

# بررسی بیان ژن $\text{TruMDR}_2$ جدایه‌های تریکوفیتون روبروم در پاسخ به

## تریپتین‌ها و نانوتریپتین‌ها

نازیلا متدین<sup>۱</sup>، ساسان رضایی<sup>۲</sup>، سیدجمال هاشمی<sup>۳\*</sup>، منصور بیات<sup>۱</sup>

### چکیده

تریکوفیتون روبروم از شایع‌ترین عوامل درماتوفیتوزیس است. افزایش بیان ژن  $\text{TruMDR}_2$  که کدکننده پمپ‌های خروج دارو است، منجر به بروز مقاومت در تریکوفیتون روبروم نسبت به داروی تریپتین‌ها می‌شود. ضرورت تحقیق بر روی عوامل ضد قارچی جدید که می‌توانند با کاهش بیان این ژن باعث کاهش مقاومت در تریکوفیتون روبروم شوند انکارناپذیر است. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن  $\text{TruMDR}_2$  در سویه‌های تریکوفیتون روبروم نسبت به داروی تریپتین‌ها و نانوتریپتین‌ها بود. در این مطالعه دو جدایه تریکوفیتون روبروم جدا شده از ضایعات اونیکومایکوزیس به روش فنوتایپینگ و ژنوتایپینگ شناسایی شدند و حساسیت ضد قارچی تریپتین‌ها و نانو تریپتین‌ها تهیه شده به روش Broth microdilution با توجه به دستورالعمل CLSI انجام شد. سپس تغییرات بیان ژن  $\text{TruMDR}_2$  در دو جدایه مشخص شده در غلظت sub MIC تریپتین‌ها و نانو تریپتین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در جدایه‌ها در حضور غلظت‌های sub MIC تریپتین‌ها بیان ژن مورد بررسی ۲۲۲ / ۱۶ / ۶۳۶ و ۱۸ / ۱۹۰ بود در حالیکه بیان ژن در حضور غلظت‌های sub MIC نانو تریپتین‌ها ۷/۹۱۳ و ۹/۱۹۰ بود. با توجه به یافته‌های این مطالعه، افزایش بیان ژن  $\text{TruMDR}_2$  در دو جدایه در غلظت sub MIC تریپتین‌ها بیشتر از نانوتریپتین‌ها است.

واژگان کلیدی: ژن  $\text{TruMDR}_2$ ، تریکوفیتون روبروم، تریپتین‌ها، نانوتریپتین‌ها

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۹

### مقدمه

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های کراتینوفیلیک هستند که با تهاجم به مو، ناخن و لایه‌های شاخی پوست باعث عفونت قارچی تحت عنوان درماتوفیتوزیس می‌شوند. تریکوفیتون روبروم درماتوفیت انسان دوست است که از عوامل شایع کچلی کشاله ران، بدن، ناخن و دست می‌باشد (۳). تریپتین‌ها از متداول‌ترین داروهای ضد درماتوفیتی است ولی در سال‌های اخیر، مقاومت در برخی گونه‌های تریکوفیتون روبروم در برابر داروی تریپتین‌ها گزارش شده است (۶). یکی از راه‌هایی که

قارچ‌های درماتوفیت در برابر داروها مانند تریپتین‌ها مقاومت نشان می‌دهند، افزایش بیان پمپ‌های خروج دارو است که موجب مقاومت بالا در برابر داروها است. پمپ‌های خروج دارو گروهی از پروتئین‌های غشایی انتقال دهنده هستند که در تمام یاخته‌های زنده از جمله قارچ‌ها وجود دارند که باعث پمپ نمودن داروها به خارج از سلول می‌شوند که پیامد آن کاهش غلظت دارو در درون سلول خواهد بود. این پروتئین‌ها انرژی مورد نیاز خود را از هیدرولیز ATP تامین می‌کند و با گروه‌های زیادی از ترکیبات ساختاری و شیمیایی متصل می‌شوند (۷). دو نوع اصلی از پمپ‌های خروج دارو از سلول‌های قارچی که باعث مقاومت آنها به داروها می‌شود وجود دارد: انتقال دهنده های MFS (Major Facilitator Superfamily) و ABC (ATP-Binding Cassette) هستند (۱۰). افزایش بیان ژن‌های (Multidrug resistance) MDR که کدکننده پروتئین‌های این پمپ‌ها هستند در ویرولانسی و مقاومت یاخته در برابر عوامل ضدقارچ موثرند (۵). ژن  $\text{TruMDR}_2$  در تریکوفیتون روبروم مسول کدکردن پمپ‌های ABC است که در حضور داروهای مختلف بیان‌های متفاوتی را نشان می‌دهد. استفاده از رهیافت‌های جدید درمانی مانند نانوتکنولوژی، با تبدیل دارو به ابعادی کوچک در حد نانو جهت افزایش اثر ضد قارچی‌اند، و همچنین تأثیر بر روی بیان ژن مورد نظر، که بتواند حساسیت را بالا برده و مقاومت دارویی را کاهش دهد می‌تواند جایگزین مناسب (نانوذرات) برای داروهای فعلی باشد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات در روند بیان ژن  $\text{TruMDR}_2$  در دو جدایه تریکوفیتون روبروم در

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، sjhashemi@tums.ac.ir

## تست حساسیت ضد قارچی

### داروهای ضد قارچی

پودر خالص داروی تربینافین از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) تهیه شد. سپس تهیه فرمولاسیون نانولیپوزومال تربینافین توسط شرکت ایرانی نانوزین و در آزمایشگاه پژوهشگاه ملی مهندسی و زیست فناوری طبق روش هیدراسیون لایه نازک انجام شد (۸). از دی‌متیل سولفوکساید ۱٪ تهیه شده از شرکت سیگما برای حل شدن تربینافین استفاده شد و جهت تهیه رقت‌های دارویی تربینافین و نانو داروی تربینافین از RPMI1640 استفاده شد. رقت‌های مورد استفاده در آزمایش (۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۳۱، ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از انجام یک پیش آزمون در شرایط *in vitro* بدست آمد.

### تست Micro broth dilution

تعیین MIC داروهای تربینافین و نانو تربینافین با توجه به پروتکل استاندارد میکروبراث دایلوژن (Clinical and Laboratory Standards Institute) ، M38A CLSI انجام شد. برای تهیه سوسپانسیون قارچی، قارچها به مدت هفت روز در محیط PDA به منظور تقویت مرحله کوندی زایی، کشت داده شدند. سوسپانسیون دارای CFU/mL  $1 \times 10^3$  برای تست مورد نظر استفاده شد. رقت‌های داروهای مورد استفاده در آزمایش (۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۳۱، ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جهت انجام این تست از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های داروهای مورد نظر جداگانه به هرچاهک از میکروپلیت ریخته شد. سپس به درون تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کپکی اضافه شد. یک چاهک به عنوان کنترل استریل دارای ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI ۱۶۴۰ و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. به این ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI ۱۶۴۰ و

هنگام استفاده از غلظت (Minimum Inhibitory Concentration) sub MIC تربینافین و نانو داروی آن به ترتیب ۰/۵ و ۰/۰۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

## مواد و روش کار

### نمونه برداری

دو جدایه بالینی تریکوفیتون روبروم که از ضایعات ناخن بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی در تهران جمع‌آوری گردید، سپس با کشت در محیط مایکوزیل آگار خالص شدند. تشخیص جدایه‌ها بر اساس بررسی فنوتایپینگ با استفاده از تکنیک اسلاید کالچر برای بررسی میکروسکوپی میکرو و ماکرو کونیدی‌ها انجام شد. برای بررسی مولکولی، آزمایش PCR با استفاده از Mastermix2x شرکت Ampliqon (Denmark) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از *master mix Taq 2X*، ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۲ میکرولیتر پرایمر ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' و ITS1: 5,-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3، که در نهایت با استفاده از ۳ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. تیوب‌ها در داخل دستگاه Thermal Cycler مدل BIORAD قرار داده شد و مراحل Polymerase reaction (chain) PCR که شامل مرحله واسرشت اولیه ۳ دقیقه  $95^{\circ}\text{C}$ ، مرحله واسرشت ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه  $95^{\circ}\text{C}$ ، مرحله اتصال ۳۰ ثانیه  $55^{\circ}\text{C}$  مرحله طویل شدن ۴۰ ثانیه  $72^{\circ}\text{C}$  در نهایت مرحله طویل شدن نهایی ۵ دقیقه  $72^{\circ}\text{C}$  انجام شد. سپس قطعات PCR به دست آمده پس از الکتروفورز، برای تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای ITS4 و ITS1 (Internal Transcribed Spacer) به شرکت سینا ژن ارسال گردید. مقدار حدودی bp ۶۰۰ تا ۷۰۰ از توالی نمونه‌های ارسال شده پس از تعیین توالی در بانک اطلاعات ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information) از نظر همولوژی یا همخوانی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

و OD آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (BioWave II) ساخت شرکت Biochrome انگلستان در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نباید کمتر از ۱/۸ باشد که کمتر از این مقدار نشان‌دهنده آلودگی پروتئین در طی مراحل استخراج است.

#### ساخت c-DNA و واکنش RT-PCR

برای تکثیر ژن TruMDR<sub>2</sub> و بررسی بیان ژن مورد نظر در ابتدا واکنش RT-PCR کیفی انجام شد. در مرحله اول از روی RNAهای خام c-DNA مربوطه ساخته شد. برای این منظور از کیت (۲) RT-PCR Pre-Mix (Taq) ساخت شرکت BioFACT کره جنوبی استفاده شد. c-DNAهای مزبور برای استفاده بعدی در ۲۰°C- نگهداری شدند. سپس از c-DNA نمونه‌های قارچی تریکوفیتون روبروم غلظت‌های یکسان بر حسب میکرولیتر تهیه گردید تا از نظر کنترل بیان ژن در آزمایشات بعدی غلظت‌های یکسانی داشته باشند. سپس توسط پرایمرهای طراحی شده قسمت‌های مختلف c-DNA تکثیر شد.

#### پرایمرهای مورد استفاده شامل:

(TruMDR<sub>2</sub>): Sense Primer  
5'GTGAGCGAGAAACCGAATAC 3'

(TruMDR<sub>2</sub>): Anti sense Primer  
5'GTATGTAGCCTTGGCATCTG3'

مواد استفاده شده جهت انجام واکنش RT-PCR به ازای یک نمونه شامل: R primer به میزان ۱/۵ میکرولیتر، F primer به میزان ۱/۵ میکرولیتر، Master mix شرکت BioFACT کره جنوبی به میزان ۱۰ میکرولیتر، Distilled Water به میزان ۱۰ میکرولیتر، c-DNA به میزان ۲ میکرولیتر بود. واکنش RT-PCR توسط دستگاه Thermal Cycler شامل ۳۵ سیکل به شرح زیر بود، ۴ دقیقه ۹۴°C، ۴۵ دقیقه ۹۴°C، ۱ دقیقه ۵۷°C، ۳۰ ثانیه ۷۲°C. همچنین به منظور کنترل بیان ژن مزبور در قارچ‌های تریکوفیتون روبروم از یک ژن با قابلیت ثبات در شرایط مختلف (β-actin) استفاده گردید (۲) واکنش RT-PCR با استفاده از این پرایمرها هم طبق پروتکل بالا انجام شد. توالی پرایمرها به شرح زیر است:

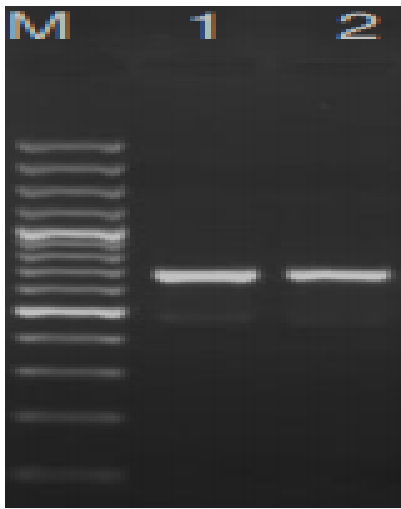
۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی اضافه شد. جهت اطمینان از وجود خاصیت عدم مهار رشد قارچ و یا بالعکس توسط ذرات نانولپوزوم بلانک یک چاهک هم به عنوان کنترل میکرولیتر ۱۰۰ از سوسپانسیون قارچی و ۱۰۰ میکرولیتر نانو لپوزوم استفاده گردید و هیچ اثر ضد قارچی مشاهده نشد. جهت اطمینان از عدم تداخل دی متیل سولفوکساید در نتایج بدست آمده، به همراه آزمایش‌ها در یکی از ردیف‌های چاهک‌ها از رقت‌های دی متیل سولفوکساید تهیه شده با آب مقطر استریل بدون اضافه کردن دارو به عنوان کنترل استفاده شد. و گونه استاندارد *Trichophyton interdigitale* ATCC MYA-4439 نیز برای کنترل کیفی تست میکرودايلوشن در کنار تست مورد بررسی قرار گرفت. میکروپلیت‌ها در حرارت ۲۸°C بدون تکان دادن قرار داده شد و بعد از ۴ روز به کمک آینه مقعر خوانده شد. آزمون MIC برای هر جدایه به صورت دو تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

#### بررسی بیان ژن TruMDR<sub>2</sub>

##### استخراج RNA

جهت ارزیابی اثر نانوداروی تربینافین و تربینافین بر بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> در دو ایزوله مشخص شده تریکوفیتون روبروم در غلظت‌های sub MIC - از کشت انبوه قارچ‌ها استفاده شد. کونیدی‌های قارچ‌ها در محیط سابورودکستروز اگر به مدت ۷۲ ساعت در حرارت ۲۸°C انکوبه شدند. سپس میسلیم‌های قارچ‌ها جمع‌آوری و در پلیت‌ها در حضور غلظت‌های مشخص داروها در شرایط یکسان قبلی قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت محتویات پلیت‌ها به لوله‌های فالكون استریل منتقل می‌شوند. سپس، کشت‌ها به وسیله PBS 10X شستشو داده شده و در ۳۰۰۰xg و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس طبق پروتکل کیت RNAX-plus، استخراج RNA جدایه‌ها انجام شد. برای تعیین حضور RNA و غلظت آن در نمونه‌ها و عدم وجود آلودگی به پروتئین از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. در این روش به میزان ۵ میکرولیتر RNA از نمونه تخلیص شده با ۴۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل مخلوط شد

در آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای در اندازه‌های مورد استفاده (bp) ۶۰۰ - ۷۰۰ نتیجه مثبتی را نشان دادند (نگاره ۱). نتایج ارزیابی میزان همخوانی نمونه‌های به دست آمده از تعیین توالی قطعات حاصل از PCR نمایانگر هومولوژی یا همخوانی به میزان ۱۰۰٪ با نمونه تریکوفیتون روبروم موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی (NCBI) بود.



نگاره ۱- الکتروفورز محصول PCR (۱ و ۲) جدایه‌های تریکوفیتون روبروم

### تست حساسیت دارویی

نتایج تست حساسیت ضد قارچی داروهای تربینافین و نانوتربینافین بر روی جدایه‌های تریکوفیتون روبروم در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج تست حساسیت داروهای تربینافین و نانوتربینافین در

جدایه‌های تریکوفیتون روبروم

گونه‌ها	MIC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
تربینافین (n = ۲) تریکوفیتون روبروم	۱
نانو تربینافین (n = ۲) تریکوفیتون روبروم	۰/۱۲۵

تعداد جدایه‌ها = n

اثر تربینافین و نانو لیپوزومال حاوی تربینافین بر بیان ژن TruMDR<sub>2</sub>

Primer Sense (β-actin -S1): 5' ACGGTATTGTTTCCAACACTGGGAC 3'

Primer Anti sense (β-actin- As1): 5' TGGAgCTTCGGTCAACAAAACACTGG 3'

در نهایت به منظور سنجش بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ همراه اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. سپس قطعات تکثیر شده به صورت باندهای فلورسنت در دستگاه عکسبرداری از ژل ساخت شرکت Uvitec Cambridge فرانسه مشاهده گردیدند.

### آزمون Real time PCR

جهت انجام واکنش از کیت تهیه شده از کمپانی BIOFACT کره جنوبی استفاده گردید. مواد استفاده شده در این واکنش طبق واکنش RT-PCR بود. آزمون Real time PCR در ۳۵ سیکل و مدل دستگاه ۶۰۰۰ Corbbet ساخت شرکت هلندی QIAGEN بود. برنامه زمانی آن به شرح زیر بود: ۱۵ دقیقه ۹۵<sup>0C</sup>، ۲۰ ثانیه ۹۵<sup>0C</sup>، ۴۰ ثانیه ۵۶<sup>0C</sup>، ۱ دقیقه ۷۲<sup>0C</sup>.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی نرمالیت داده‌های مطالعه، از نرم‌افزار REST 2009 و آزمون کولموگروف - اسمیرنوف استفاده شد. همچنین برای بررسی ارتباط بین گروه‌ها از آزمون پارامتریک t-test استفاده شد. P < 0.05 بعنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. جهت بررسی اطلاعات توصیفی مطالعه نیز، میانگین و ضریب انحراف خطا محاسبه شد.

### نتایج

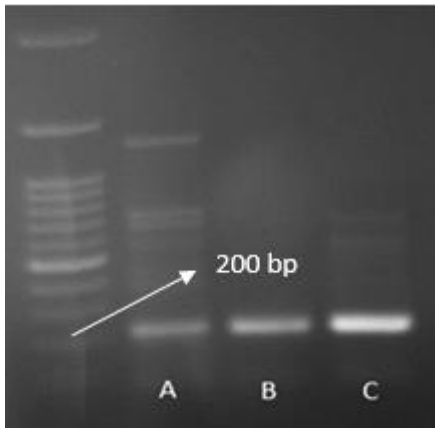
#### بررسی مولکولی نمونه‌ها

کلنی جدایه‌های تریکوفیتون روبروم کرکی، پرزی، سفید یا صورتی رنگ با پیگمان قرمز رنگ در پشت کلونی، مرکز بر آمده و چین دار بود. همچنین در بررسی میکروسکوپی، جدایه‌ها دارای میسلیم‌های نازک با تیغه میانی و میکروکوندیاهای کوچک و اشکی شکل به تعداد زیادی در کنار میسلیم‌ها و ماکروکوندی‌های کم و مدادی شکل و چند خانه‌ای مشاهده شد. مولکول‌های DNA جدا شده از جدایه‌های تریکوفیتون روبروم

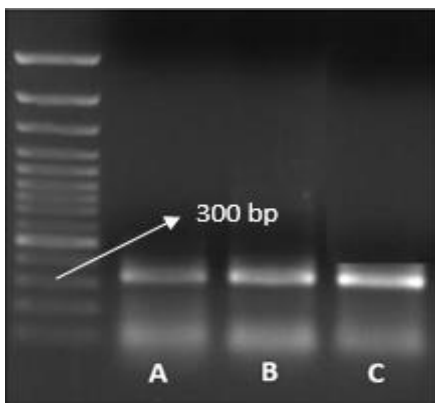
### آزمون RT-PCR

ارزیابی اثر نانوداروی تربینافین و تربینافین بر بیان ژن sub MIC در TruMDR<sub>2</sub> در دوسویه تریکوفیتون روبروم که sub MIC یکسانی داشتند انجام شد. نتایج حاصل از واکنش RT-PCR برای ایزوله شماره ۱ مورد بررسی نشان می‌دهد که بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> تحت غلظت sub MIC نانوتربینافین نسبت به کنترل افزایش داشت و روند بیان ژن تحت غلظت sub MIC تربینافین بر اساس قدرت روشنایی باند، روند صعودی داشت (نگاره ۲). تغییرات بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> در ایزوله شماره ۲ هم مطابق با ایزوله شماره ۱ بود به نحوی که افزایش بیان ژن مذکور تحت غلظت sub MIC تربینافین نسبت به غلظت sub MIC نانوتربینافین و کنترل قابل مشاهده بود (نگاره ۳).

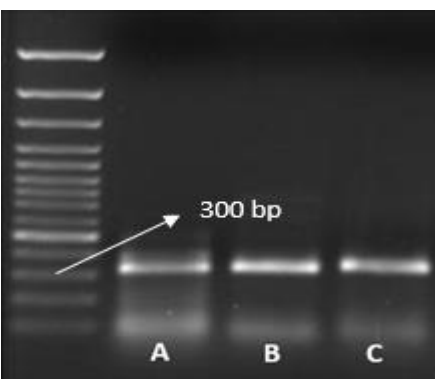
نتایج بیان ژن‌های  $\beta$ -Actin که نشان‌دهنده باندهای یکسان است حاکی از عدم تغییر در بیان ژن مذکور در هر دو ایزوله قارچ تریکوفیتون روبروم است (نگاره ۴ و ۵). نتایج حاصله با نتایج حاصل از Real-time PCR نیز تایید گردید.



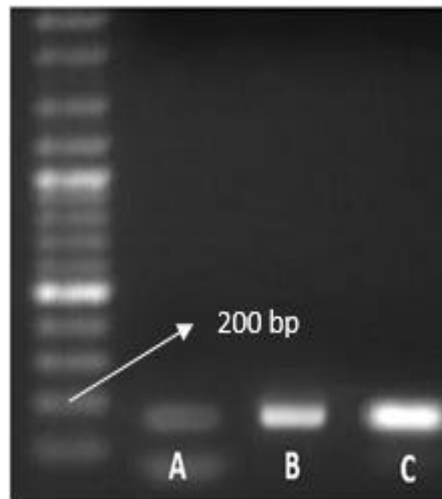
نگاره ۳- محصول RT-PCR ژن TruMDR<sub>2</sub> ایزوله شماره ۲ (A) ایزوله کنترل (B) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC نانوتربینافین، (C) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC تربینافین



نگاره ۴- محصول RT-PCR ژن  $\beta$ -Actin ایزوله شماره ۱ (A) ایزوله کنترل (B) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC نانوتربینافین، (C) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC تربینافین



نگاره ۵- محصول RT-PCR ژن  $\beta$ -Actin ایزوله شماره ۲ (A) ایزوله کنترل (B) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC نانوتربینافین، (C) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC تربینافین



نگاره ۲- محصول RT-PCR ژن TruMDR<sub>2</sub> ایزوله شماره ۱ (A) ایزوله کنترل (B) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC نانوتربینافین، (C) ایزوله تیمار شده در غلظت sub MIC تربینافین

### آزمون Real-time PCR

نتایج تقریباً مشابهی در هر دو جدایه مورد بررسی به دست آمد که نشان می‌دهد سطح رونویسی این ژن در جدایه‌ها تحت تاثیر غلظت‌های sub MIC تربینافین و نانو تربینافین قرارگرفت، هر چند افزایش قابل ملاحظه‌ای در حضور داروی تربینافین نسبت به نانو تربینافین نشان داد.

نتایج حاصل از Real-time PCR بر روی بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> مرتبط با دوجدایه تیمار شده با تربینافین و نانوتربینافین در غلظت‌های sub MIC (۰/۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۵) میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به جدول،

جدول ۲- نتایج بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> در ایزوله شماره ۱ و ۲ در غلظت‌های sub MIC تربینافین و نانو تربینافین بوسیله Real-time PCR بر طبق نرم‌افزار REST

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	۹۵% .C.I	P(H1)	Result
B act	REF	۱/۰	۱/۰۰۰			
TruMDR (TRB ) No. ۱	TRG	۱/۰	۱۸/۶۳۶	۱۸/۶۳۱-۱۸/۶۳۴	۰/۰۲۰	UP
TruMDR (NanoTRB) No. ۱	TRG	۱/۰	۹/۱۹۰	۹/۱۸۷ - ۹/۱۹۴	۰/۰۱۸	UP
Tru MDR (TRB) No.۲	TRG	۱/۰	۱۶/۲۲۲	۱۶/ ۲۰۰- ۱۶/۲۲۶	۰	UP
TruMDR (NanoTRB) No. ۲	TRG	۱/۰	۷/۹۱۳	۷/ ۹۱۱ - ۷/۹۱۱	۰/۰۳۳	UP

شماره ایزوله = No، نانوتربینافین = NanoTRB، تربینافین = TRB، ژن رفرنس = REF، ژن هدف = TRG، UP= افزایش بیان ژن = P(H1) احتمال فرضیه متناظر که تفاوت بین گروه نمونه و شاهد فقط به شانس است = Reaction efficacy= کارایی واکنش = Expression بیان ژن

### بحث

تربینافین MIC برابر با ۱ میکروگرم بر میلی لیتر داشتند که حاکی از مقاومت این سویه‌ها در برابر داروی تربینافین است در حالیکه میزان MIC نانو تربینافین برابر با ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر است که نشان از افزایش حساسیت این گونه‌ها نسبت به نانوذرات لیپوزومال حاوی تربینافین در مقایسه با داروی تربینافین است. سطح رونویسی ژنهای MDR در تریکوفیتون روبروم که کد کننده پروتئینهای پمپ‌های افلاکس هستند در حضور داروهای ضد قارچی گوناگون، مختلف است که چنانچه باعث افزایش سطح رونویسی شود منجر به مقاومت به داروی

مطالعات اندکی در زمینه نانوحامل‌های ضدقارچی و مقایسه میزان اثربخشی آن با داروهای معمول ضد قارچی بر روی گونه‌های قارچی و تاثیر آنها بر روی بیان ژنهای مقاومت صورت گرفته است و در ایران مطالعه مستندی در این زمینه موجود نمی‌باشد. بنابراین در این مطالعه اثرات ضد قارچی تربینافین و نانو ذرات لیپوزومی حاوی تربینافین در شرایط آزمایشگاهی بر روی دوجدایه تریکوفیتون روبروم به روش میکروبراث دایلوژن مورد ارزیابی قرارگرفت. با توجه به نتایج جدول دو سویه تریکوفیتون روبروم نسبت به داروی

اکریل فلاوین مشاهده شد (۲). Paia و همکاران (۲۰۰۷) به بررسی بیان ژن‌های تریکوفیتون روبروم در حضور غلظت‌های MIC داروهای مختلف پرداختند. نتایج نشان داد که بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> تریکوفیتون روبروم در حضور داروهای مختلف مخصوصاً ترینافین افزایش پیدا می‌کند. در حقیقت مکانیسم وابسته به انرژی drug efflux در مقاومت در برابر عوامل ضدقارچی موثرند. (۹) در مطالعه دیگری که توسط Cervelatti (۲۰۰۶) انجام شد ژن TruMDR<sub>1</sub> در تریکوفیتون روبروم که نوع دیگری از پمپ‌های ABC را کد می‌کند در حضور غلظت‌های subMIC داروهای مختلف بیان‌های متفاوتی را نشان داد. افزایش بیان این ژن در حضور داروهایی مانند سیکلوهاگزامید، اتیدیوم بروماید و فلوکونازول ثابت شد ولی در حضور داروی ترینافین افزایش بیانی مشاهده نشد (۱).

با توجه به نتایج این بررسی، اثرات ضدقارچی این فرمولاسیون نشان داد که این نانو ذرات اثرات ضد قارچی موثرتری را نسبت به فرم آزاد دارو داشتند. همچنین نانو ذرات ترینافین با اثر بر روی mRNA مرتبط با ژن TruMDR<sub>2</sub> افزایش بیان کمتری نسبت به ترینافین در غلظت sub MIC داشتند. برای بررسی بیشتر اثربخشی داروی نانو ترینافین و غلظت مورد نیاز دارو در عفونت‌های ناشی از تریکوفیتون روبروم، به منظور کاهش بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> و اثرات واقعی درمانی این عفونت مزمن، مطالعات در شرایط in vivo بر روی مدل‌های حیوانی و بیماران انسانی لازم است.

### فهرست منابع

1. Cervelatti, E. P., Fachin, A. L., Ferreira-Nozawa, M. S., Martinez-Rossi, N. M. (2006): Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* 44(2): 141-147.
2. Fachin, A. L., Ferreira-Nozawa, M. S., Maccheroni Jr, W., Martinez-Rossi, N. M. (2006): Role of the ABC transporter TruMDR<sub>2</sub> in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J. Med. Microbiol.* 55(8): 1093-1099.

مورد نظرمی‌شود. بنابراین در این مطالعه پس از بررسی اثرات ضد قارچی داروهای مورد بررسی، تغییرات در روند بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> در دو جدایه تریکوفیتون روبروم تحت غلظت sub MIC ترینافین و نانوداروی آن مورد بررسی قرارگرفت. نتایج Real-time PCR در این مطالعه همراستا با نتایج RT-PCR است که نشان می‌دهد که در جدایه‌های مورد بررسی در حالت بدون تیمار، بیان ژن مورد نظر، پایین است، در حالیکه بیان ژن TruMDR<sub>2</sub> تحت تیمار در غلظت sub MIC ترینافین و نانو ترینافین نسبت به حالت کنترل، افزایش پیدا می‌کند که همراستا با نتایج تحقیق Zhang و همکاران (۲۰۰۹) مشخص شده است ترینافین در القای بیان ژنهای MDR تریکوفیتون روبروم که کد کننده پمپ‌های ABC است نقش دارد (۱۲).

مقادیر P(H1) هرچه به صفر نزدیکتر باشند احتمال اینکه اعداد به دست آمده در واکنش فقط به شانس بستگی داشته باشد کمتر است. با توجه به نزدیک بودن تمام نتایج P(H1) به عدد صفر در جدول فوق می‌توان دریافت که احتمال تصادفی بودن نتایج بسیار اندک است.

در غلظت sub MIC ترینافین بیان ژن مورد نظر در هر دو ایزوله نسبت به بیان ژن در غلظت sub MIC نانو ترینافین افزایش داشت که نشان از همکاری این ژن در مقاومت به داروی ترینافین است. نانوذرات احتمالاً تحریک پذیری کمتری نسبت به ترینافین برای نسخه‌برداری از DNA و تولید mRNA مرتبط با TruMDR<sub>2</sub> را دارند. نتیجه مشابهی توسط Komoto و همکاران (۲۰۱۵) گزارش شد، آنها نشان دادند که افزایش القای ژن TruMDR<sub>2</sub> در تریکوفیتون روبروم بوسیله ترینافین ایجاد می‌شود. (۴). در مطالعه‌ای که توسط Fachin (۲۰۰۶) انجام شد، نقش ژن TruMDR<sub>2</sub> در حساسیت به داروی ترینافین اثبات شد. آنها همچنین نشان دادند که غلظت داروی ترینافین در تحریک رونویسی این ژن نقش مهمی دارد و به علت پایین بودن غلظت subMIC ترینافین، افزایش بیان ژن مورد نظر چشمگیر نبود، بلکه افزایش رونویسی این ژن در حضور غلظت‌های subMIC داروی‌های فلوکونازول، گریزوفلووین و

3. Havlickova, B., Czaika, V. A., Friedrich, M. (2008): Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2009 Jan. 52(1):95.
4. Komoto, T. T., Bitencourt, T. A., Silva, G., Belebani, R. O., Marins, M., Fachin, A. L. (2015): Gene expression response of *Trichophyton rubrum* during coculture on keratinocytes exposed to antifungal agents *Evid Based Complement Alternat Med*. P: 7.
5. Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., Kelly, S. (2002): Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*. 8(2): 76-81.
6. Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N. S., Ghannoum, M. A. (2003): Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother*. 47(1): 82-86.
7. Neyfakh, A. A. (2002): Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol. Microbiol.*44(5): 1123-1130.
8. Ola, H., Yahiya, S. A., El-Gazayerly, O. N. (2010). Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *SPJ*, 18(4): 217-224.
9. Paião, F. G., Segato, F., Cursino-Santos, J. R., Peres, N. T., & Martinez-Rossi, N. M. (2007). Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol Lett*. 271(2), 180-186.
10. Pao, S. S., Paulsen, I. T., & Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(1), 1-34.
11. White TJ, Thomas Bruns SJ, Lee WT, Taylor JL. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990.
12. Zhang, W., Yu, L., Yang, J., Wang, L., Peng, J., & Jin, Q. (2009). Transcriptional profiles of response to terbinafine in *Trichophyton rubrum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 82(6): 1123-1130.