر ستون‌ها

بحث

هدف از انجام این تحقیق تعیین و مشاهده پروتئین‌های دیواره سلولی ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس و سوش کاندیدا گلابراتا با روش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل سولفات و مقایسه هر کدام از ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس با یکدیگر و به صورت مجزا با سوش کاندیدا گلابراتا بوده است.

نقش پروتئین‌های دیواره سلولی در چسبیدن به بافت و سلول‌های میزبان توسط محققین مختلف به اثبات رسیده است، چرا که چسبندگی نخستین گام در کلونیزاسیون و ایجاد بیماری توسط کاندیدا آلبیکنس است. پروتئین‌هایی نظیر hsp70 و hsp90 که در شرایط استرس، سلول را حفظ می‌کند در دیواره سلولی یافت

تحقیقات انجام شده بر روی این دسته از ترکیبات می‌باشد. در مطالعاتی که Brawner و همکاران انجام داده‌اند، ثابت کرده‌اند از بین ترکیبات مختلف دیواره سلولی، مانوپروتئین بخش اعظم فعالیت‌های آنتی ژنیک کاندیدا آلبیکنس را به خود اختصاص داده است (۱۹). مطابق جدول ۳ پروتئین‌های دیواره سلولی با ۵۵ درصد تشابه بین ستون‌های ۵ (نمونه بین انگشتان پا) و ۱۱ (نمونه ناخن) پائین‌ترین درصد و پروتئین‌های دیواره سلولی با ۹۵ درصد تشابه بین ستون‌های ۱ (نمونه ناخن) و ۱۳ (نمونه دهان)، ستون‌های ۲ (نمونه کشاله ران) و ۵ (نمونه بین انگشتان پا)، ستون‌های ۳ (نمونه واژن) و ۱۳ (نمونه دهان)، ستون‌های ۵ (نمونه بین انگشتان پا) و ۶ (نمونه بین انگشتان دست) و ستون‌های ۸ (ایزوله استاندارد کاندیدا آلبیکنس) و ۱۲ (نمونه کشاله ران) بالاترین درصد را به خود اختصاص می‌دهند. در این میان نمونه استاندارد آلبیکنس و نمونه کاندیدا گلابراتا ۸۲ درصد تشابه را نشان می‌دهند. چنانچه ضریب دایس (درصد تشابه) برای ۲ ایزوله ۹۵ درصد و بالاتر باشد برای آن دو ایزوله الگوی یکسان در نظر گرفته می‌شود. با توجه به جدول ۳ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که برخی از ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی یکسان هستند و کاملاً با یکدیگر مشابه هستند. با توجه به میانگین تشابه کل ایزوله‌ها با یکدیگر در جدول ۴ مشخص می‌شود که ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس تا حد زیادی تفاوت الگوی الکتروفورزی در شرایط دنا توره (SDS-PAGE) را ندارند. به عبارت دیگر الگوی الکتروفورزی همه ایزوله‌های کاندیدایی میانگین اختلافی بین ۳۹-۶٪ را از خود نشان می‌دهند. از طرفی در مقایسه بین نمونه‌های دیواره سلولی گونه گلابراتا با استاندارد کاندیدا آلبیکنس ۱۸ درصد اختلاف، گلابراتا با نمونه ناخن (ستون ۱) ۲۹ درصد اختلاف، گلابراتا با نمونه بین انگشتان پا (ستون ۵) ۸ درصد اختلاف و گلابراتا با نمونه واژن (ستون ۴) ۲۸ درصد اختلاف گزارش شد.

بیشترین وزن مولکولی مشابه بین نمونه‌های دیواره سلولی ایزوله‌های کاندیدایی، وزن مولکولی ۶۴ و ۳۵ کیلودالتون با ۱۱ مورد، ۲۴ کیلودالتون در ۱۰ مورد، ۵۰ و ۲۶ کیلودالتون در ۹ مورد و ۳۱ کیلودالتون در ۸ مورد می‌باشد (جدول ۵). کمترین وزن مولکولی مشابه در پروتئین‌های دیواره سلولی در بین

می‌شوند. به علاوه مانو پروتئین‌های سطحی در کاندیدا به عنوان ایمونوژن‌های قوی و محرک پاسخ‌های ایمنی در طول کاندیدیازیس محسوب می‌شوند (۱۷). لذا در این تحقیق به واسطه اهمیت پروتئین‌های دیواره سلولی الگوی الکتروفورزی ایزوله‌های مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه و تشابهات یا تفاوت‌های آنها مورد بررسی قرار گرفتند.

در الکتروفورز نمونه‌های پروتئین دیواره سلولی با روش SDS-PAGE کمترین تعداد باندها مربوط به نمونه ناخن با ۷ باند و بیشترین تعداد باند مربوط به نمونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027) با ۱۵ باند مشخص شدند. بالاترین وزن مولکولی ۱۱۰ کیلودالتون مربوط به نمونه ناخن و پائین‌ترین وزن مولکولی ۱۴ کیلودالتون مربوط به نمونه‌های ناخن، کشاله ران، واژن، نمونه بین انگشتان دست و پا بود (جدول ۲).

در مطالعاتی که Elorza و همکاران انجام دادند توانستند ۴۰ باند را از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس با وزن مولکولی ۱۵ تا ۱۲۰ کیلودالتون جدا نمایند (۱۶).

در مطالعه حاضر از نمونه‌های ناخن، کشاله ران و واژن هر کدام دو نمونه جمع‌آوری شده که تعداد باندهای مقایسه شده با هم در مورد نمونه‌های ناخن (۷ و ۱۰ باند) و واژن (۱۴ و ۱۵ باند) اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ولی اختلاف مشخصی بین ۲ نمونه کشاله ران وجود داشت که احتمال اختلاف آن مربوط به نوع استرین و شرایط نگهداری این دو نمونه ممکن است باشد. Ana Iain و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که با بررسی قطعات -N ترمینال پروتئین یک فاز میسلیومی کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش الیزا می‌توان به تشخیص کاندیدیازیس منتشره پرداخت (۹). بررسی بیماران توسط Liang cao و همکاران در سال ۱۹۹۹ در هفده بیمار از بیست و پنج بیمار نشان از واکنش مثبت با حضور مانوپروتئین IP در سرم مبتلایان به پنی سیلیوز داشت (۱۸).

عامل کاندیدا آلبیکنس دارای دو دسته آنتی ژن مختلف در دیواره سلولی و همچنین سیتوپلاسمی می‌باشد. از بین این دو دسته، مهمترین و اثربخش‌ترین آنها در تحریکات و پاسخ‌های ایمنی بدن انسان آنتی ژن‌های دیواره سلولی می‌باشد. لذا بیشترین مطالعات و

pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 313.

5. Sullivan DJ, Westemeng TJ, Haynes KA. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiolo* 1995; 141:1507.

6. Meri T, Blom AM, Hartmann A, Lenk D, Meri S, Zipfel PF. The Hyphal and Yeast Forms of *Candida albicans* Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. *Infect Immun*. Nov 2004; 72(11): 6633-6641.

7. Cow NAR, Hube B, Bailey DA. Genes associated with dimorphism and virulence of *Candida albicans*. *Can J Botany* 1995; 73: S335.

8. Safdar A, Chaturvedi V, Cross EW, Park S, Bernard EM, Armstrong D, Perlin DS Prospective Study of *Candida* Species in Patients at a Comprehensive Cancer Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(7): 2129-2133.

9. Laín A, Elguezabal N, Brena S, García-Ruiz JC, del Palacio A, Moragues MD, Pontón J. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein 1. *BMC Microbiol* 2007; 7:35.

10. Gorschlüter M, Mey U, Strehl J, Schmitz V, Rabe C, Pauls K, Ziske C, Schmidt-Wolf IG, Glasmacher A. Invasive fungal infections in neutropenic enterocolitis: A systematic analysis of pathogens, incidence, treatment and mortality in adult patients. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 35.

نمونه‌های کاندیدیایی، وزن مولکولی ۴۲، ۲۹ و ۶۰ کیلودالتون در ۲ مورد ۷۲، ۹۰، ۸۰ و ۱۰۲ کیلودالتون در ۳ مورد دیده شده است (جدول ۵).

از طرف دیگر در بررسی تعداد وزن‌های مولکولی مشابه بین پروتئین‌های دیواره سلولی کاندیدا گلابراتا با پروتئین‌های دیواره سلولی سایر نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس، بیشترین اوزان مشابه ۶۴ و ۳۵ کیلودالتون با ۱۰ مورد، ۲۴ کیلودالتون با ۹ مورد، ۲۶ کیلودالتون با ۸ مورد می‌باشند (جدول ۶). کمترین شباهت در وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون در ۱ مورد و ۴۴ کیلودالتون در ۳ مورد می‌باشد (جدول ۶).

با توجه به تحقیقات انجام شده توسط سنتاندرو (Sentandreu) و همکاران، آنها گزارش کردند که اوزان ۳۱ تا ۳۵ کیلودالتون را در گونه‌های مختلف قارچی یک مولکول مانوپروتئینی است که کاملاً محافظت شده است و نقش مهمی در معماری ساختمان قارچ به عهده دارد. این داده‌ها در خصوص تشابه نمونه کاندیدا گلابراتا با سایر نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس میانگین تشابه ۷۲٪ را معلوم ساخت.

References

1. Calderone R, NAR. Gow. Host recognition by *Candida* species, In R. A. Calderone (ed.), *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington D.C 2002; 67-86.
2. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9:327-335.
3. De Las Peñas A, Pan SJ, Castaño I, Alder J, Cregg R, Cormack BP. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes, Dev* 2003; 17(18): 2245-2258.
4. Odds FC, Rinaldi MG, Cooper CR Jr. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of

- 11-** Gruber A, Lell CP, Speth C, Stoiber H, Lass-Flörl C, Sonneborn A, Ernst JF, Dierich MP, Würzner R. Human immunodeficiency virus type 1 Tat binds to *Candida albicans*, inducing hyphae but augmenting phagocytosis in vitro. *Immunology* 2001; 104(4): 455-461.
- 12.** Haran E, Vartivarian S, Anaissie E, et al: Primary *Candida pneumonia*. Experience at a large cancer center and review of the literature. *Medicine* 1993; 72: 137.
- 13.** Savolainen J, Viander M, Koivikko. IgE-IgA-IgG-antibody responses to carbohydrate and protein antigens of *Candida albicans* in asthmatic children. *Allergy Jan* 1990; 45(1): 54-63.
- 14.** VEDIYAPPAN G, BIKANDI J, BRALEY R, CHAFFIN WL. Cell surface proteins of *Candida albicans*: preparation of extracts and improved detection of proteins. *Electrophoresis* 2000; 21(5): 956-961.
- 15.** Rosa E, Rosa R, Pereira C, Boriollo M, Hofling J. Analysis of parity between protein-based electrophoretic methods for the characterization of oral *Candida* species. *Mem inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(6): 801-6.
- 16.** Elorza M V, Mormeneo S, García de la Cruz F, Gimeno C, Sentandreu R. Evidence for the formation of covalent bonds between macromolecules in the domain of the wall of *Candida albicans* mycelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162:1118-1125.
- 17.** Lajeun W, Chaffin, José Luis López-Ribot, Manuel Casanova, Daniel Gozalbo, and José P. Martínez. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(1): 130-180.
- 18.** Cao L, Chan KM, Chen D, Vanittanakom N, Lee C, Chan CM, Sirisanthana T, Tsang DN, Yuen KY. Detection of Cell Wall Mannoprotein Mp1p in Culture Supernatants of *Penicillium marneffei* and in Sera of Penicilliosis Patients. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 981-986.
- 19.** Brawner DL, Cutler JE. Ultrastructural and biochemical studies of two dynamically expressed cell surface determinants on *Candida albicans*. *Infect. Immun* 1986; 51: 327-336.