مجله دانشکده بهداشت وانستیتوتحقیقات بهداشتی
پاییز ۱۳۹۵، دوره ١٤، شماره سوم ، صفحه ٩٦-٨٥

مقاله پژوهشی

تاثیر 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: ١٣٩٤/١٢/١٥ **تاریخ پذیرش: ١٣٩٥/٥/٢٧**

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 µg/ml ۱۰۰۰-۲۵ تعیین گردید. سپس، استخراج RNA از سوسپانسیون قارچی تحت غلظت های ۷۰۰،۵۰۰ و µg/ml ۹۰۰ 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 میسلیوم کاهش می یابد و دارو درغلظت های بالاتر از µg /ml ۵۰۰، 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 مبنا، 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

اعضای جنس آسپرژیلوس قارچ هایی ساپروفیت و رشته‌ای هستند که در خاک، باقیمانده‌های گیاهان و حتی هوا موجود بوده وانتشار جهانی دارند. از میان این گونه-های عفونی فرصت طلب، آسپرژیلوس فومیگاتوس بیشترین گونه جدا شده و پس از آن گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس و نایجر قرار دارند. طیف بیماری-های ایجاد شده توسط آسپرژیلوس‌ها وسیع است اما به طور کلی شامل: آسپرژیلوزیس آلرژیک، کلنیزه و مهاجم (سیستمیک) می‌باشد (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

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

کشنده است، به وجود آمد و در حال حاضر آسپرژیلوس فومیگاتوس غالب ترین عامل بیماری زای آسپرژیلوزیس 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) آسپرژیلوس فومیگاتوس قارچی است که عامل بیماریزای خاصی به تنهایی در ایجاد عفونت های ناشی از آن عمل نمی کند، بلکه بیماری زایی آن تحت کنترل مجموعه ای چندژنی 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 میسلیوم های رویشی دارای نقش می باشد و همچنین یک پپتید سنتتاز دارای خاصیت سرین-پروتئازی و مشتمل بر ٦٥٤ اسید آمینه می باشد (Kim et al. 2006) سیدروفورها، مولکول های 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 واکنش های آنزیمی وبه عنوان یک کاتالیزور در سیستم های انتقال الکترون عمل می کند. اما ناپایداری آهن آزاد و مکانیزم های دفاعی میزبان، عوامل بیماری زا را به شدت در کسب آهن محدود می سازد. برای اغلب عوامل بیماری زای انسانی از جمله آسپرژیلوس فومیگاتوس، توانایی کسب آهن از میزبان یک شاخص بسیار مهم برای حدت بیماری (ویرولانس) محسوب می-شود (Schrettl et al. 2004). کشف فعالیت ضد قارچی آزول ها، گزینه های درمانی متعددی را برای درمان عفونت های قارچی فرصت طلب به وجود آورد. اما به رغم تمام این پیشرفت ها مشخص شد که برخی ایزوله های قارچی نسبت به ترکیبات آزولی مقاومت دارند و به تدریج بروز مقاومت در بسیاری از سوش های دیگر نیز نسبت به ترکیبات آزولی پدیدارشد. موارد مقاومت آزولی آسپرژیلوس فومیگاتوس که در 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 آسپرژیلوس 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 سلول هایی 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 پروستاگلندین ها اشاره نمود. دیکلوفناک سدیم یک داروی غیراستروئیدی و ضد التهابی است و به وسیله مهار ایزوآنزیم‌های مسیر سیکلواکسیژناز (COX) موجب انسداد مسیر ساخت پروستاگلندین ها می شود. پروستاگلندین ها گروهی از ترکیبات کوچک لیپیدی هستند که بطور آنزیماتیک از اسیدهای چرب مشتق می شوند و نقش های مهمی را در سلول ها و بافت ها ایفا می کنند. دیکلوفناک سدیم همراستا با دیگر داروهای گروه NSAID، به طور گسترده ای در درمان ورم مفاصل و دیگر بیماری های مرتبط بکار می رود (Umaru et al. 2009; Payan and Katzung 1995) اما اثرات آن ضد عوامل بیماری زا (قارچ ها، باکتری ها و ویروس ها) نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Dastidar et al. 2000; Alem and Douglas 2004) بیوسنتز سیدروفور در آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نیدولانس دارای مسیر مشابهی است. اما بر

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

خلاف آسپرژیلوس فومیگاتوس، این مسیر در آسپرژیلوس نیدولانس کاملا مطالعه شده است و ژن ها مولکول های 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 تاثیر داروی دیکلوفناک سدیم بر میزان رشد سوش استاندارد آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC14189، میزان تاثیر این دارو را در شرایط آزمایشگاهی و در غلظت های 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 M38-A2 Molds (CLSI)، سوش استاندارد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (ATCC14489) روی محیط پوتیتو دکستروز آگار (Merc, Germany) به مدت ۷روز 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 ، ودر لوله فالکون 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 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 سوسپانسون 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 ۵×۱۰^{۴} CFU/ML می باشد.

۲) تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC): برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) از پروتوکل (CLSI/M38-A2) استفاده گردید (Wayne 2008). از دیکلوفناک سدیم (Pars Daou, Tehran, Iran) با غلظت پایه ۲۵ mg/ml استفاده شد وMIC آن درغلظت-های متفاوت (۹۰۰-۲۵ 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 منفیدر 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 براث 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 میسلیوم 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 میسلیومی، ساییده شد. و در نهایت، با استفاده از پودر میسلیومی 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:

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

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

۲- افزودن هم حجم اولیه ی فنل اسیدی و مخلوط کردن ودر مرحله بعد افزودن ۵ : ۱ حجم اولیه از کلروفرم 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، سانتریفیوژ و خالی کردن مایع رویی.

٤- 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 بافرTE8 حل کردیم

برای سنجش صحت فرایند استخراج و مشاهده باندهای 5s، 18s، 26s، ژل الکتروفورز با۱۰ میکرولیتراز RNA به همراه ۱۰میکرولیتر از RNA loading buffer انجام شد تصویر۱. علاوه بر این، بوسیله اسپکتروفتومتر جذب نوری در ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر و همینطور غلظت RNA های استخراج شده مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱).

٤) 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 فرمنتاز ساخت شرکت آلمان (Revert Aid, Fermentase Germany) استفاده گردید. پرایمرهای آسپرژیلوس فومیگاتوس، از نواحی همولوگ با ناحیه ژنی sidB در آسپرژیلوس نیدولانس و با توجه به سکانس آنها در ژن بانک (NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) طراحی شدند و از ژن β-actin به عنوان ژنی با بیان ثابت keeping (House gene) به منظور نرمال سازی و تعیین صحت عملکرد و بیان ژن sidB استفاده شد (پرایمرها توسط شرکت سینا ژن ساخته شدند).

۵) Real-time PCR: این مرحله با استفاده از دستگاه StepOne-PlusTM 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 از۷۲ ساعت انکوباسیون و تعیین MIC نتایج نشان می‌دهد پس از۷۲ ساعت انکوباسیون، با افزایش غلظت دارو، میزان رشد قارچ نیز کاهش می‌یابد. بطوریکه در نمونه کنترل مثبت که فاقد دارو بوده است، توده های میسلیومی 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 (نمودار۱).

بحث

گونه های وابسته به جنس آسپرژیلوس، 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 آسپژیلوس ها کونیدی هایی هیدروفوب و بسیار کوچک تولید می کنند که به آسانی در هوا منتشر شده و قابلیت بقا در شرایط

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

محیطی مختلف با شرایط متغیر را دارا می‌باشند (Bennett 2010). در میان گونه های پاتوژن انسانی، آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان عامل اصلی و اولیه ایجاد کننده عفونت های انسانی همواره مورد بحث بوده و می‌تواند منجر به ایجاد طیف وسعی از بیماری‌ها در انسانها گردد، البته طیف بیماری‌های 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 بیماری‌ها و علایم بروز یافته از ایجاد واکنش های آلرژیک تا بیماری‌های مهاجم و کشنده متغیر است. میزان کشندگی این بیماری‌ها بین ٤٠ 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 ویژه‌ای می‌باشد. دیکلوفناک سدیم یک داروی ضد التهابی و غیراستروئیدی است که برای کاهش التهاب و تسکین درد در شرایط لازم مورد استفاده قرار می‌گیرد. التهاب یک واکنش طبیعی بدن در جهت حذف میکروارگاتیزم ها و عوامل مترشحه از آنها می‌باشد. از نظر مکانیسم عمل می‌توان از یک دیدگاه چنین بیان نمود که، دیکلوفناک سدیم اثرات مهاری خود را با مهار ایزوآنزیم‌های سیکلواکسیژناز(COX-2و COX-1) ایفا می‌کند. سیکلواکسیژنازها مسؤول تولید ترومبوکسان‌ها و پروستاگلندین ها از آراشیدونیک اسید هستند و پروستاگلندین ها به عنوان مولکول های پیامبر در پروسه التهاب التهاب محسوب می‌شوند (Mitchell et al. 1993). از سویی، علاوه بر اثر اثبات شده داروی دیکلوفناک بر مسیر سیکلواکسیژناز ، برخی مطالعات به بررسی اثر مهاری 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 می‌گردند که پیام این مولکول ها غیر قابل تشخیص گردد و امکان رونویسی و ترجمه صحیح از دست رفته و تولید متابولیت‌ها 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 آسپرژیلوس فومیگاتوس می باشد. موافق با یافته های این تحقیق، نتایج بررسی‌های دیگری نیز نشان از اثرات مهار کنندگی دیکلوفناک سدیم بر رشد میکروارگانیزم ها دارند، برای مثال، تاثیر مهاری 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 مهاری چند داروی غیر استروئیدی و ضد التهابی، از جمله دیکلوفناک، بر رشد دو مخمرهای کاندیدااآلبیکنس و کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس اثبات گردید (Ncango et al. 2011). علاوه بر قارچ‌ها، 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

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

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 آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نیدولانس دارای مسیر مشابهی هستند (Power et al. 2010) بنابراین انتظار داشتیم که با مواجهه این ارگانیزم با غلظت های متفاوت دیکلو فناک تغییراتی در بیان این ژن مشاهده شود.که بعلت عدم مشاهده افزایش یا کاهش در بیان در ژن sidB، در نمونه های تیمار شده و نمونه کنترل اثر مهاری این دارو بر ژن مذکور اثبات نشد. ولی مشاهده کاهش قابل توجه رشد و میسلیوم در غلظت های بالای دیکلو فناک و اثبات اثر مهاری غلظت های متفاوت دیکلو فناک در نمونه های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل، چنین به نظر می آید 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 برروی سوش استاندارد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (ATCC14489) مورد بررسی قرار گرفته، ممکن است اثر این دارو بر سویه های جدا شده از بیماران متفاوت باشد. با در نظر گرفت اینکه در مطالعه حاضر فقط بیان در ژن sidB مورد بررسی قرار گرفته می توان نتیجه گیری کرد ممکن است ژنها وعوامل دیگر در رشد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* دخیل باشند .

نتیجه گیری

یافته های حاصل از این پژوهش نشان می دهند، داروی دیکلوفناک سدیم با اثر وابسته به دوز، می‌تواند سبب کاهش تولید میسلیوم ها و کاهش قابل توجه رشد آسپرژیلوس فومیگاتوس گردد. بنابراین ممکن است، در آینده و مشروط بر انجام بررسی‌های بالینی، بتواند بعنوان یکی از گزینه های 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 آسپرژلوس فومیگاتوس صورت گرفته و با توجه به عدم مشاهده روند بیانی در ژن sidB، در نمونه‌های تیمار شده و نمونه کنترل، چنین به نظر می آید که ابتد 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 سویه های 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 نتیجه گیری قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت‌های معنوی و مادی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران با قرارداد شماره ۲٤۰/۱۹۱٤ انجام یافته است، بدین وسیله از زحمات این عزیزان تقدیر و تشکر به عمل می آید. 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.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

جدول۱- مشخصات پرایمر ژن های sidB و β-actin

نام پرایمر	توالی پرایمر
Primer Sense (sidB-S1)	***۵′AAGAGATGGCTGAGCGTGAT۳′***
Primer Anti sense (sidB-As1)	***۵′GTACCAAAGTCCTCGGTTGG۳′***
Primer Sense (β-actin -S1)	***۵′ACGGTATTGTTTCCAACTGGGAC۳′***
Primer Anti sense (β-actin- As1)	***۵′ TGGACTTCGGTCAACAAAACTGG۳′***

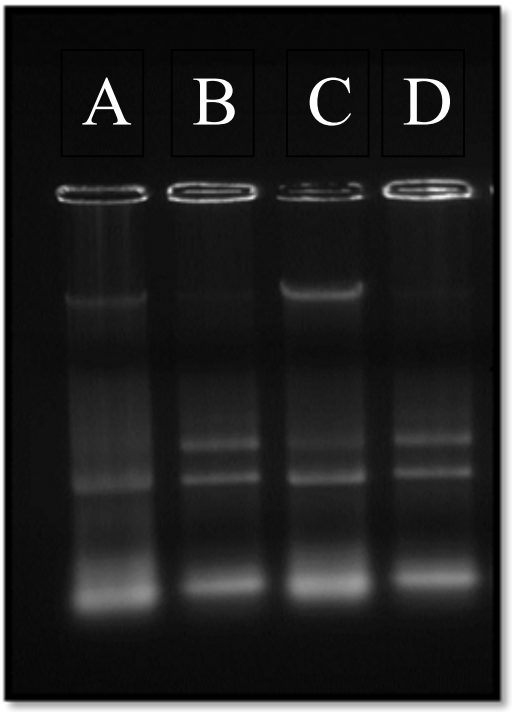
جدول۲- برنامه زمانی و دمایی جهت انجام Real-time PCR

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

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

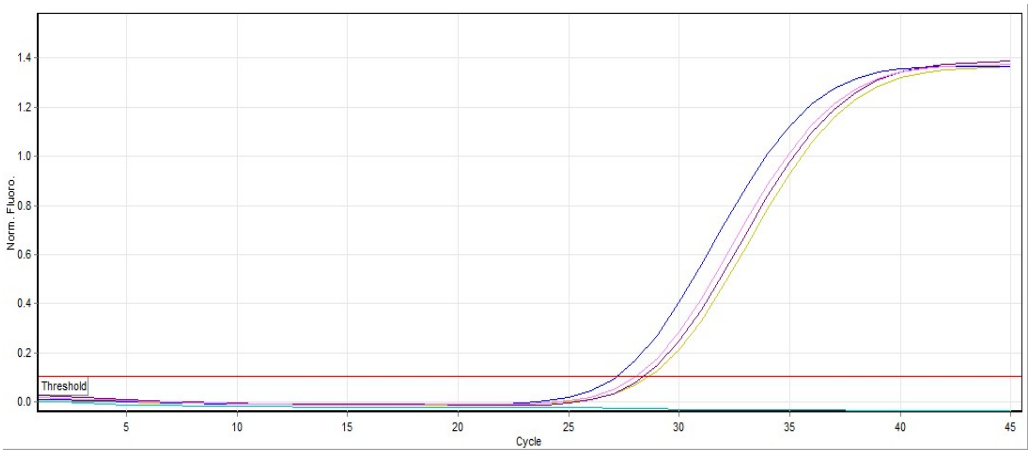
جدول۳- نتایج سنجش جذب نوری RNA (OD) استخراج شده در غلظت های µg/ml ۹۰۰، ۷۰۰، ۵۰۰ و کنترل مثبت

نمونه	OD (۲۶۰nm)	OD (۲۸۰nm)	OD (۲۶۰/۲۸۰nm)
کنترل مثبت	۰/۱۶٤	۰/۱۲۳	۱/۳۵۷
حاوی µg/ml ۵۰۰ دیکلوفناک سدیم	۰/۲۰۳	۰/۱۶۳	۱/۳۸۵
حاوی µg/ml ۷۰۰ دیکلوفناک سدیم	۰/۲۲٤	۰/۱۸۰	۱/٤۲۷
حاوی µg/ml ۹۰۰ دیکلوفناک سدیم	۰/۳٤۹	۰/۳۱۳	۱/٤۵۰



تصویر۱- 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)

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]



نمودار۱- 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 Felfmessed, 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

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

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

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

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.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]

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: Aspergilus Fumigatus, Diclofenac Sodium, SidB Gene

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-03-03]