مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر خاصیت fungicidal ایتراکونازول در مهار بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس جهت ارائه راهکار درمانی مناسب در موارد recalcitrant onychomycosis

مهسا فتاحی[1*]
آذین آیت‌اللهی[2]

۱. مرکز تحقیقات آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

زمینه و هدف: کاندیدا آلبیکنس توانایی کلونیزه‌کردن سطوح زنده و غیرزیست و تشکیل بیوفیلم‌هایی را دارد که در برابر ضدقارچ‌های رایج بسیار مقاوم هستند. مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی ایتراکونازول بروی بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس طراحی شده است.

روش اجرا: مطالعه حاضر بر روی ۱۰ نمونه ناخن انجام شد. آزمایش روتین قارچ‌شناسی و مولکولی جهت شناسایی و تعیین گونه قارچ انجام شد. بیوفیلم در پلیت ۹۶ خانه تشکیل شد و در مجاورت ایتراکونازول قرار گرفت. تجمع گونه‌های اکسیژن فعال ROS اندازه‌گیری و سطح ROS در بیوفیلم‌های تیمارشده با ایتراکونازول در حضور آنتی اکسیدان تعیین شد. اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاری ایتراکونازول در حضور اسید اسکوربیک (۱۰ میلی‌مولار) براساس پروتکل مرحله قبل انجام شد. برای بررسی احتمال القای آپوپتوز به‌دنبال مصرف ایتراکونازول از کیت تشخیص آپوپتوز Annexin V-FITC استفاده شد.

یافته‌ها: Mann-Whitney تفاوت معنی‌داری را بین بیوفیلم‌های تیمارشده با ایتراکونازول و بیوفیلم‌های تیمارنشده برای ۱۰ سویه آزمایش‌شده نشان داد. درمان با ایتراکونازول منجر به کاهش قابل‌توجهی در تعداد بیوفیلم شد. اسید اسکوربیک به‌طور قابل توجهی تجمع ROS ناشی از ایتراکونازول را برای بیوفیلم‌های همه سویه‌های کاندیدا آلبیکنس کاهش داد. یافته‌ها نشان می‌دهد که ایتراکونازول آپوپتوز وابسته به ROS را در یک حالت وابسته به دوز در سلول‌های بیوفیلم القا می‌کند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص شد وجود ROS درون‌سلولی عامل اصلی مکانیسم آپوپتوز ایتراکونازول است. توانایی ایتراکونازول برای القای ROS در سلول‌های کاندیدا یک استراتژی قارچ‌کشی بسیار مؤثر به‌نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: اونیکومایکوزیس، ایتراکونازول، آپوپتوز

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۲۶

پوست و زیبایی؛ بهار ۱۴۰۲، دوره ۱۴ (۱): ۲۸-۲۴

نویسنده مسئول:
مهسا فتاحی

تهران، بلوار کشاورز، خیابان قریب
پست الکترونیک:
dr.mahsafattahi@gmail.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

مقدمه

اونیکومایکوزیس شایع‌ترین عارضه ناخن در جمعیت بزرگسال است که ۱۵ تا ۴۰ درصد از کل بیماری‌های ناخن را تشکیل می‌دهد[1]. علاوه‌بر کاندیدا آلبیکنس، چندین گونه دیگر کاندیدا به‌عنوان پاتوژن ناخن شناخته شده‌اند. کاندیدا آلبیکنس در عفونت‌های مختلف از عفونت‌های سطحی تا کاندیدیازیس مهاجم دخیل است.

کاندیدا آلبیکنس توانایی کلونیزه‌کردن سطوح زنده و غیرزیست و تشکیل بیوفیلم‌هایی را دارد که در برابر ضدقارچ‌های رایج بسیار مقاوم هستند[2]. بیوفیلم‌ها اجتماعات میکروبی سلول‌هایی هستند که به یک سطح متصل شده و در یک ماتریکس پلیمری خارج

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-15]

سلولی تعبیه شده‌اند[۳]. تشکیل بیوفیلم یک پدیده پیچیده است که توسط چندین فاکتور رونویسی تنظیم می‌شود و شبکه‌ای از ژن‌های هدف را کنترل می‌کند که حدود ۱۵ درصد از ژنوم را شامل می‌شود[۴]. بیوفیلم‌های قارچی به‌دلیل افزایش مقاومت در برابر ضدقارچ‌ها، اهمیت پزشکی بالایی دارند. انتخاب درمان ضدقارچی اولیه برای نتیجه و هزینه بیمار بسیار مهم است. نتیجه درمان ضدقارچی سلول‌های مخمری نرمال و بیوفیلم به‌طور کلی متفاوت است؛ زیرا سلول‌های گروه دوم مقاومت ضدقارچی بالاتری نشان می‌دهند.

ازآنجایی که کاندیدا آلبیکنس می‌تواند توده بیوفیلم روی سطح ناخن تولید کند، در مواردی که با بیمارانی مواجه هستیم که به درمان جواب نمی‌دهند یا عود بیماری در آن‌ها مکرراً روی می‌دهد، باید احتمال تشکیل بیوفیلم مقاوم به داروی ضدقارچی را در نظرگرفت؛ لذا در انتخاب رژیم درمانی باید دارویی انتخاب شود که علاوه‌بر سلول‌های مخمری، بتواند اثر مهاری بر سلول بیوفیلم داشته باشد.

مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی ایتراکونازول بروی بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس طراحی شده است.

روش اجرا

مطالعه حاضر بر روی ۱۰ نمونه جداشده از بیماران مبتلا به عفونت مزمن ناخن مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات و آموزش بیماری‌های پوستی و جذام تهران در سال ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. نمونه تراشه ناخن با اسکالپل تهیه شد و بروی اسلاید حاوی یک قطره هیدروکسید پتاسیم قرار گرفت و با لنز ۱۰ میکروسکوپ نوری، مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت.

بخشی از نمونه ناخن بروی محیط سابورو دکستروز آگار (مرک، آلمان) پاساژ داده شد. پلیت‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند، سپس به‌منظور خالص‌سازی ایزوله‌های کاندیدا، پاساژ مکرر از پرگنه‌های موجود بروی محیط کروم آگار کاندیدا (کروم آگار، فرانسه) انجام گرفت.

به‌منظور تفکیک گونه‌های نزدیک به‌هم کمپلکس کاندیدا آلبیکنس از روش مولکولی با پرایمر اختصاصی HWP1 استفاده شد.

بیوفیلم‌های کاندیدا آلبیکنس در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خانه رشد کردند. رشد بیوفیلم‌ها با تلقیحی $CFU1\times10^{5}$ کلنی به چاهک‌های میکروتیتر ۹۶ خانه آغاز شد. صفحات میکروتیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. برای ایجاد بیوفیلم بالغ، فاز پلانکتونیک با شست‌وشو با سالین بافر فسفات حذف شد.

برای ارزیابی حساسیت دارویی این روش از پروتکل M60 استفاده شد. غلظت‌های مختلف ایتراکونازول (۰/۰۳ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد.

برای تأیید یک عامل درون سلولی که می‌تواند باعث آپوپتوز بیوفیلم‌های کاندیدا آلبیکنس شود، تجمع گونه‌های اکسیژن فعال ROS اندازه‌گیری شد.

اسید اسکوربیک (۱۰ میلی‌مولار) به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی برای تأیید اینکه آیا ROS با مرگ سلولی ناشی از ایتراکونازول مرتبط است، استفاده شد. سطح ROS در بیوفیلم‌های تیمارشده با ایتراکونازول در حضور آنتی‌اکسیدان تعیین شد.

اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاری ایتراکونازول در حضور اسید اسکوربیک (۱۰ میلی‌مولار) براساس پروتکل مرحله قبل انجام شد. پس از آن، جذب با میکروسکوپ فلورسانس اندازه‌گیری شد (۵۳۵-۴۸۵ نانومتر). آمفوتریسین B به‌عنوان کنترل استفاده شد.

برای بررسی احتمال القای آپوپتوز به‌دنبال مصرف ایتراکونازول از کیت تشخیص آپوپتوز Annexin V-FITC (سیگما ـ آلدریچ، ایالات متحده آمریکا) استفاده شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-15]

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل آماری با آزمون Mann-Whitney تفاوت معنی‌داری را در بیوفیلم بیوفیلم بین بیوفیلم‌های تیمارشده با ایتراکونازول و بیوفیلم‌های تیمارنشده برای ۱۰ سویه آزمایش‌شده (سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵) نشان داد و هم‌چنین بیوفیلم‌های تیمارشده با آمفوتریسین B و بیوفیلم‌های تیمارنشده سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ نشان داده شد.

درمان با ایتراکونازول منجر به کاهش قابل‌توجهی در تعداد بیوفیلم شد. کمترین میزان کاهش برای جدایه شماره ۶ کاندیدا آلبیکنس (۸۳/۹٪) و بیشترین کاهش برای جدایه شماره ۲ (۳۵/۵٪) مشاهده شد.

بیشترین افزایش در تجمع ROS پس از درمان با ایتراکونازول در جدایه شماره ۷ (۳۰ برابر افزایش) مشاهده شد.

تأثیر افزودن اسید اسکوربیک بر بیوفیلم‌های تیمارشده با ایتراکونازول با استفاده از اکریدین اورنج موردبررسی قرار گرفت. اسید اسکوربیک به‌طور قابل‌توجهی تجمع ROS ناشی از ایتراکونازول را برای بیوفیلم‌های همه سویه‌های کاندیدا آلبیکنس کاهش داد.

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، یک تغییر در سیگنال رنگی از قرمز به سبز در بیوفیلم‌های سویه‌های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس تحت درمان با ایتراکونازول در مقایسه با کنترل منفی مشاهده شد. یافته‌ها نشان می‌دهد که ایتراکونازول آپوپتوز وابسته به ROS را در یک حالت وابسته به دوز در سلول‌های بیوفیلم القا می‌کند.

شکل ۱: بررسی تأثیر ایتراکونازول در القا آپوپتوز.

درصد کل جمعیت سلول‌های آپوپتوز به‌عنوان مجموع درصد مراحل اولیه و اواخر آپوپتوز بیان می‌شود و سیگنال فلورسانس سبز، نشان‌دهنده سلول‌های مثبت انکسین V-FITC است. سلول‌هایی که تنها با PI رنگ‌آمیزی‌شده بودند، به‌دلیل ازبین‌رفتن یکپارچگی غشای پلاسمایی، سلول‌های نکروز درنظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها به شرح زیر تفسیر شد: مربع پایین سمت چپ سلول‌های زنده رنگ‌آمیزی را با غشاهای دست‌نخورده مشخص می‌کند که انکسین V-FITC و PI هردو منفی؛ مربع بالا سمت چپ نشان‌دهنده سلول‌های نکروزه است که PI مثبت و انکسین VFITC منفی؛ مربع بالا سمت راست شامل سلول‌های آپوپتوز دیررس است که انکسین V-FITC و PI مثبت و مربع پایین سمت راست سلول‌های آپوپتوز اولیه را مشخص می‌کند که انکسین V-FITC مثبت و PI مثبت هستند.

بحث

در مطالعه حاضر، تجمع ROS به‌طور بالقوه در بیوفیلم‌های کاندیدا آلبیکنس درمان‌شده با ایتراکونازول افزایش یافته است که نشان می‌دهد ROS ممکن است مسئول فعالیت قارچ‌کشی باشد. ROS معمولاً به‌عنوان محرک‌های ضروری آپوپتوز در سلول‌های مخمر تعریف می‌شود[۵]. ROS پروتئین‌ها، یون‌ها، گیرنده‌ها و سایر مولکول‌های سیگنال‌دهنده را تحریک یا خنثی می‌کند[۶]. علاوه‌براین، ROS مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با ردوکس را تنظیم می‌کند[۷].

اگرچه ROS به‌عنوان مولکول‌های سیگنال در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی عمل می‌کند، ROS بیش از حد لازم به DNA داخل سلولی، پروتئین‌ها و لیپیدها حمله می‌کند و به اندامک‌ها و غشای سلولی آسیب می‌رساند و درنتیجه یکپارچگی سلول را تهدید می‌کند[۸]. ROS به‌عنوان عوامل مهم در التهاب، آپوپتوز و آسیب ایسکمی ـ پرفیوژن مجدد درنظر گرفته می‌شود[۸]. مطالعات ترانسکریپتومیک نشان داد که در ساختار بیوفیلم بیان ژن‌های دفاع از استرس، به‌ویژه آن‌هایی که در مبارزه با استرس اکسیداتیو نقش دارند، در مقایسه با کشت‌های پلانکتونیک افزایش می‌یابد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-15]

نتایج مشابهی در سطح پروتئومی تأیید شد. سطح ROS در مقایسه با کشت پلانکتون به‌طور چشمگیری در بیوفیلم کاهش می‌یابد. اینکه آیا این نتیجه فعال‌شدن مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیوفیلم‌ها است یا اینکه زندگی در ساختار بیوفیلم منجر به کاهش تولید ROS می‌شود، مشخص نیست.

داده‌های موجود ارتباط بین میزان القای ROS و فعالیت قارچ‌کشی ایتراکونازول در برابر بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس را تأیید می‌کند. بررسی حاضر نشان داد که اکثر سلول‌های کشته‌شده توسط ایتراکونازول آپوپتوتیک بودند. در اینجا تنش‌های اکسیداتیو منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و پروتئین، کاهش فعالیت آنزیم و آسیب DNA می‌شود. داده‌های موجود نشان می‌دهد که مرگ سلولی ناشی از ایتراکونازول به‌طور مستقیم به تجمع ROS داخل سلولی در مسیر آپوپتوز کمک می‌کند. هنگامی که آپوپتوز و مرگ سلولی رخ می‌دهد، پلی‌ساکارید به‌عنوان یک نشانگر اولیه آپوپتوز به سطح بیرونی غشای پلاسمایی منتقل می‌شود. مکانیسم قارچ‌کشی سلول مخمری ناشی از ایتراکونازول با القای آپوپتوز در کاندیدا آلبیکنس مرتبط است.

هدف‌قراردادن سیستم دفاعی اکسیداتیو یک نقطه قدرتمند برای استفاده از ضدقارچ‌های القاکننده ROS به‌عنوان یک انتخاب برتر برای درمان‌های مؤثرتر در مورد اونیکومایکوز مقاوم به درمان و عودشونده است.

در این مطالعه مشخص شد اگرچه ایتراکونازول اثر مهاری در بیوسنتز استرول دارد، این ترکیب به‌عنوان مکانیسم قارچ‌کشی در برابر بیوفیلم‌های کاندیدا آلبیکنس باعث القای آپوپتوز می‌شود. علاوه‌براین، یافته‌های حاضر نشان داد که القای تنش‌های درون سلولی توسط ایتراکونازول در سلول‌ها پس از خاموش‌کردن ROS رخ نمی‌دهد که نشان می‌دهد وجود ROS درون سلولی، عامل اصلی مکانیسم آپوپتوز ایتراکونازول است. علاوه‌براین، هدف‌قراردادن سیستم دفاع اکسیداتیو برای بالابردن سطح ROS توسط یک تقویت‌کننده، می‌تواند فعالیت ایتراکونازول را افزایش داده و امکان استفاده از دوزهای پایین‌تر از ایتراکونازول را فراهم کند. درنهایت، توانایی ایتراکونازول برای القای ROS در سلول‌های کاندیدا یک استراتژی قارچ‌کشی بسیار مؤثر به‌نظر می‌رسد.

References

1. Aikaterini KA, Zagalioti SC, Trakatelli MG, et al. Fungal infections and nail psoriasis: An update. J Fungi 2022; 8:154.
2. Marak MB, Biranthabail D. Antifungal susceptibility and biofilm production of Candida spp. isolated from clinical samples. Int J Microbiol 2018;2018:7495218
3. Christophe B, Jean-Marc G. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. Trend Microbiol 2005, 13.1: 16-9.
4. Omaya D, et al. Repression of flagellar genes in exponential phase by CsgD and CpxR, two crucial modulators of Escherichia coli biofilm formation. J Bacteriol 2014, 196.3: 707-15.
5. Gianluca F, Rena B. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. Frontier Oncol 2012, 2: 64.
6. Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016.
7. Lee W, Lee DG. Reactive oxygen species modulate itraconazole-induced apoptosis via mitochondrial disruption in Candida albicans. Free Radic Res 2018, 52: 39-50.
8. Wu L, Xiong X, Wu X, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. Frontier Mol Neuros 2020,13: 28.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-15]

Evaluation fungicidal property of itraconazole against Candida albicans biofilm in order to suggests a suitable treatment approach in cases of recalcitrant onychomycosis

Mahsa Fattahi, PhD[1*]

Azin Ayatolahi, MD[2]

1. Asthma and Allergy Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Center for Research and Training for Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: May 06, 2023
Accepted: May 16, 2023
Pages: 24-28

Corresponding Author:
Mehsa Fattahi, PhD

Keshavarz Blvd., Gharib St., Tehran
Email: dr.mahsafattahi@gmail.com

Conflict of interest: None to declare

Background and Aim: Candida albicans have the ability to colonize living and non-living surfaces and form biofilms that are very resistant to common antifungals. The present study was designed to evaluate the fungicidal activity of itraconazole on Candida albicans biofilm.

Methods: The present study was conducted on 10 nail samples. Routine mycological and molecular tests were performed to identify and determine the type of fungus. Biofilm was formed in the 96-well plate and was subjected to the itraconazole. ROS accumulation was measured. ROS levels were determined in biofilms treated with itraconazole in the presence of antioxidants.The minimum inhibitory concentration of itraconazole was measured in the presence of ascorbic acid (10 mM) according to the protocol of the previous step. Annexin V-FITC apoptosis detection kit was used to investigate the possibility of apoptosis induction following itraconazole use.

Results: Mann-Whitney showed a significant difference between biofilms treated with itraconazole and untreated biofilms for 10 tested strains. Treatment with itraconazole resulted in a significant reduction in the number of biofilms. Ascorbic acid significantly reduced ROS accumulation caused by itraconazole for biofilms of all Candida albicans strains. The findings show that itraconazole induces ROS-dependent apoptosis in a dose-dependent manner in biofilm cells.

Conclusion: In this study, it was found that the presence of intracellular ROS is the main cause of the apoptosis mechanism of itraconazole. The ability of itraconazole to induce ROS in Candida cells appears to be a very effective fungicidal strategy.

Keywords: onychomycosis, itraconazole, apoptosis

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-15]

Copyright © 2023 Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.