

تأثیر دیکلوفناک سدیم بر میزان رشد و تغییرات مورفولوژیک آسپرژیلوس فومیگاتوس و کاوش اثر آن بر روی پروتئین سیدروفور با بررسی بیان ژن *sidB*

ساناز نرگسی: کارشناس ارشد، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
پریوش کردبچه: استاد، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
شیرین فره یار: استادیار، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
فاطمه نوربخش: استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، ورامین، ایران
ساسان رضایی: استاد، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران- نویسنده رابط:
srezaie@tums.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: بررسی ژن های دخیل در بیماریزایی آسپرژیلوس فومیگاتوس و شناسایی عوامل ضد قارچی جایگزین، با توجه به موارد روز افزون مقاومت های دارویی ایجاد شده نسبت به آن، همواره مورد لزوم بوده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر دیکلوفناک سدیم بر رشد و بیان ژن *sidB* در آسپرژیلوس فومیگاتوس می باشد.

روش کار: در این پژوهش، پس از کشت آسپرژیلوس فومیگاتوس و تهیه سوسپانسیون قارچی، حداقل غلظت مهار کنندگی دیکلوفناک سدیم، تحت غلظت های $1000-25 \mu\text{g/ml}$ تعیین گردید. سپس، استخراج RNA از سوسپانسیون قارچی تحت غلظت های $700,500$ و $900 \mu\text{g/ml}$ از دارو انجام گرفت. در نهایت میزان بیان ژن با سنجش سطوح مختلف *mRNA-sidB* بوسیله روش Real-time PCR بررسی گردید.

نتایج: مشاهده گردید که با افزایش غلظت دیکلوفناک سدیم، میزان تولید میسلیم کاهش می یابد و دارو در غلظت های بالاتر از $500 \mu\text{g/ml}$ ، اثر مهاری قابل توجهی بر رشد آسپرژیلوس فومیگاتوس داشته است. نتیجه گیری: یافته های حاصل از این پژوهش نشان میدهند، دیکلوفناک سدیم میتواند سبب کاهش شدید میزان رشد آسپرژیلوس فومیگاتوس شود. بر این مبنای می توان آن را یکی از عوامل دارویی موثر بر مهار رشد آسپرژیلوس فومیگاتوس در نظر گرفت. واژگان کلیدی: آسپرژیلوس فومیگاتوس، دیکلوفناک سدیم، ژن *sidB*

مقدمه

طور کلی شامل: آسپرژیلوزیس آلرژیک، کلنیزه و مهاجم (سیستمیک) می باشد (Yin et al. 2014; Latge 1999) برای سالها آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان یک پاتوژن ضعیف در نظر گرفته می شد و تنها، به عنوان عاملی برای ایجاد فرم آلرژیک محسوب می شد. اما با افزایش تعداد بیماران دچار نقص سیستم ایمنی افزایش چشمگیری در موارد ابتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم که معمولا شدید و

اعضای جنس آسپرژیلوس قارچ هایی ساپروفیت و رشته ای هستند که در خاک، باقیمانده های گیاهان و حتی هوا موجود بوده و انتشار جهانی دارند. از میان این گونه های عفونی فرصت طلب، آسپرژیلوس فومیگاتوس بیشترین گونه جدا شده و پس از آن گونه های آسپرژیلوس فلاووس و نایجر قرار دارند. طیف بیماری های ایجاد شده توسط آسپرژیلوس ها وسیع است اما به

مقاومت آزولی اسپرژیلوس فومیگاتوس که در دهه اخیر بسیار بیشتر به چشم می خورد، خطر مرگ در اثر عفونت-های مهاجم ناشی از این قارچ را بالا برده است. آنچه مسلم است، بروز مقاومت‌های آزولی موجب پیدایش مشکلاتی در روند درمانی عفونت ناشی از اسپرژیلوس فومیگاتوس می‌گردد (Lelièvre et al. 2013). بنابراین، تحقیق و مطالعه در جهت ورود و استفاده از داروها و عوامل فارماکولوژیک جدید، با مکانیزم اثر متفاوت نسبت به ترکیبات آزولی، امری بدیهی به نظر می‌رسد. التهاب واکنشی غیر اختصاصی، متداول و محافظت کننده در پاسخ به عوامل خارجی، صدمات بافتی و دیگر تحریکات مضر همانند سموم و عوامل بیماری زا می باشد. اگر چه التهاب یک واکنش غیر اختصاصی ایمونولوژیک است، و اما در ایجاد آن سلول‌های اختصاصی و واسطه‌های ایمونولوژیک مثل لکوسیت‌ها و سایتوکاین‌ها وارد عمل می‌شوند. و التهاب با آزادسازی واسطه‌های شیمیایی از بافت‌های آسیب دیده و سلول‌هایی که به این نواحی مهاجرت کرده‌اند، آغاز می‌شود (Weissenbacher 2014). واسطه‌های شیمیایی بر اساس نوع پروسه التهابی متفاوتند. از جمله این ترکیبات می توان به ترکیبات لیپیدی همانند پروستاگلندین‌ها اشاره نمود. دیکلوفناک سدیم یک داروی غیراستروئیدی و ضد التهابی است و به وسیله مهار ایزوآنزیم‌های مسیر سیکلواکسیژناز (COX) موجب انسداد مسیر ساخت پروستاگلندین‌ها می شود. پروستاگلندین‌ها گروهی از ترکیبات کوچک لیپیدی هستند که بطور آنزیماتیک از اسیدهای چرب مشتق می شوند و نقش‌های مهمی را در سلول‌ها و بافت‌ها ایفا می کنند. دیکلوفناک سدیم همراستا با دیگر داروهای گروه NSAID، به طور گسترده ای در درمان ورم مفاصل و دیگر بیماری‌های مرتبط بکار می رود (Umaru et al. 2009; Payan and Katzung 1995) اما اثرات آن ضد عوامل بیماری زا (قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها) نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Dastidar et al. 2000; Alem and Douglas 2004) بیوستنز سیدروفور در اسپرژیلوس فومیگاتوس و اسپرژیلوس نیدولانس دارای مسیر مشابهی است. اما بر

کشنده است، به وجود آمد و در حال حاضر اسپرژیلوس فومیگاتوس غالب ترین عامل بیماری زای اسپرژیلوزیس در افراد دچار نقص سیستم ایمنی در سراسر جهان محسوب می‌شود (Pfaller and Diekema 2004; Sharma et al. 2007; Upadhyayula et al. 2006; Mehta et al. 2010; Hohl and Feldmesser 2007) اسپرژیلوس فومیگاتوس قارچی است که عامل بیماریزای خاصی به تنهایی در ایجاد عفونت‌های ناشی از آن عمل نمی کند، بلکه بیماری زایی آن تحت کنترل مجموعه ای چندزنی می باشد.

ژن *sidB* که کد کننده پروتئین *sidB* و از اعضای خانواده Septation Inintiation Network (SIN) است، علاوه بر فعالیت سیدروفوری دارای نقش اساسی در تشکیل دیواره و کونیدی زایی می باشد. این ژن در رشد میسلیم‌های رویشی دارای نقش می باشد و همچنین یک پپتید سنتتاز دارای خاصیت سرین-پروتئاز و مشتمل بر ۶۵۴ اسید آمینه می باشد (Kim et al. 2006) سیدروفورها، مولکول‌های کوچکی هستند که در نقل و انتقال آهن نقش دارند. در بسیاری از عوامل بیماری زا آهن به عنوان یک عنصر ضروری برای بسیاری از مسیرهای زیست ساختی و به عنوان یک کوفاکتور در واکنش‌های آنزیمی و به عنوان یک کاتالیزور در سیستم‌های انتقال الکترون عمل می کند. اما ناپایداری آهن آزاد و مکانیزم‌های دفاعی میزبان، عوامل بیماری زا را به شدت در کسب آهن محدود می سازد. برای اغلب عوامل بیماری زای انسانی از جمله اسپرژیلوس فومیگاتوس، توانایی کسب آهن از میزبان یک شاخص بسیار مهم برای حدت بیماری (ویرولان) محسوب می‌شود (Schrettl et al. 2004). کشف فعالیت ضد قارچی آزول‌ها، گزینه‌های درمانی متعددی را برای درمان عفونت‌های قارچی فرصت طلب به وجود آورد. اما به رغم تمام این پیشرفت‌ها مشخص شد که برخی ایزوله‌های قارچی نسبت به ترکیبات آزولی مقاومت دارند و به تدریج بروز مقاومت در بسیاری از سوش‌های دیگر نیز نسبت به ترکیبات آزولی پدیدارشد. موارد

دقت در تهیه سوسپانسیون یکنواخت قارچی، از یک معیار کدورت سنجی به نام استاندارد مک فارلند با درجه ۰/۵ استفاده گردید. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری تهیه شده داخل شیار لام نئوبار ریخته شده و تعداد اسپورها در ۲۰ میکرو لیتر شمارش گردید. تعداد اسپور مورد نظر در این مرحله $CFU/ML \times 10^4 \times 5$ می باشد.

۲) تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC): برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) از پروتوکل (Wayne 2008). استفاده گردید (CLSI/M38-A2). از دیکلوفناک سدیم (Pars Daou, Tehran, Iran) با غلظت پایه ۲۵ mg/ml استفاده شد و MIC آن در غلظت-های متفاوت (۲۵-۹۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) تعیین گردید. برای نرمال سازی غلظت دیکلوفناک سدیم در مراحل مختلف تست از رابطه زیر استفاده شد:

$$C_1(mg/ml) \cdot V_1(ml) = C_2(mg/ml) \cdot V_2(ml)$$

در هر میکروپلیت، سوسپانسیون قارچی همراه با دیکلوفناک سدیم به عنوان کنترل مثبت و بدون دیکلوفناک سدیم به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. در نهایت، پس از انکوباسیون مدت ۷۲ ساعت MIC آنها تعیین گردید.

۳) استخراج RNA: به منظور بررسی سطح بیان ژن *sidB* در آسپرژیلوس فومیگاتوس، تکنیک Real-time PCR انجام شد. آسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC 14489) روی محیط سابورو دکستروز برات در غلظت‌های ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیکلوفناک سدیم، همراه با کنترل مثبت و منفی، کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد، توده میسلیموم های رشد یافته با فسفات بافر سالین (PBS 1X) شستشو داده شد و با استفاده از نیتروژن مایع و به جهت به دست آوردن پودر میسلیمومی، ساییده شد. و در نهایت، با استفاده از پودر میسلیمومی بدست آمده، استخراج RNA با روش گوانیدینیوم فنل- کلروفرم- تیوسیانات (McGookin 1984) (GITC) انجام شد. که روش کار و مقادیر هریک از اجزای استفاده شده در این روش به شرح زیر بوده است:

خلاف آسپرژیلوس فومیگاتوس، این مسیر در آسپرژیلوس نیدولانس کاملاً مطالعه شده است و ژن‌ها مولکول‌های موثر مورد شناسایی قرار گرفته اند (Power et al. 2010). لذا، با توجه به اهمیت محصولات کد شده توسط ژن *sidB* (Kim et al. 2006)، بررسی امکان وجود و فعالیت مشابه این ژن در آسپرژیلوس فومیگاتوس در جهت کنترل عفونت‌های حاصله، از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین دلیل و با توجه به خصوصیات ذکر شده در مورد داروی دیکلوفناک سدیم، و همچنین بروز روز افزون موارد مقاومت آزولی، درصدد بر آمدیم تا ضمن تحقیق بر میزان تأثیر داروی دیکلوفناک سدیم بر میزان رشد سوش استاندارد آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC14189، میزان تأثیر این دارو را در شرایط آزمایشگاهی و در غلظت‌های مختلف بر بیان ژن *sidB* بصورت نیمه کمی و با روش Real-time PCR سنجش نماییم.

روش کار

۱) سوش قارچ، محیط کشت و شرایط رشد: در ابتدا، طبق پروتوکل استاندارد (CLSI) M38-A2 Molds، سوش استاندارد آسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC14489) روی محیط پوتیتو دکستروز آگار (Merc, Germany) به مدت ۷ روز و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد کشت داده شد. به جهت شناور سازی اسپورهای رشد یافته روی سطح کلنی، از آب مقطر استریل استفاده شد. به منظور تهیه سوسپانسیون قارچی، مقداری آب مقطر استریل روی سطح پلیت حاوی کشت قارچ پخش گردید تا اسپورها در محیط معلق گردند. سپس به آهستگی محیط حاوی اسپورها را با سمپلر برداشت، و در لوله فالكون استریل نگهداری شد جذب نوری (OD) سوسپانسیون تهیه شده در ۵۳۰ نانومتر سنجیده شد که در مورد گونه های آسپرژیلوس باید در محدوده ۰/۱۳-۰/۰۹ قرار داشته باشد. به جهت افزایش

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/keeping) طراحی شدند و از ژن β -actin به عنوان ژنی با بیان ثابت (House gene) به منظور نرمال سازی و تعیین صحت عملکرد و بیان ژن sidB استفاده شد (پرایمرها توسط شرکت سینا ژن ساخته شدند).

5) Real-time PCR: این مرحله با استفاده از دستگاه StepOne-Plus™ real-time PCR System (Applied Biosystems, USA) و سایبر گرین SYBR® Premix Ex Taq™ II طبق برنامه زمانی جدول ۲ انجام شد و تفسیر نتایج با نرم افزار REST(2008 V2.0.7) به عمل آمد.

نتایج

بررسی نتایج کشت در غلظت های مختلف دیکلوفناک سدیم پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون و تعیین MIC نتایج نشان می دهد پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، با افزایش غلظت دارو، میزان رشد قارچ نیز کاهش می یابد. بطوریکه در نمونه کنترل مثبت که فاقد دارو بوده است، توده های میسلیمی به میزان بالایی رشد نمودند اما در نمونه حاوی ۹۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیکلوفناک سدیم که حاوی بیشترین غلظت دارو بود، هیچگونه اثری از رشد قارچ مشاهده نگردید و تنها اسپورهای قارچی مشاهده شد. طبق نتایج Real-time PCR هیچگونه نتیجه قابل استنادی از نظر بیان ژن sidB در نمونه تیمار شده با دیکلوفناک سدیم (و نیز نمونه شاهد) در مقایسه با ژن β -actin بدست نیامد (نمودار ۱).

بحث

گونه های وابسته به جنس اسپرژیلوس، قارچ هایی ساپروفیت و پراکنده در محیط هستند که نقش مهمی را در چرخه نیتروژن و کربن ایفا میکنند. اگرچه زیستگاه اولیه آنها خاک، سبزیجات در حال فساد می باشد اما اسپرژیلوس ها کونیدی هایی هیدروفوب و بسیار کوچک تولید می کنند که به آسانی در هوا منتشر شده و قابلیت بقا در شرایط

۱- برداشت GITC هم حجم با پودر قارچی و افزودن ۱:۱۰ حجم اولیه استات سدیم ۳ مولار و مخلوط کردن مواد فوق

۲- افزودن هم حجم اولیه ی فنل اسیدی و مخلوط کردن و در مرحله بعد افزودن ۵ : ۱ حجم اولیه از کلروفورم و مخلوط کردن آن پس از سانتریفوژ کردن در ۱۲۰۰۰xg به مدت ۵ دقیقه

۳- انتقال مایع رویی افزودن هم حجم اولیه ایزوپروپانول و مخلوط کردن و سپس قراردادن آن در فریزر با دمای منفی بیست درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت و در آخر، سانتریفوژ و خالی کردن مایع رویی.

۴- به نسبت ۳ : ۱ حجم اولیه از محلول GITC به رسوب اضافه و آن را حل کرده، به همین نسبت ایزوپروپانول اضافه و در فریزر منفی بیست درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت نگهداری پس از سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰xg به مدت ۵ دقیقه مایع رویی رسوب را با الکل مطلق شستشو داده و در ۵۰ میکرولیتر بافر TE8 حل کردیم

برای سنجش صحت فرایند استخراج و مشاهده باندهای ۵۵، ۱۸۵، ۲۶۵، ژل الکتروفورز با ۱۰ میکرولیتر از RNA به همراه ۱۰ میکرولیتر از RNA loading buffer انجام شد تصویر ۱. علاوه بر این، بوسیله اسپکتروفتومتر جذب نوری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و همینطور غلظت RNA های استخراج شده مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱).

۴) طراحی پرایمر و ساخت cDNA: RT-PCR با استفاده از آنزیم Reverse Transcriptase (RT) از الگوی RNA مکملش cDNA ساخته شد و از پرایمرهای هگزامر و آنزیم Revers transcriptase و بر اساس پروتکل کیت فرمتناز ساخت شرکت آلمان (Revert Aid, Fermentase Germany) استفاده گردید. پرایمرهای اسپرژیلوس فومیگاتوس، از نواحی همولوگ با ناحیه ژنی sidB در اسپرژیلوس نیدولانس و با توجه به سکانس آنها در ژن بانک (NCBI http://)

بررسی اثر مهارى این دارو بر سایر مولکول ها پرداخته اند. سلول های تمام میکرو ارگانیزم ها جهت رشد خود وابسته به بیوسنتز DNA می باشند، درحالیکه RNA برای ترجمه و فراهم کردن اطلاعات جهت ساخت پروتئین ها و آنزیم های مختلف مورد نیاز است. بنابراین هرگونه تداخل در بیوسنتز DNA یا RNA موجب ممانعت از رشد میکرو ارگانیزم ها خواهد شد. ترکیباتی که قدرت باند شدن با DNA یا RNA را دارا هستند، منجر به تغییراتی می گردند که پیام این مولکول ها غیر قابل تشخیص گردد و امکان رونویسی و ترجمه صحیح از دست رفته و تولید متابولیت ها و محصولات مرتبط با رشد با مخاطره مواجه خواهند شد، بنابراین این گونه ترکیبات اغلب نقش مهارکننده رشد را ایفا می کنند (Dastidar et al. 2000; Yin et al. 2014) با توجه به نتایج پژوهش حاضر، داروی دیکلوفناک سدیم دارای خاصیت مهارکنندگی بر رشد اسپرزیلوس فومیگاتوس می باشد. موافق با یافته های این تحقیق، نتایج بررسی های دیگری نیز نشان از اثرات مهار کنندگی دیکلوفناک سدیم بر رشد میکروارگانیزم ها دارند، برای مثال، تأثیر مهارى دیکلوفناک سدیم بر تشکیل جرم تیوب در کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه قرار گرفت و اثرات وابسته به دوز دیکلوفناک سدیم بر مهار تولید جرم تیوب در این قارچ مشاهده گردید (Rashki Ghalehnoo et al. 2010). در مطالعه دیگری، اثر مهارى چند داروی غیر استروئیدی و ضد التهابی، از جمله دیکلوفناک، بر رشد دو مخمرهای کاندیدا آلبیکنس و کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس اثبات گردید (Ncango et al. 2011). علاوه بر قارچ ها، اثرات ضد ویروسی داروهای غیر استروئیدی و ضد التهابی بر ویروس آنفولانزا، سایتو مگالو ویروس (CMV) و واریسلا زوستر ویروس (VZV) و اثرات ضد باکتریایی بر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و اشرشیاکلی نیز اثبات شده است (Dutta et al. 2007; Mazumdar et al. 2006; Pan and Hung 2002) اما علی رغم این نتایج، برخی تحقیقات نشانگر آنند که درماتوفیت هایی مثل اپیدرموفیتون

محیطی مختلف با شرایط متغیر را دارا می باشند (Bennett 2010). در میان گونه های پاتوژن انسانی، اسپرزیلوس فومیگاتوس به عنوان عامل اصلی و اولیه ایجاد کننده عفونت های انسانی همواره مورد بحث بوده و می تواند منجر به ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها در انسانها گردد، البته طیف بیماری های ایجاد شده وابستگی مستقیمی به عملکرد صحیح سیستم ایمنی میزبان (به ویژه سیستم ایمنی ذاتی به عنوان اولین سد برخورد کننده با کونیدی ها) داشته و بنابراین نوع بیماری ها و علائم بروز یافته از ایجاد واکنش های آلرژیک تا بیماری های مهاجم و کشنده متغیر است. میزان کشندگی این بیماری ها بین ۴۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است و علاوه بر شرایط سیستم ایمنی میزبان به محل عفونت و رژیم درمانی مورد استفاده نیز بستگی دارد (Bafadhel et al. 2014). مشکل اساسی در جهت درمان این بیماران پیدایش موارد روز افزون سویه های مقاوم به عوامل آزولی می باشد که همواره به عنوان بحثی چالش برانگیز همواره مطرح می باشد. بنابراین تحقیق و مطالعه در راستای جایگزینی سایر عوامل دارویی در جهت پیشگیری از سیر عفونت در این افراد، دارای اهمیت ویژه ای می باشد. دیکلوفناک سدیم یک داروی ضد التهابی و غیراستروئیدی است که برای کاهش التهاب و تسکین درد در شرایط لازم مورد استفاده قرار می گیرد. التهاب یک واکنش طبیعی بدن در جهت حذف میکروارگانیسم ها و عوامل مترشحه از آنها می باشد. از نظر مکانیسم عمل می توان از یک دیدگاه چنین بیان نمود که، دیکلوفناک سدیم اثرات مهارى خود را با مهار ایزوآنزیم های سیکلواکسیژناز (COX-1 و COX-2) ایفا می کند. سیکلواکسیژنازها مسؤول تولید ترومبوکسان ها و پروستاگلندین ها از آراشیدونیک اسید هستند و پروستاگلندین ها به عنوان مولکول های پیامبر در پروسه التهاب التهاب محسوب می شوند (Mitchell et al. 1993). از سویی، علاوه بر اثر اثبات شده داروی دیکلوفناک بر مسیر سیکلواکسیژناز، برخی مطالعات به

سبب کاهش تولید میسلیموم ها و کاهش قابل توجه رشد اسپرژیلوس فومیگاتوس گردد. بنابراین ممکن است، در آینده و مشروط بر انجام بررسی‌های بالینی، بتواند بعنوان یکی از گزینه‌های انتخابی در جهت درمان موارد مقاوم به سایر داروهای ضدقارچی متداول مورد استفاده قرار گیرد. شایان ذکر است که این مطالعه تنها در حیطه ارزیابی اثرات مهاری داروی دیکلوفناک سدیم در *invitro* بر سوش استاندارد اسپرژیلوس فومیگاتوس صورت گرفته و با توجه به عدم مشاهده روند بیانی در ژن *sidB*، در نمونه‌های تیمار شده و نمونه کنترل، چنین به نظر می‌آید که ابتدا باید ژن *sidB* در این گونه قارچی به صورت کامل تعیین توالی گردد و سپس روند بیانی آن مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین انجام مطالعه اثر دیکلوفناک بر روی ژن مذکور سویه‌های جدا شده از بیماران همچنین ژن‌های دیگر دخیل در رشد نیز در مطالعات تکمیلی بعدی ضروری به نظر می‌رسد تا بطور دقیق اثر دیکلوفناک بر روی ژن *sidB*، مورد بررسی و نتیجه‌گیری قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت‌های معنوی و مادی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران با قرارداد شماره ۲۴۰/۱۹۱۴ انجام یافته است، بدین وسیله از زحمات این عزیزان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. شایان ذکر است، که این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد ساناز نرگسی دانشجوی دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده که با همکاری بخش قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفته است.

فلوکوزوم و ترایکوفیتون منتاگروفیتس قادرند از NSAID ها به عنوان منبع کربن و در جهت رشد خود استفاده کنند (Hussein and AL-Janabi 2011).

باتوجه مطالعات انجام شده مشخص شده بیوسنتز سیدروفور در اسپرژیلوس فومیگاتوس و اسپرژیلوس نیدولانس دارای مسیر مشابهی هستند (Power et al. 2010). بنابراین انتظار داشتیم که با مواجهه این ارگانیزم با غلظت‌های متفاوت دیکلوفناک تغییراتی در بیان این ژن مشاهده شود. که بعلت عدم مشاهده افزایش یا کاهش در بیان در ژن *sidB*، در نمونه‌های تیمار شده و نمونه کنترل اثر مهاری این دارو بر ژن مذکور اثبات نشد. ولی مشاهده کاهش قابل توجه رشد و میسلیموم در غلظت‌های بالای دیکلوفناک و اثبات اثر مهاری غلظت‌های متفاوت دیکلوفناک در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل، چنین به نظر می‌آید ژن‌های دیگری غیر از ژن *sidB*، در رشد رشد قارچ موثر است. البته موارد دیگری از جمله اینکه در این مطالعه تنها اثر این دارو تنها بر روی سوش استاندارد اسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC14489) مورد بررسی قرار گرفته، ممکن است اثر این دارو بر سویه‌های جدا شده از بیماران متفاوت باشد. با در نظر گرفت اینکه در مطالعه حاضر فقط بیان در ژن *sidB* مورد بررسی قرار گرفته می‌توان نتیجه‌گیری کرد ممکن است ژنها و عوامل دیگر در رشد اسپرژیلوس فومیگاتوس دخیل باشند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهند، داروی دیکلوفناک سدیم با اثر وابسته به دوز، می‌تواند

جدول ۱- مشخصات پرایمر ژن های sidB و β -actin

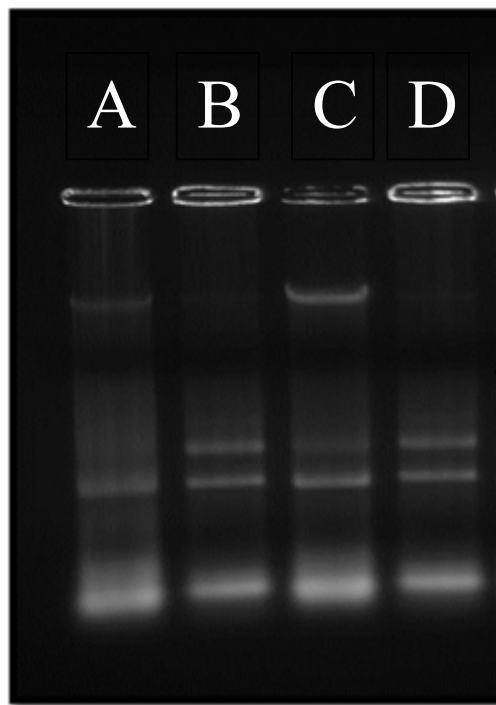
نام پرایمر	توالی پرایمر
Primer Sense (sidB-S1)	5'-AAGAGATGGCTGAGCGTGAT-3'
Primer Anti sense (sidB-As1)	5'-GTACCAAAGTCCTCGGTTGG-3'
Primer Sense (β -actin -S1)	5'-ACGGTATTGTTTCCAAGTGGGAC-3'
Primer Anti sense (β -actin- As1)	5'-TGGACTTCGGTCAACAAAAGTGG-3'

جدول ۲- برنامه زمانی و دمایی جهت انجام Real-time PCR

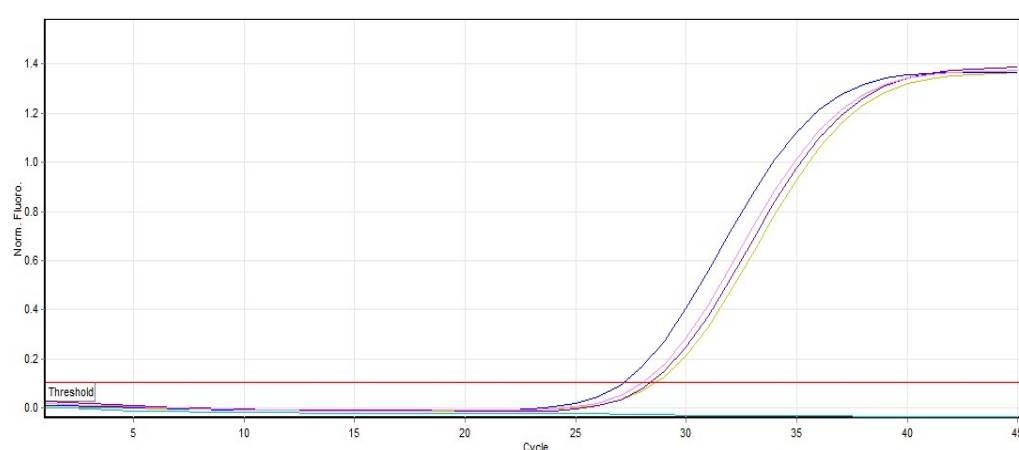
Heat lid to 110°C	94°C	30"
Start loop, 40x	95°	5"
	58°C	20"
	72°C	30"
Close loop	72°C	60"

جدول ۳- نتایج سنجش جذب نوری (OD) RNA استخراج شده در غلظت های ۵۰۰، ۷۰۰، ۹۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و کنترل مثبت

نمونه	OD (۲۶۰nm)	OD (۲۸۰nm)	OD (۲۶۰/۲۸۰nm)
کنترل مثبت	۰/۱۶۴	۰/۱۲۳	۱/۳۵۷
حاوی ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ دیکلوفناک سدیم	۰/۲۰۳	۰/۱۶۳	۱/۳۸۵
حاوی ۷۰۰ $\mu\text{g/ml}$ دیکلوفناک سدیم	۰/۲۲۴	۰/۱۸۰	۱/۴۲۷
حاوی ۹۰۰ $\mu\text{g/ml}$ دیکلوفناک سدیم	۰/۳۴۹	۰/۳۱۳	۱/۴۵۰



تصویر ۱- باندهای RNA استخراج شده از نمونه های تیمار شده با (B) ۹۰۰، (C) ۷۰۰، (D) ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیکلوفناک سدیم و کنترل مثبت (A)



نمودار ۱- بیان ژن sidB بر اساس Real-time PCR

References

- Alem, M.A. and Douglas, L.J., 2004. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48, pp. 41-47.
- Bafadhel, M., Mckenna, S. and Agbetle, J., 2014. *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. *European Respiratory Journal*, 43, pp. 64-71.
- Bennet, J.W., 2010. *An overview of the genus Aspergillus*, Caiser Academic Press, Portland.
- Dastidar, S.G., Ganguly, K., Chaudhuri, K. and Chakrabarty, A., 2000. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. *International journal of antimicrobial agents*, 14, pp. 249-251.
- Dutta, N.K., Mazumdar, K., Dastidar, S.G. and Park, J.H., 2007. Activity of diclofenac used alone and in combination with streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *International journal of antimicrobial agents*, 30, pp. 336-340.
- Hohl, T.M. and Felmessed, M., 2007. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic cell*, 6, pp. 1953-1963.
- Hussein, A.A. and Al-Janabi, S., 2011. Consumption of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs by Dermatophytes as Alternative Carbon Source.
- Kim, J.M., Lu, L., Shao, R., Chin, J. and Liu, B., 2006. Isolation of mutations that bypass the requirement of the septation initiation network for septum formation and conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 173, pp. 685-696.
- Latge, J.P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12, pp. 310-350.
- Lelievre, L., Groh, M., Angebault, C., Maherault, A.C., Didier, E. and Bougnoux, M.E., 2013. Azole resistant *Aspergillus*

- fumigatus: An emerging problem. *Medecine et maladies infectieuses*.
- Mazumdar, K., Dutta, N.K., Dastidar, S.G., Motohashi, N. and Shirataki, Y., 2006. Diclofenac in the management of E. coli urinary tract infections. *In vivo*, 20, pp. 613-619.
- Mcgookin, R., 1984. RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. *Nucleic Acids*, pp. 113-116.
- Mehta, P., Joganathan, V., Oppenheim, B. and Durrani, O.M., 2010. Aspergillus infection of Supramid orbital implant and hyperostosis of orbital bone: report of a unique case. *Orbit*, 29, pp. 370-372.
- Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J. and Vane, J.R., 1993. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, pp. 11693-11697.
- Ncango, D.M., Pohl, C.H., Van Wyk, P.W. and Kock, J.L., 2011. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit growth of yeast pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res*, 5, pp. 1123-1125.
- Pan, M.R. and Hung, W.C., 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 277, pp. 32775-32780.
- Payan, D. and Katzung, B., 1995. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; nonopioid analgesics; drugs used in gout. *Basic & Clinical Pharmacology. 6th eed.*, Norwalk, Appleton & Lange.
- Pfaller, M. and Diekema, D., 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp. 4419-4431.
- Power, T., Ortoneda, M., Morrissey, J.P. and Dobson, A.D., 2010. Differential expression of genes involved in iron metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *International Microbiology*, 9, pp. 281-287.
- Rashki Ghalehnoo, Z., Rashki, A., Najimi, M. and Dominguez, A., 2010. The role of diclofenac sodium in the dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbial pathogenesis*, 48, pp. 110-115.
- Schrettl, M., Bignell, E. and Kragl, S., 2004. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *The Journal of experimental medicine*, 200, pp. 1213-1219.
- Sharma, N.S., Ooi, J.L. and Maloof, T.C., 2007. Culture-proven *Aspergillus fumigatus* infection in a primary hydroxyapatite orbital implant. *Clinical & experimental ophthalmology*, 35, pp. 294-295.
- Umaru, T., Nwamba, C.O., Kolo, I. and Nwodo, U., 2009. Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: Diclofenac sodium as a case study. *African Journal of Biotechnology*, 8.
- Upadhyayula, S., Kapur, K.K. and Seth, A., 2006. Three-Dimensional Echocardiographic Evaluation of an Aspergilloma Complicating Right

Ventricular Permanent Pacemaker Implant. *Echocardiography*, 23, pp. 614-615.

Wayne, P., 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard;- CLSI document M27-A3. *CLSI 2008a*, 28, pp. 6-12.

Weissenbacher, E.R., 2014. Fundamentals of Immunology. *Immunology of the Female Genital Tract*. Springer.

Yin, Z., Wang, Y., Whittell, L.R. and Jergic, S., 2014. DNA replication is the target for the antibacterial effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Chemistry & biology*, 21, pp. 481-487.

The Effects of Diclofenac Sodium on Growth and Morphological Changes in *Aspergillus Fumigatus* and Exploring its Effects on Siderophore Protein by Determining the SidB Gene Expression

Nargesi, S., MSc. Department of Medical Mycology and Parasitology, School of public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Koordbacheh, P., Ph.D. Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Farahyar, Sh., Ph.D. Assistant Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicin, Iran University of Medical Sciences, Tehran Iran

Noorbakhsh, F., Ph.D. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Varamin, Iran

Rezaie, S., Ph.D. Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran- Corresponding Author: srezaie@tums.ac.ir

Received: Mar 15, 2016

Accepted: Aug 17, 2016

ABSTRACT

Background and Aim: Considering the increasing drug resistance to *Aspergillus fumigatus*, search for genes involved in its pathogenicity and identifying alternative antifungal drugs is of utmost importance. The aim of this study was to determine the effects of diclofenac sodium on the growth and sidB gene expression in *Aspergillus fumigatus*.

Materials and Methods: In this study, *Aspergillus fumigatus* was cultured and a fungal suspension prepared, followed by determining the minimum inhibitory concentration of diclofenac sodium at a concentration of 25-1000 µg/ml. Then, RNA was extracted from the suspension at concentrations of 500,700 and 900 µg/ml of the drug. Finally, the extent of expression of the gene was determined by measuring different levels of *mRNA*-sidB by Real-time PCR.

Results: With increasing concentrations of diclofenac sodium, mycelium production decreased. Concentrations higher than 500 µg/ml had considerable inhibitory effects on the growth of *Aspergillus fumigatus*.

Conclusion: Findings of this study indicate that diclofenac sodium can cause a sharp reduction in the growth rate of *Aspergillus fumigatus*. Accordingly, it can be considered as one of the effective pharmacological agents for inhibiting the growth of this fungus.

Keywords: Aspergillus Fumigatus, Diclofenac Sodium, SidB Gene