

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف CO₂ در بیان ژن HSP70 در قارچ‌های درماتوفیت ترایکوفایتون روبروم و میکروسپوروم کانیس

سیما دارابیان^۱، دکتر ساسان رضایی^۲، دکتر پیروش کردبچه^۳، محمد رضا صفری^۴

نویسنده‌ی مسئول: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی dsima2004@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۱۲/۱۰ پذیرش: ۸۹/۱۰/۷

چکیده

زمینه و هدف: ترایکوفایتون روبروم شایع‌ترین عامل درماتوفیتوزیس در پوست و ناخن انسان و میکروسپوروم کانیس یکی از درماتوفیت‌های مهم حیوان دوست و قابل انتقال به انسان می‌باشد و HSP70، یک پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتونی در قارچ‌ها است که در این مطالعه به بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف CO₂ در بیان این ژن در قارچ‌های مزبور پرداخته شده است.

روش بررسی: نمونه‌های قارچی از تراشه‌های پوستی و ناخن بیماران مبتلا به کچلی ناخن جدا سازی و طبق روش‌های استاندارد اسپور نمونه‌های مزبور ایزوله و در محیط سابورودکستروز مایع کشت داده شده و تحت تاثیر غلظت‌های مختلف CO₂ (۳، ۵ و ۱۰ درصد) در فاصله‌های زمانی ۲، ۴ و ۷ روزه و کشت‌های کنترل، بدون CO₂ در فاصله زمانی ۷ روزه در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بیان ژن HSP70 در توده‌های میسلیمی حاصل به روش RT-PCR در سطح mRNA مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده با ژن بتا اکتین مقایسه شدند. **یافته‌ها:** نتایج این پژوهش نشان داد که حداکثر تغییرات تحت غلظت‌های مختلف CO₂ (۳، ۵ و ۱۰ درصد) در حداکثر فاصله زمانی (۷ روزه) بوده است و بیان ژن HSP70 تحت شرایط گفته شده نشان دهنده‌ی تغییرات متفاوتی در قارچ‌های مزبور می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، بیان ژن HSP70 تحت تاثیر غلظت‌های مختلف CO₂ در ترایکوفایتون روبروم نسبت به کنترل اثر کاهش دهنده‌ی (منفی) و در میکروسپوروم کانیس نسبت به کنترل اثر افزایش‌دهنده‌ی (مثبت) داشته است.

واژگان کلیدی: درماتوفیت، ترایکوفایتون روبروم، میکروسپوروم کانیس، ژن HSP70

مقدمه

مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل بیماری‌های قارچی جلدی بوده، در بین آن‌ها، ترایکوفایتون روبروم یکی از عوامل شایع کچلی در انسان به‌خصوص کچلی، کشاله‌ی ران، دست، پا و ناخن و میکروسپوروم کانیس از مهم‌ترین درماتوفیت‌های بیماری‌زای حیوان دوست در سگ و گربه، با ایجاد کچلی

عفونت‌های قارچی جلدی یکی از شایع‌ترین انواع میکوزها می‌باشد و در بین آن‌ها نیز درماتوفیتوزیس از شیوع بیشتری برخوردار است. درماتوفیتوزیس عفونت جلدی حاصل از قارچ‌های جلدی کراتینوفیلیکی است که تحت نام کلی درماتوفیت شناخته می‌شوند (۱-۳). درماتوفیت‌ها، از

۱- کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۲- دکترای تخصصی قارچ شناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دکترای تخصصی قارچ شناسی پزشکی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دارد و از آنجایی که CO₂ نیز یکی از فاکتورهای مهم و حیاتی سلول‌ها می‌باشد، این مطالعه و نتایج حاصل از آن می‌تواند علاوه بر بررسی هدف اصلی یعنی بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف CO₂ در بیان ژن HSP70 در قارچ‌های درماتوفیت تریکوفایتون روبروم و میکروسپوروم کانیس ایزوله شده از بیماران، زیر بنایی برای تحقیقات بعدی در زمینه‌ی نقش HSPs و دستیابی بر اطلاعات و دانش بیشتر برای سنجش عملکرد CO₂ در فیزیولوژی و پاتوژنز قارچ‌های درماتوفیت و نحوه‌ی عملکرد آن‌ها باشد.

روش بررسی

تهیه‌ی کشت انبوه از قارچ‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی (Experimental) برای تهیه‌ی کشت قارچ‌های تریکوفایتون روبروم (*T. Rubrum*) و میکروسپوروم کانیس (*M. Canis*) از نمونه‌های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بخش قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده شد. نمونه‌ی ترشه‌های پوستی و ناخن جدا شده از بیماران در محیط‌های سابوردکستروز آگار ساده (SDA مرک آلمان) و سابوردکستروز آگار حاوی سیکلوهگزامید (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و کلرامفنیکل (۴۰ میلی‌گرم در لیتر) (SCC) در پلیت یک‌بار مصرف و لوله‌های آزمایش شیشه‌ای به‌صورت نشاکاری کشت داده شده، و به مدت یک هفته در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها و لوله‌ها از نظر ظاهر بینی (ماکروسکوپی) بررسی شده، جهت مطالعه‌ی ریز بینی (میکروسکوپی)، با روش اسلاید کالچر (کشت روی لام) لام تهیه شد. جهت بررسی اسلاید کالچرها، لام‌های روی ژلوزها را با استفاده از پنس استریل برداشته و بر روی لام‌های تمیز حاوی یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو گذاشته، همچنین ژلوزهای حاوی قارچ‌ها از روی لام‌ها توسط پنس برداشته، به لام‌ها یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو اضافه شده، روی آن‌ها یک لام تمیز قرار گرفته،

(Ring Worm) و قابل انتقال به انسان با ایجاد کچلی سر (*Tinea Capitis*) و کچلی بدن (*Tinea Corporis*) و کچلی ناخن (*Tinea Unguium*) می‌باشد (۶-۳). گاز دی‌اکسید کربن (CO₂) یکی از فاکتورهای مهم اکولوژیکی بوده که نقش حیاتی در واکنش‌های وابسته به تنفس، فتوسنتز و پاتوژنز سلول‌های قارچی و باکتریایی دارد. میزان CO₂ در اتمسفر هوا حدود (۰/۰۳۶ درصد) و غلظت آن در بدن پستانداران نزدیک به (۵ درصد) می‌باشد (۱۱-۷). از آنجایی که همه‌ی موجودات در برخورد با عوامل استرس‌زا باید بتوانند برای حفظ بقای خود به نوعی، مقاومت کنند، بسیاری از موجودات در برخورد با این استرس‌ها به‌ویژه استرس‌های حرارتی، پروتئین‌هایی موسوم به پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها در شکل‌گیری، انتقال، خمیدگی (Folding) و حفظ ویژگی‌های پروتئین‌ها در زمان بروز شوک‌ها و استرس‌های محیطی نقش بسیار مهمی دارند (۱۳ و ۱۲). توالی نوکلئوتیدی ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها از دسته‌ی ۷۰ کیلو دالتونی (HSP70) در تریکوفایتون روبروم (*Tri Chophyton Rubrum*) و میکروسپوروم کانیس (*Microsporom Canis*) مشخص شده است. مطالعات انجام شده نشان داده است که تحت استرس‌های محیطی مانند افزایش دما و اشعه‌ی ماورای بنفش B، بیان ژن مزبور افزایش یافته، منجر به سنتز پروتئین شوک حرارتی و ایجاد مقاومت در سلول‌های قارچ‌های مزبور می‌شود (۱۶-۱۴). با وجود بررسی‌های متعدد در رابطه با نقش حیاتی CO₂ در توده‌های زنده‌ی میکروبی و سلول‌های قارچی و پاتوژنز آن‌ها و با توجه به نقش مهم مولکول‌های گرمایی (HSPs) به عنوان یک عامل مقاومت سلولی در برابر شوک‌های ذکر شده، ولی هنوز شواهدی از تأثیر غلظت‌های مختلف CO₂ در بیان ژن مزبور در قارچ‌ها در دسترس نمی‌باشد (۱۷ و ۱۰، ۷). لذا با وجود گسترش جهانی عفونت با این قارچ‌ها، اطلاعات مولکولی اندکی در مورد آن‌ها وجود

محلول رویی جدا و به آن ایزوپروپانل اضافه گردید. به مدت یک ساعت در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز شدند، سپس محلول رویی خالی و به رسوب باقی مانده مجدداً بافر گوانیدین ایزوتیوسیانات و ایزوپروپرنل اضافه گردید. مخلوط حاصل یک ساعت در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز شد. پس از ۵ دقیقه سانتیفریژ نهایی، محلول رویی خالی و رسوب حاصل با الکل ۱۰۰ درصد شستشو و بعد خشک شدند. در نهایت رسوب RNA های حاصله در بافر داغ تریس EDTA (TE8) حل گردید. جهت اطمینان از نتیجه‌ی استخراج صحیح از محلول‌های حاصله، روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز انجام گردید.

ساخت cDNA (DNA مکمل) برای تکثیر بخش‌های مختلف ژن و بررسی بیان ژن HSP70 واکنش RT-PCR کیفی انجام شد. این واکنش شامل دو مرحله می‌باشد: در مرحله‌ی اول از روی RNA های تام، cDNA های مربوطه ساخته شد، که برای این منظور از کیت سنتز cDNA با مشخصات (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis) Kit # K1621 از شرکت Fermentas استفاده شده، cDNA های مزبور برای استفاده‌ی بعدی در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله‌ی دوم توسط پرایمرهای طراحی شده، قسمت‌های مختلف cDNA تکثیر گردید. البته قبل از انجام مرحله‌ی دوم از cDNA نمونه‌های قارچی *T. Ruberum*، *M. Canis* میکرولیتر تهیه گردید تا از نظر کنترل بیان ژن در RT-PCR غلظت یکسانی از cDNA داشته باشند. در انجام مرحله‌ی دوم واکنش RT-PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر ساخته شد. این واکنش شامل ۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X و ۲ میکرولیتر کلریدمنیزیم به همراه ۲/۵ میکرولیتر از جفت پرایمرهای اختصاصی سنتز و ضد سنتز با توالی:

Sense: 5' ATGGCTCCCGCAGTTGGTATC3'

Antisense: 3' CACCTCCATCACCCGTGCTCG5'

سپس از نظر میکروسکوپی مطالعه شدند. بعد از حصول اطمینان از جداسازی قارچ‌های مذکور جهت جمع‌آوری اسپور نمونه‌ها در چند پلیت حاوی محیط کشت SCC، به‌صورت نشاکاری مجدداً کشت داده شدند.

محیط و شرایط کشت CO₂ دار: اسپور نمونه‌های قارچی *M. Canis* و *T. Rubrum* جدا سازی شده از تراشه‌های پوستی و ناخن بیماران مبتلا طبق روش گفته شده در بالا، روی محیط سابورو دکستروز مایع (SDB مرک آلمان) با pH برابر ۵/۶ ± ۰/۲ کشت داده شده، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف CO₂ (۳، ۵ و ۱۰ درصد) و هر بار در فاصله‌ی زمانی (۲، ۴ و ۷ روزه) در انکوباتور CO₂ دار و کشت‌های کنترل (بدون CO₂) در فاصله‌ی زمانی ۷ روزه در انکوباتور ساده با دمای ثابت ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس توده‌های میسلیمی حاصل جمع‌آوری شده، جهت شستشو توسط محلول فسفات بافرسالین ۱۰ درصد (۱XPBS) به مدت ۵ دقیقه و برای ۲ بار سانتیفریژ شده، با استفاده از نیتروژن مایع جهت استخراج RNA تام از آنها پودر میسلیم تهیه گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز - نسخه برداری معکوس به‌طور همزمان (RT-PCR) استخراج RNA: RNA تام از پودر میسلیمی نمونه‌های قارچی *M. Canis* و *T. Rubrum* کشت داده شده در غلظت‌های مختلف CO₂ (۳، ۵ و ۱۰ درصد) در فاصله‌های زمانی (۲، ۴ و ۷ روزه) و کشت‌های کنترل (بدون CO₂) ۷ روزه، طبق روش گوانیدین ایزوتیوسیانات (۴MGITC) استخراج گردید. برای این منظور به‌طور خلاصه، به پودر میسلیمی نمونه‌های مذکور بافر گوانیدین ایزوتیوسیانات ۴ مولار اضافه نموده، محتویات حاصل به لوله‌ی هموژنایزر منتقل و با انجام عمل هموژنیزاسیون، تمام سلول‌های قارچی به‌طور کامل تخریب شدند، سپس به محلول حاصل به نسبت ۱ به ۱۰ حجم اولیه، استات سدیم ۳ مولار و فنل اسیدی و کلروفرم اضافه شد و با ۵ دقیقه سانتیفریژ،

حدود ۳۰۰ جفت باز، انجام گرفته، پرایمرها توسط شرکت سینا ژن ایران و به شرح توالی زیرستزگردید:

Primr Dar-S1: 5' ACT ACA GCT CCG GAA
TGT GC 3'Nt: 20 OD:12

Primer Dar-As1: 5' TCG CAG GGT TAAG GAT
ACC AC 3'NT: 20 OD: 12

با استفاده از پرایمرهای ژن Beta-Actin و cDNA نمونه قارچ‌های مزبور با غلظت‌های یکسان، دقیقاً طبق پروتکل در بند RT-PCR، تمام مراحل انجام شده، جهت اطمینان از نتیجه‌ی کار، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید درکنار سایز مارکر الکتروفورز شدند.

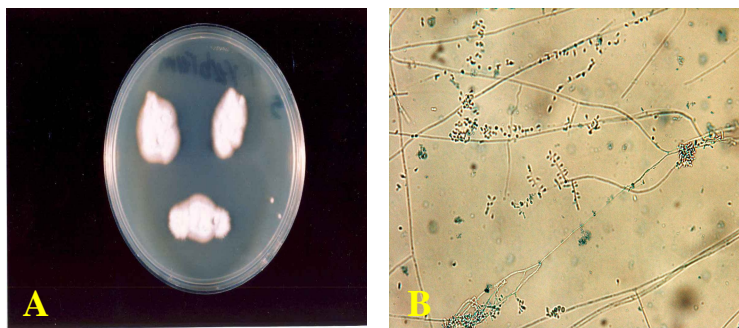
یافته‌ها

در بررسی نمونه‌های ایزوله شده از بیماران، *T. Rubrum* از نظر ظاهر بینی روی محیط SCC دارای کلنی، کرکی، پرزی، سفید رنگ با مرکز برآمده و چین‌دار (شکل A ۱) و در بررسی ریز بینی لام‌های اسلاید کالچر با رنگ‌آمیزی لاکتوفنل کاتن بلو، دارای میسلیم‌های نازک با تیغه‌ی میانی و میکروکونی‌های کوچک و اشکی شکل به تعداد زیادی درکنار میسلوم‌ها مشاهده شده، دارای ماکروکونی‌های کم و مدادی شکل و چند خانه می‌باشد (شکل B ۱).

در بررسی ظاهر بینی قارچ *M. Canis* روی محیط SCC دارای کلنی، کرکی با شیارهای شعاعی، پرزی سفید تا زرد روشن با رشته‌های هوایی (شکل A ۲) و با بررسی لام‌های رنگ‌آمیزی شده طبق روش بالا از نظر ریز بینی، دارای میسلیم‌های نازک با تیغه میانی و ماکروکونی‌های دوکی شکل با جدار ناصاف، خاردار و با زائده‌ی انتهایی پستانی شکل با ۳ تا ۱۵ سلول می‌باشند و میکروکونی‌ها ریز و کمتر از ماکروکونی‌ها در کنار میسلیم دیده می‌شوند (شکل B ۲).

و ۱ میکرولیتر از dNTP Mix و ۱ میکرولیتر از Taq DNA پلی‌مراز (سینا ژن ایران) و آب مقطر استریل بود که در انتها به هر واکنش به میزان ۵۰۰ نانو گرم بر میکرولیتر از cDNA های مذکور اضافه شد. واکنش PCR جهت تکثیر ژن HSP70 توسط دستگاه Thermal Cycler (آلمانی) برای ۳۵ دور انجام شد. هر سیکل شامل سه حرارت، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه بود. برای واسرشته‌سازی اولیه (Denaturation)، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه برای یک دور در حرارت ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و در انتها نمونه‌ها برای یک دور به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند.

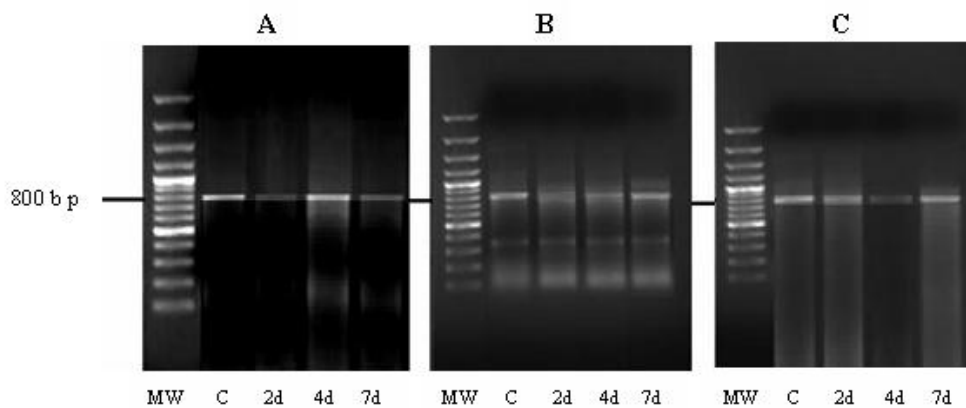
بیان ژن HSP70: به منظور سنجش بیان ژن HSP70 در قارچ‌های *T. Rubrum* و *M. Canis* که از طریق RT-PCR کیفی انجام پذیرفته بود، به میزان ۵ میکرولیتر از محصولات PCR درکنار سایز مارکر 100 bp DNA Ladder Plus (شرکت فرمتاز)، روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و سپس با استفاده از دستگاه Tran Illuminator (UK, Syngene) باندها مشاهده و عکس‌برداری شدند و میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های مزبور براساس قدرت روشنایی (میزان شدت رنگ ایجاد شده بین اتیدیوم بروماید و DNA) باندهای حاصل در الکتروفورز، به عنوان معیاری جهت سنجش افزایش، کاهش و یا ثبات بیان ژن HSP70 در قارچ‌های ذکر شده، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور کنترل عمل بیان ژن HSP70 در قارچ‌های مزبور، تحت شرایط و براساس روش گفته شده در بالا، از یک ژن با قابلیت ثبات در شرایط مختلف (House Keeping Gene) استفاده گردید. این ژن Beta-Actin در قارچ *T. Rubrum* بود که طراحی پرایمر از روی ژن موجود در Gen Bank به شماره دسترسی AY525329 و برای تکثیر قطعه‌ی ژنی به بزرگی



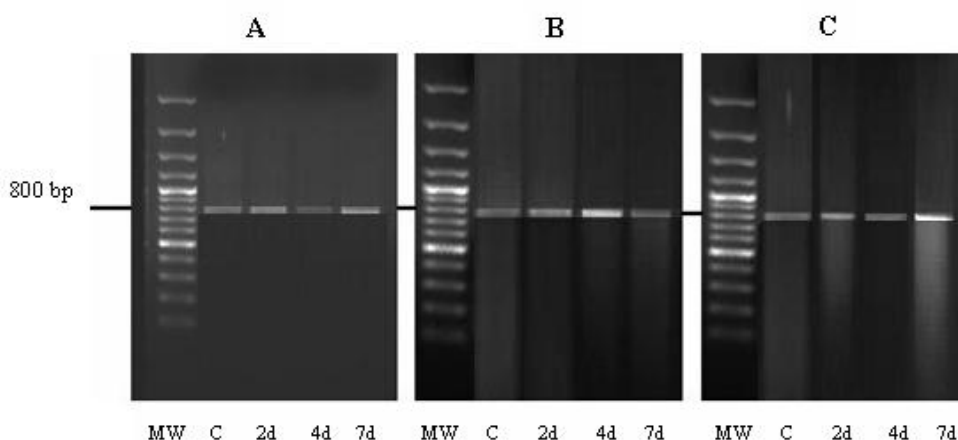
شکل ۱: بررسی ظاهر بینی و ریز بینی قارچ ترایکوفایتون رویروم *A* سطح کلنی *T. Rubrum* در محیط کشت SCC
B منظره‌ی ریزبینی *T. Rubrum* با درشت‌نمایی ۴۰۰



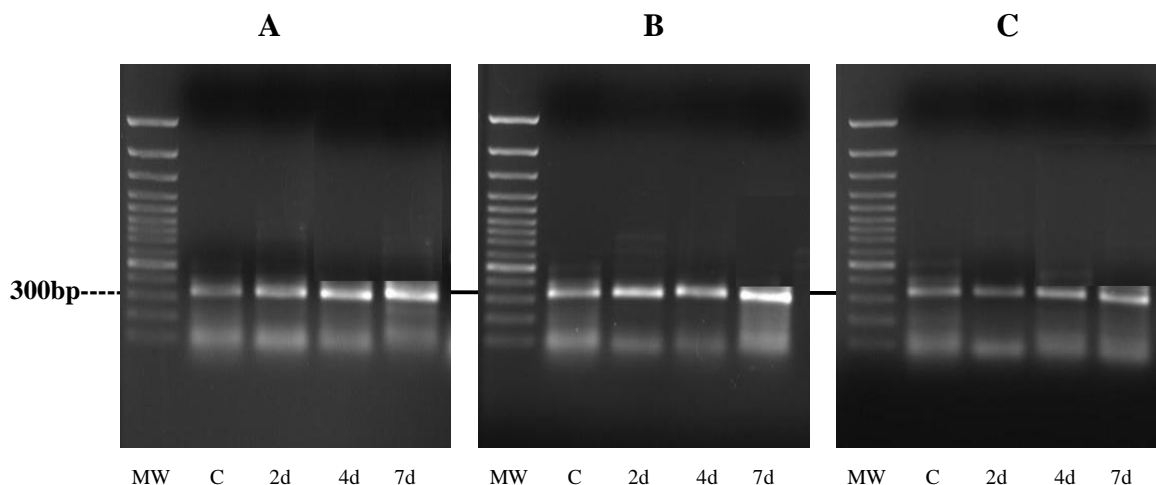
شکل ۲: بررسی ظاهر بینی و ریز بینی قارچ میکروسپوروم کانیس *A* سطح کلنی *M. Canis* در محیط کشت SCC
B منظره‌ی ریزبینی قارچ *M. Canis* با درشت‌نمایی ۴۰۰



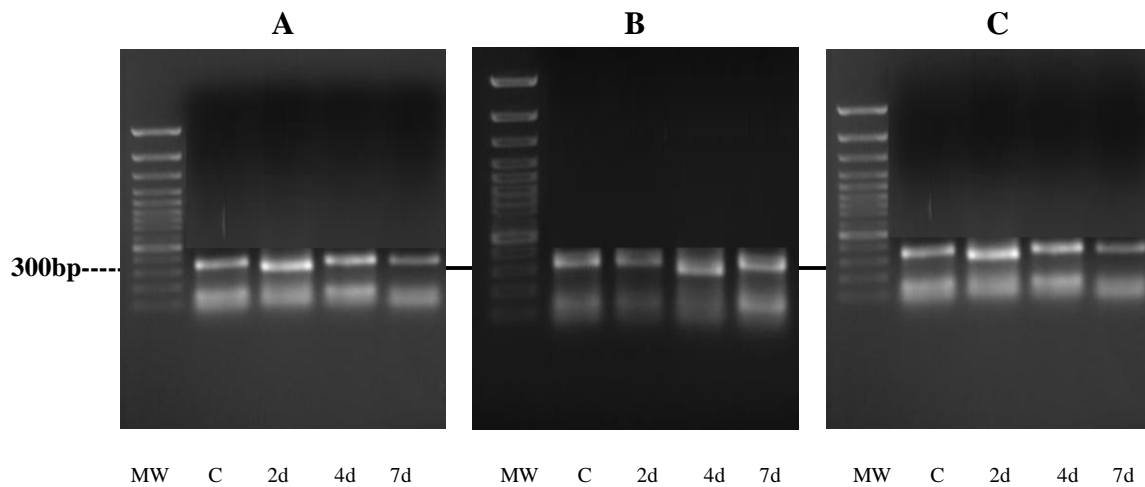
شکل ۳: RT-PCR کیفی در بیان ژن *HSP70* در قارچ *T. Rubrum*، در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف CO_2 و کشت کنترل بدون CO_2 (C) در فاصله‌ی زمانی ۲ روزه (2d)، ۴ روزه (4d) و ۷ روزه (7d)
A: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (۸۰۰ bp) ژن *HSP70* در CO_2 در مقایسه با کنترل، *B*: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (۸۰۰ bp) ژن *HSP70* در CO_2 ۳٪ در مقایسه با کنترل، *C*: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (۸۰۰ bp) ژن *HSP70* در CO_2 ۱۰٪ در مقایسه با کنترل
(MW = سایز مارکر، نشان‌گر وزن مولکولی استاندارد)



شکل ۴. RT-PCR کیفی در بیان ژن HSP70 در قارچ *M. Canis*، در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف CO₂ و کشت کنترل بدون CO₂ (C) در فاصله‌ی زمانی ۲ روزه (2d)، ۴ روزه (4d) و ۷ روزه (7d)
 A: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (800 bp) ژن HSP70 در CO₂ ۳٪ در مقایسه با کنترل، B: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (800 bp) ژن HSP70 در CO₂ ۵٪ در مقایسه با کنترل، C: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (800 bp) ژن HSP70 در CO₂ ۱۰٪ در مقایسه با کنترل (MW = سایز مارکر، نشانگر وزن مولکولی استاندارد)



شکل ۵. سنجش بیان ژن Beta-actin در *T. Rubrum* با غلظت‌های مختلف CO₂ و کشت کنترل بدون CO₂ (C) در فاصله‌ی زمانی ۲ روزه (2d)، ۴ روزه (4d) و ۷ روزه (7d)، با استفاده از پرایمرهای *Dar SI*, *ASI*
 A: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (300 bp) ژن Beta-actin در CO₂ ۳٪ در مقایسه با کنترل، B: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (300 bp) ژن Beta-actin در CO₂ ۵٪ در مقایسه با کنترل، C: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (300 bp) ژن Beta-actin در CO₂ ۱۰٪ در مقایسه با کنترل (MW = سایز مارکر، نشانگر وزن مولکولی استاندارد)



شکل ۶: سنجش بیان ژن *Beta-actin* در *M. Canis* با غلظت های مختلف CO_2 و کشت کنترل بدون CO_2 (C) در فاصله‌ی زمانی ۲ روزه (2d)، ۴ روزه (4d) و ۷ روزه (7d)، با استفاده از پرایمرهای *Dar S1*, *AS1*
 A: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (300 bp) ژن *Beta-actin* در 3% CO_2 در مقایسه با کنترل، B: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (300 bp) ژن *Beta-actin* در 10% CO_2 در مقایسه با کنترل، C: تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (300 bp) ژن *Beta-actin* در 0% CO_2 در مقایسه با کنترل (MW = سایز مارکر، نشانگر وزن مولکولی استاندارد)

مشاهده گردید، به نحوی که حداقل میزان بیان ژن نسبت به کنترل در روز چهارم بود که پس از آن مشابه با شرایط ملاحظه شده در غلظت ۵ درصد، افزایش بیان پس از هفت روز به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش را نشان داد (شکل C ۳). با توجه به تغییرات و کاهش بیان ژن در تمامی سطوح نسبت به کنترل، به طور نسبی حداکثر این کاهش در انکوباسیون با غلظت‌های ۳ و ۵ درصد از CO_2 ، مشاهده گردید. در *M. Canis* تحت غلظت ۳ درصد از CO_2 ، بعد از دو روز نسبت به کنترل افزایش بیان ژن مشاهده شد که این افزایش در فاصله‌ی زمانی چهار روز کاهش یافته، پس از هفت روز بیان ژن میزان مشابه با کنترل را نشان داد (شکل A ۴). در انکوباسیون با غلظت ۵ درصد از CO_2 ، بعد از دو روز نسبت به کنترل میزان بیان ژن افزایش یافته، در فاصله‌ی چهار روز انکوباسیون به حداکثر خود رسید. پس از هفت روز، نسبت به چهار روز اندکی کاهش را نشان می‌داد (شکل B ۴). تغییرات

RT-PCR: با توجه به اهمیت موضوع یعنی بررسی بیان ژن HSP70 در سلول‌های قارچی، اثر غلظت‌های مختلف CO_2 (۳، ۵ و ۱۰ درصد) در فاصله‌های زمانی (۲، ۴ و ۷ روزه) در کنار کشت‌های کنترل (بدون CO_2) در فاصله‌ی زمانی ۷ روزه در بیان ژن و میزان تغییرات معین شد. با استفاده از RT-PCR کیفی، مشخص شد تکثیر بخش‌های مختلف ژن HSP70 و بیان ژن در قارچ *T. Rubrum* تحت غلظت ۳ درصد از CO_2 ، روز دوم نسبت به کنترل یک کاهش شدید را نشان داد، که با اندکی افزایش بیان طی روزهای چهارم و هفتم یک روند ثابت در بیان ژن دیده شد (شکل A ۳). در انکوباسیون با غلظت ۵ درصد از CO_2 ، روز دوم نسبت به کنترل کاهش بیان ژن مشاهده شده، بیان ژن از روز چهارم تا هفتم یک روند صعودی را نشان می‌داد (شکل B ۳). در شرایط انکوباسیون با غلظت ۱۰ درصد از CO_2 ، روز دوم نسبت به کنترل مجدداً کاهش بیان ژن با شتابی ملایم‌تر

بیان ژن در غلظت ۱۰ درصد از CO₂ نیز مشاهده گردید، به نحوی که بعد از دو روز نسبت به کنترل افزایش بیان ژن در فاصله‌ی چهار روز انکوباسیون بیان ژن تقریباً به میزان کنترل کاهش یافته، سپس بعد از هفت روز انکوباسیون مجدداً افزایش بیان ژن مشاهده گردید (شکل C ۴). با توجه به مشاهدات و افزایش بیان ژن در تمامی سطوح نسبت به کنترل، به‌طور نسبی حداکثر این افزایش در انکوباسیون با غلظت ۱۰ درصد از CO₂، در حداکثر فاصله زمانی نسبت به کنترل مشاهده گردید.

بحث

در سال‌های اخیر تحقیقات نسبتاً وسیعی بر روی جنبه‌های مولکولی قارچ‌های *M. Canis* و *T. Rubrum* انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان بررسی‌های مربوط به پروتئین‌های شوک حرارتی HSP70 را نام برد.

همچنین، تحقیقات وسیعی روی ژن مربوط به تولید، پروتئین‌های شوک حرارتی HSP70 و عوامل موثر در افزایش بیان ژن مزبور در موجودات زنده مختلف از جمله قارچ‌ها انجام گرفته است. رضایی و همکاران مشخص نموده اند که میزان بیان ژن Tr HSP70 در شوک دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و تحت اشعه‌ی ماورای بنفش افزایش یافته، ژن مربوط HSP70 Mc نیز شناسایی و تعیین توالی گردیده است (۱۶-۱۴). تحقیقات دیگری نشان می‌دهد که میزان بیان ژن HSP70 در کاندیدا آلبیکنس (*Candida Albicans*) و ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces Cerevisiae*) بر اثر استرس‌های دمایی افزایش می‌یابد (۱۸ و ۱۹) و پارک و همکاران نشان داده‌اند که وقتی به وسیله‌ی شوک حرارتی میزان بیان HSP70 را در رده‌ی سلولی ملانومای انسانی افزایش دهند، این سلول‌ها نسبت به روند مرگ طبیعی سلول (Apoptosis) القا شده با UV مقاوم می‌شوند (۲۰). با

توجه به نقش حیاتی ذکر شده در مورد CO₂ و نقش بیماری‌زایی آن تحقیقات نشان داده وجود CO₂ در طول عفونت با باکتری پاتوژنیک باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus Anthracis*)، آنرا وادار به تولید کپسول پلی‌ساکارییدی ضد فاگوسیتوز (*Anti Phagocytose*) می‌کند، و همچنین عمیقاً رشد و دگرگونی قارچ‌های پاتوژن، شامل کاندیدا آلبیکنس و کریپتوکوکوس نئوفورمنس (*Cryptococcus Neoformans*) را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۴-۲۱، ۷). همچنین بررسی‌ها نشان داده که ماکزیم تشکیل آرتروکونید (*Arthroconidia*) در *T. Rubrum* تحت تأثیر ۱۰ درصد از غلظت CO₂ به مدت ۱۰ روز بوده است (۲۵). با بررسی نتیجه‌ی RT-PCR کیفی، از محلول‌های حاصله در کنار سایز مارکر 100 bp DNA ladder Plus و مشاهده‌ی باندهایی با اندازه‌ی ۸۰۰ bp، متعلق به یک قطعه‌ی ژنی با همین تعداد جفت باز نوکلئوتیدی در نمونه‌های مزبور، نشان داده شد که باندهای مربوط به بیان ژن HSP70 در قارچ‌های درماتوفیت *M. Canis*، *T. Rubrum* تحت شرایط ذکر شده یکسان نبوده، با بررسی باندهای حاصله نتایج متفاوتی حاصل گردید.

همانطوری که در شکل‌های ۳ نشان داده شده است در *T. Rubrum* کاهش نسبی میزان بیان ژن نسبت به کنترل در تمامی سطوح مشهود بود که می‌توان چنین نتیجه گرفت که بیان ژن HSP70 می‌تواند تحت شرایط انکوباسیون با CO₂ تغییر کند که این تغییر در مورد قارچ *T. Rubrum* سیر نسبتاً نزولی را نشان می‌داد. اما چنان که در شکل‌های ۴ مشاهده می‌شود، این تغییرات در مورد *M. Canis* بر خلاف *T. Rubrum* سیر تقریباً صعودی داشته است که چنین تغییراتی می‌تواند در درجه‌ی اول، با توجه به افزایش و کاهش متناوب بیان ژن در انکوباسیون با غلظت‌های مختلف CO₂، گویای بروز تغییراتی در بیان ژن و همچنین نشان دهنده افزایش بیان ژن HSP70 در قارچ *M. Canis* در مجاورت

آنجایی که، این تحقیق در جای خود به عنوان اولین مطالعه‌ی جامع و بنیادی در تاثیر گذاری غلظت‌های مختلف گاز CO₂ بر قارچ‌های درماتوفیت می‌باشد، انجام مطالعات و بررسی‌های تکمیلی پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های به دست آمده نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که میزان بیان ژن HSP70 در قارچ‌های *M. Canis* و *T. Rubrum* تحت اثر گاز CO₂ تغییر نموده، این تغییر می‌تواند تابعی از غلظت‌های مختلف مورد استفاده باشد و عدم تشابه در تغییرات بیان ژن HSP70 ما بین دو قارچ مذکور می‌تواند به علت تفاوت‌های مورفولوژیکی (سرعت رشد، مشخصات کونیدی‌ها و ساختمان‌های رویشی)، فیزیولوژیکی و متابولیکی (تغذیه، ایجاد فلورسانس، سوراخ کردن مو، ایجاد رنگدانه در محیط کشت و قدرت بیماری‌زایی) این درماتوفیت‌ها بوده که به نوبه خود می‌توانند بر روی میزان تاثیرپذیری و مطابقت با شرایط CO₂ دار در قارچ‌ها اثر بگذارد و از آنجایی که بررسی‌ها نشان داد، میزان بیان ژن Beta-Actin در قارچ‌های مذکور تحت تاثیر غلظت‌های مختلف CO₂ تغییر نمی‌نماید و این عدم تغییر می‌تواند نمایان‌گر قابل اعتماد بودن میزان بیان ژن HSP70 مطرح شده در نتایج به دست آمده از قارچ‌های مذکور باشد.

CO₂ بوده باشد. همان‌طوری که ذکر شد، به منظور اثبات بروز تغییرات ذکر شده در بیان ژن HSP70 در مجاورت CO₂ و نیز اثبات تساوی در میزان cDNA استفاده شده در آزمایش RT-PCR کیفی، از یک ژن ثابت در قارچ‌های مزبور (House keeping Gene) به نام Beta-Actin استفاده گردید و برابر با آنچه که قبلاً گفته شد آزمایش RT-PCR برای تمامی شرایط ذکر شده در انکوباسیون با غلظت‌های مختلف CO₂ (۳، ۵ و ۱۰ درصد) در فاصله‌های زمانی (۲، ۴ و ۷ روزه) و کشت‌های کنترل (بدون CO₂) در فاصله‌ی زمانی (۷ روزه) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن Beta-Actin تکرار گردید که نتایج آن به صورت باندهای یکسان نشان دهنده‌ی عدم تغییر و تساوی بیان ژن مذکور در قارچ‌های *M. Canis* و *T. Rubrum* در شرایط مختلف از انکوباسیون با CO₂ نسبت به کنترل بوده است (شکل‌های ۵و). با توجه به مطالب و نتایج گفته شده در این بحث چنین بر می‌آید که می‌توان از آن‌ها برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر، در زمینه‌های نحوه‌ی عملکرد HSP70 در قارچ‌های درماتوفیت مختلف و بررسی تفاوت‌های حاصله بین آن‌ها، بررسی نحوه‌ی تاثیرگذاری CO₂ بر روی قارچ‌ها (مکانیسم از طریق pH یا مکانیسم‌های دیگری نظیر تنفس سلولی) و احتمال شروع روند مرگ طبیعی سلول (Apoptosis) بر اثر CO₂ که می‌تواند اساسی برای استفاده از CO₂ تراپی در عفونت‌های جلدی مزمن قارچی باشد. از

References

- 1- Rippon JW. Medical mycology. dermatophytosis and dermatomycosis. Philadelphia, WB: sounders compony; 1988.
- 2- Brasch J. Pathogenesis of tinea. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010; 8: 780-6.

- 3- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses.* 2009; 52: 95.
- 4- Rodríguez-Pazos L, Pereiro-Ferreirós MM, Pereiro M Jr, Toribio J. Onychomycosis observed

- in children over a 20-year period. *Mycoses*. 2010; (Epubahead of print).
- 5- Anzawa K, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med Mycol*. 2010; 48: 629-34.
- 6- Baldo A, Tabart J, Vermout S, et al. Secreted subtilisins of *Microsporum canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. *J Med Microbiol*. 2008; 57: 1152-6.
- 7- Bahn YS, Mühlshlegel FA. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Curr Opin Microbiol*. 2006. 11; 9: 572-8.
- 8- Seo DC, DeLaune RD. Effect of redox conditions on bacterial and fungal biomass and carbon dioxide production in Louisiana coastal swamp forest sediment. *Science of the total environment*. 2010; 408: 3623-31.
- 9- He Z, Xu M, Deng Y, et al. Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO₂. *Ecology Letters*. 2010; 13: 564-75.
- 10- Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20: 3467-74.
- 11- Bahn YS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr Biol*. 2005; 15: 2013-20.
- 12- Dancsó B, Spiró Z, Arslan MA, Nguyen MT, et al. The heat shock connection of metabolic stress and dietary restriction. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010; 11: 13q-45.
- 13- Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998; 83: 117-32.
- 14- Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek C, et al. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton Rubrum Gene*. 2000; 241: 27-33.
- 15- Soleimanifar F. Study the existence of HSP70 gene in the pathogenic fungus *Microsporum canis*. [Dissertation]. Tehran: Islamic Azad University, North Tehran; 2003.
- 16- Abtin R. Study the effects of UV radiation on TrHSP70 gene in the fungus *Trichophyton rubrum*. [Dissertation]. Tehran: Islamic Azad University, North Tehran; 2001.
- 17- Lee JS, Seo JS. Differential expression of two stress-inducible HSP70 genes by various stressors. *Exp Mol Med*. 2002; 34: 131-6.
- 18- Reidy M, Masison DC. Sti1 regulation of Hsp70 and Hsp90 is critical for curing of *Saccharomyces cerevisiae* [PSI⁺] prions by Hsp104. *Mol Cell Biol*. 2010; 30: 3542-52.
- 19- Sandini S, Melchionna R, Bromuro C, La Valle. Gene expression of 70 kDa heat shock protein of *Candida albicans*: transcriptional activation and response to heat shock. *Med Mycol*. 2002; 40: 471-8.
- 20- Park KC, Kim DS, Choi HO, Kim KH, et al. Overexpression of HSP70 prevents ultraviolet B-induced apoptosis of a human melanoma cell line. *Arch Dermatol Res*. 2000; 292: 482-7.

- 21- Kim MS, Ko YJ, Maeng S, Floyd A, Heitman J, Bahn YS. Comparative transcriptome analysis of the CO₂ sensing pathway via differential expression of carbonic anhydrase in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*. 2010; 185: 1207-19.
- 22- Bahn YS, Molenda M, Staab JF, Lyman CA, Gordon LJ, Sundstrom P. Genome-wide transcriptional profiling of the cyclic AMP-dependent signaling pathway during morphogenic transitions of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007; 6: 2376-90.
- 23- Sheth CC, Johnson E, Baker ME, Haynes K, Mühlischlegel FA. Phenotypic identification of *Candida albicans* by growth on chocolate agar. *Med Mycol*. 2005; 43: 735-8.
- 24- Klengel T, Liang WJ, Chaloupka J, Ruoff C, et al. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol*. 2005; 15: 2021-6.
- 25- Yazdanparast SA, Barton RC. Arthroconidia production in *Trichophyton rubrum* and a new ex vivo model of onychomycosis. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 1577-81.

The Effect of Variable CO₂ Concentrations on HSP70 Gene in Trichophyton Rubrum and Microsporeum Canis

Darabian S¹, Rezaie S², Kordbachche P², Safari MR²

¹School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

²Division of Molecular Biology, Dept. of Medical Mycology & Parasitology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Darabian S, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Email: dsima2004@yahoo.com

Received: 1Mar 2010 **Accepted:** 28 Dec 2010

Background and Objectives: *Trichophyton rubrum* is considered as the most common causes of dermatophytosis in human skin and nail tissues. *Microsporeum canis* is a zoophile dermatophyte which can be transmitted to human. HSP70 is a 70 KD heat shock protein in fungi. In this study, the effects of variable CO₂ concentrations were examined on HSP70 expression in *T. rubrum* and *M. canis*.

Materials and Methods: Strains used in this study were obtained from skin scales and nails of the patients who were suffering from onychomycosis. Samples were cultured on Sabouraud dextrose broth (SDB) and incubated at 25°C for 2, 4 and 7 days under 3%, 5%, and 10% of CO₂ concentrations. Control cultures maintained for 7 days without CO₂ concentrations. Then, RNA was isolated from the harvested mycelia mass, and HSP70 gene expression was studied in *T. rubrum* and *M. canis* by RT-PCR. The obtained results were compared to the Beta actin as a house keeping gene.

Results: The results of this study revealed the maximum variations under 3%, 5%, and 10% of CO₂ concentrations in maximum 7 days incubation period, and the expression of HSP70 gene showed different variations under different CO₂ concentrations.

Conclusion: Our results showed a negative effect of CO₂ concentrations in the expression of HSP70 in *T. Rubrum* and a positive effect in *M. canis* comparing to the controls.

Keywords: *Dermatophyte, Trichophyton rubrum, Microsporeum canis, HSP70 Gene*