

تأثیر هم‌افزایی ترکیب کتوکونازول و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان ژن *ALS* تولید بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های دهانی

مینا رضایی^۱، صدیقه مهربان^۲، کیومرث امینی^۳

چکیده

زمینه و هدف: در بین فاکتورهای بیماری‌زایی کاندیدا آلبیکنس می‌توان از ژن *ALS* (*Agglutinin Like Sequence*) نام برد که در کدکردن دسته‌ی بزرگی از گلیکوپروتئین‌ها که عامل اصلی چسبندگی قارچ به میزبان است، نقش دارد. این مطالعه، بررسی اثر سینرژیک کتوکونازول و ترکیب پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان بیوفیلم ژن *ALS* کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های دهانی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی مقطعی ۱۲ جدایه بالینی کاندیدا آلبیکنس از عفونت پریدانتال دهانی بیمارانی که به کلینیک دندانپزشکی کرمان مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. میزان حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد قارچی برای هر کدام از تیمارها (داروی کتوکونازول، پروبیوتیک هر کدام به تنهایی و ترکیبی از هر دو کتوکونازول+پروبیوتیک) با استفاده از روش میکرودایلوشن به دست آمد. در نهایت آزمون واکنش زنجیری پلیمرز در زمان واقعی (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) به منظور بررسی سطح بیان ژن *ALS* در سویه‌ها انجام گردید و نتایج با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ترکیب کتوکونازول و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم اثر سینرژیک دارند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که اثر کتوکونازول (*Ketoconazole*)، باکتری پروبیوتیک (*Probiotic*) بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به تنهایی و اثر توأم کتوکونازول و بیفیدوباکتریوم (*Keto+Pro*) به ترتیب توانستند ۱/۴۷، ۱/۲۹ و ۱/۶۱ برابر بیان ژن *ALS* را در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس کاهش دهند.

نتیجه‌گیری: نتیجه‌ی این مطالعه، نشان داد که اثر سینرژستی بین کتوکونازول و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در کاهش بیان ژن *ALS* (تولید بیوفیلم) وجود دارد. پیشنهاد می‌شود که در درمان عفونت‌های کاندیدایی مکمل پروبیوتیک به همراه کتوکونازول تجویز گردد.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، ژن *ALS* (*Agglutinin Like Sequence*)، کتوکونازول، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، واکنش زنجیری پلیمرز در زمان واقعی

دریافت مقاله: شهریور ۱۳۹۸
پذیرش مقاله: دی ۱۳۹۸

* نویسنده مسئول:

صدیقه مهربان؛
دانشگاه آزاد اسلامی تهران

Email :
mehraban_s@au.ac.ir

۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳ دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

مقدمه

پریدونتال بیماری التهابی بافت‌های حمایت‌کننده‌ی دندان است که توسط میکروارگانسیم‌های خاص یا گروهی از میکروارگانسیم‌ها ایجاد می‌شود و با تخریب وسیع لیگامان پریدونتال و استخوان آلوئولار به‌همراه تشکیل پاکت پریدونتال دندان، انحلال لثه و یا هر دو مشخص می‌شود (۱). نمای کلینیکی که باعث شناسایی این بیماری از ژنوتیپ می‌شود، از دست‌رفتن چسبندگی کلینیکی است. این حالت معمولاً به همراه تشکیل پاکت و تغییرات در دانسیته و ارتفاع استخوان آلوئولار مجاور است (۲).

بیماری پریدونتال، دومین بیماری شایع دهان و دندان بعد از پوسیدگی است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که التهاب مزمن لثه در اکثر جمعیت جهان یافت می‌شود. حدود ۱۰ درصد از جمعیت بزرگسال از بیماری پریدونتال شدید رنج می‌برند. این بیماری یکی از علل عمده‌ی از دست‌رفتن دندان در سراسر جهان است. در سال ۲۰۰۷ میزان شیوع بیماری پریدونتال در مردان ۶۲/۷٪ گزارش شد. بررسی شیوع بیماری پریدونتال در ایران به‌طور گسترده انجام نگرفته است ولی شیوع پریدونتال مهاجم در دانش‌آموزان ۱۶-۱۴ ساله در تبریز ۰/۵٪ گزارش شد. در افراد دیابتی و دارای بیماری آرتریت روماتوئید شیوع بیماری پریدونتال بالاتر است (۳ و ۴).

کاندیدا، مخمر شایع در بیماری‌های قارچی فرصت طلب در سراسر دنیا می‌باشد و همچنین به فراوانی روی سطح پوست و غشاهای مخاطی کلونیزه می‌شود. کاندیدا یکی از اعضای فلور نرمال پوست، دهان، واژن و مدفوع است و به همان میزان که پاتوژن است فرصت طلب نیز هست (۵). در حالت طبیعی باکتریهای فلور طبیعی با مصرف مواد غذایی و ترشح مواد ضدقارچی یکی از مهمترین عوامل کنترل تکثیر میکروارگانسیم محسوب می‌شوند. تجویز استروئیدها باعث افزایش جمعیت کاندیداها می‌شود. به‌هم‌خوردن وضعیت فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند پیری، حاملگی، اختلالات اندوکرینی چون دیابت، تروما، اعمال جراحی، چاقی، تزییقات داخل وریدی، اعتیاد به مواد مخدر، آویتامینوز، عوامل ایمنوساپرسیو، اختلالات ژنتیکی، نقایص ایمنی و سیتوکاینها از عوامل مستعدکننده‌ی بیماری به‌شمار می‌روند (۶).

بیوفیلیم‌های قارچی نیز همچون بیوفیلیم باکتریایی متشکل از اجتماع سلولی پیچیده با ویژگی‌های بیماری‌زایی خاص هستند. بیوفیلیم هنگامی

ایجاد می‌شود که ارگانسیم‌ها پس از اتصال به سطح و تولید پلیمرهای خارج سلولی با ایجاد یک ساختار پوششی، اتصال بیشتر میکروارگانسیم‌ها را موجب شوند. ارگانسیم‌های حاضر در بیوفیلیم‌های قارچی، رفتار متفاوتی نسبت به سوسپانسیون میکروبی از خود نشان می‌دهند که این امر نشان‌دهنده‌ی شکست نسبی درمان‌های پزشکی و افزایش مقاومت به داروهای ضدقارچی می‌باشد (۷). بیش از ۳۰۰ ژن مسئول خصوصیات بیوفیلیم‌های تشکیل شده در شرایط متفاوت رشد هستند. ژن *Gcn4p* تنظیم‌کننده‌ی کلیدی بیوستتر اسید آمینه بوده و برای تشکیل بیوفیلیم ضروری است (۸).

بیشتر گونه‌های مخمری *کاندیدا* قادر به تشکیل بیوفیلیم می‌باشند اما *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا سودوتریکالیس* و *کاندیدا گلابراتا* اساساً تمایل کمتری نسبت به تشکیل بیوفیلیم بر روی سطوح در مقایسه با *کاندیدا آلبیکنس* دارند. شکل میکروسکوپی بیوفیلیم *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به *کاندیدا پاراپسیلوزیس* پیچیده‌تر بوده و از خوشه‌های بلاستوسپور تشکیل شده است (۹).

اعضای خانواده‌ی ژنی *als* (agglutinin like sequence) رمزکننده‌ی گلیکوپروتئین سطحی سلول می‌باشند. میزان بیان ژن‌های این خانواده در هنگام رشد بیوفیلیم به‌طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد و نقش مهم این ژن‌ها *als1*، *als2*، *als3*، *als4*، *als5*، *als7*، *als9*، *als1*، *csa1*، *eap1*، *fts1*، *hwp1*، *och1*، *pga1*، *pga10*، *pmt1*، *pmt2*، *pmt4*، *pmt6*، *rht1*، *sun41* و *abt5* در تشکیل بیوفیلیم به اثبات رسیده است. از مهمترین ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلیم، ژن *als* بیوفیلیم در مخمر *کاندیدا آلبیکنس* است (۱۰). از ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلیم می‌توان به این موارد اشاره کرد که: *als1*، *als2*، *als3*، *als4*، *als5*، *als7*، *als9*، *als1*، *csa1*، *eap1*، *fts1*، *hwp1*، *och1*، *pga1*، *pga10*، *pmt1*، *pmt2*، *pmt4*، *pmt6*، *rht1* و *sun41* می‌باشد (۱۱).

خانواده‌ی ژنی *als* حداقل دارای ۸ عضو *als1-als9* است. بررسی‌ها نشان داده است که در *کاندیدا آلبیکنس* سویه *SC5314*، ژن *als1* در کنار ژن‌های *als9*، *als5*، *als2* و *als4* روی کروموزوم ۶ واقع شده است. یکی دیگر از ژن‌های مهم در اتصال مخمر *کاندیدا آلبیکنس* ژن *hwp1* می‌باشد. ژن تنظیم‌کننده‌ی هیفی، *hyr1* است که برای قارچ‌های دی مورفیک و پلی مورفیک مسئول تبدیل فرم فاز مخمری به هیفی است.

تولید لوله زایا، هیدرولیز اوره و کشت بر روی محیط کشت کروم آگار (CHROMagar) کاندیدا شناسایی گردید.

در این مطالعه‌ی مقطعی، ۱۲ جدایه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* از عفونت پریدونتال دهانی بیماران که به کلینیک دندانپزشکی کرمان مراجعه کرده بودند، جدا شد و در ظرف استریل و درپوش دار مخصوص در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شد. همه‌ی جدایه‌ها در سابورو دکستروز مایع حاوی ۳۰۰ میکروگرم/میلی لیتر کلرامفنیکل در دمای منهای ۸۰ درجه سلسیوس ذخیره شدند.

جهت ایزوله‌سازی گونه‌های *کاندیدا* از عفونت پریدونتال، نمونه‌ها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SDAc) کشت داده شد. دو کلنی از *کاندیدا آلبیکنس* بر روی محیط کشت تازه سابورو دکستروز آگار (SDA, Merck, Germany) حاوی کلرامفنیکل دو بار کشت مجدد داده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و از رشد در فاز لگاریتمی مخمر اطمینان حاصل شد.

استاندارد نیم مک فارلند: یک سوسپانسیون میکروبی مناسب به‌منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی است، تا تعداد باکتری‌های موجود در نمونه‌ی تلقیحی میزان مناسبی باشد. این تعداد برای انجام روش آنتی‌بیوگرام به طور قراردادی $10^8 \times 1/5$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر تلقیح است. به‌منظور آماده‌سازی تعداد باکتری برای تلقیح، لوله‌ی شماره‌ی ۰/۵ مک فارلند انتخاب می‌شود.

آغازگرها (پرایمرها): برای این تحقیق از پرایمر جدول ۱، برای تکثیر قسمت هدف از ژنوم باکتری استفاده شد.

فعال شدن این ژن باعث طویل شدن فاز مخمری *کاندیدا آلبیکنس* به فرم میسلالی (هیفی) می‌شود (۱۲).

پروبیوتیک‌های غذایی از عوامل مکمل میکروبی و یا مکمل‌های غذایی در خوراک دام‌ها هستند که اثرات مفیدی بر میزان توسط بهبود توازن میکروب‌های روده‌ای می‌گذارند. آنها علاوه بر اینکه فلور نرمال روده هستند می‌توانند از طریق تغذیه وارد بدن انسان یا حیوان شده و به‌عنوان درمان یا پیشگیری در بسیاری از بیماریها استفاده شوند. این میکروارگانیسمها در محیطهای غذایی خصوصاً محصولات لبنی قابل کشت هستند. برخی از باکتریها و مخمرهای پروبیوتیکی شامل سویه‌های *اشریشیا کلی*، *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیل* می‌باشند (۱۳).

ماست، معمول‌ترین ماده لبنی حاوی پروبیوتیک‌هاست و از موارد دیگری مانند پنیر، شیرهای تخمیر شده و غیرتخمیری، آب میوه نیز می‌توان به‌عنوان پروبیوتیک استفاده کرد. عموماً مکملهای غذایی نیز می‌توانند حاوی پروبیوتیکها باشند (۱۴). هدف از انجام این مطالعه، بررسی تاثیر هم افزایی ترکیب کتوکونازول به‌همراه پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر بیان ژن *als* در جهت تولید فاکتور بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از نمونه‌های دهانی می‌باشد.

روش بررسی

نوع مطالعه‌ی این تحقیق، مطالعه‌ی توصیفی-مقطعی است. سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 14053 به‌عنوان کنترل کیفیت مورد استفاده قرار گرفت. محاسبه‌ی حجم نمونه با ضریب اطمینان ۹۵ درصدی و سطح خطای ۰/۰۴ انجام گرفت و با استفاده از روش‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی استاندارد از قبیل مرفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی،

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه (۱۵)

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی	طول قطعه (bp)
als2	F-5'- ATGAAGTCTACCATCTTCTCCG -3' R=5'-TCCGCTTCTGTCGGTCA-3'	۱۲۲

جفت پرایمر ذیل توسط نرم افزار Gene runner و جهت تهیه پرایمر به شرکت سیناژن سفارش داده شد.

جدول ۲: برنامه PCR مطالعه ماژر

مدت زمان واکنش	دمای انجام واکنش	مراحل انجام واکنش
۳ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	شروع (Predenaturation)
۳۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	واسرشت (Denaturation)
۳۰ ثانیه	۵۸ درجه سانتی‌گراد	اتصال (Annealing)

۷۲ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	طول شدن (Extension)
۷۲ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه	پایان (Final)
۳۵ سیکل		تعداد سیکل (Cycle):

کنترل مثبت (con+) و برای کنترل منفی (con-) فقط عوامل ضدقارچی و پروبیوتیک و محیط کشت استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، محتویات هر چاهک توسط میکروبیوتیک به‌خوبی مخلوط و نقطه پایانی برای تأثیر عوامل ضدقارچی و پروبیوتیکی بر مخمر به‌عنوان کمترین رقت هر ترکیب که از ۵۰ و ۹۰ درصد رشد در مقایسه با کنترل ممانعت نماید، ارزیابی شد.

تیمار قارچ با کتوکونازول و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم

بیفیدوم: قبل از انجام واکنش زنجیری پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time Polymerase Chain Reaction)، دو لوله تیمار و غیرتیمار از غلظت subMIC جهت استخراج RNA تهیه شد که لوله تیمار حاوی محیط کشت SDB و تیمار (یک بار کتوکونازول، یک بار پروبیوتیک و یک بار ترکیبی از هر دو) و مخمر و لوله‌ی غیرتیمار، حاوی محیط SDB و مخمر تهیه شد و ۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. جهت استخراج RNA آماده شد. برای حذف DNA ژنومی از کیت (DNase I) استفاده شد. برای استخراج RNA، از کیت Cinna Pure RNA (Cat. No: PR891620/EX6031) شرکت سینا کلون استفاده گردید.

سنتر cDNA: برای سنتز cDNA از کیت 2-Steps RT-PCR

شرکت ویوانتیس استفاده شد. همانند مسیر انجام واکنش PCR انجام شد. (Cat. No: RTPL12)

تجزیه آماری: تحلیل آماری پس از نرمال نمودن داده‌ها با استفاده

از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و به کمک نرم افزار آماری SPSS انجام گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه‌ی مقطعی از مراجعان مشکوک به پریدونتال به کلینیک دندانپزشکی کرمان، ۱۲ جدایه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* از عفونت پریدونتال دهانی بیماران جمع‌آوری شد.

نتایج تعیین کمترین غلظت مهاري به روش میکروپلیت

کمترین غلظت مهاري کتوکونازول: در این مطالعه کمترین غلظت مهاري دارو با روش میکروبراث دایلوشن به‌دست آمد. نتایج حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد (MIC) کتوکونازول بر سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شد.

برای اجرای آزمون Polymerase Chain Reaction (PCR) محلول ذخیره به نسبت ۱ به ۱۰ رقت تهیه نموده و در مخلوط واکنش PCR استفاده گردید.

جزئیات واکنش PCR در این مطالعه: برای این مطالعه واکنش

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل: ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول در لیتر MgCl₂، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو میبود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر طبق جدول ۲ انجام شد.

سوسپانسیون قارچی معادل نیم مک فارلند: برای تهیه‌ی

سوسپانسیون قارچی، تعداد ۴ تا ۵ کلنی تازه (۱۸ تا ۲۴ ساعته)، خالص و مشابه قارچ‌های رشد کرده بر روی محیط جامد با لوپ استریل برداشت شد و در لوله‌ی حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط مایع و یا سرم فیزیولوژی استریل حل شد و در حدود ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شد تا کاملاً حل شود. این سوسپانسیون به کمک لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند به غلظت مناسب رسانده شد.

تهیه کتوکونازول: پودر ضدقارچ کتوکونازول و از شرکت سیگما

(St. Louis, MO, Germany) خریداری و در دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد. طیف رقت کتوکونازول مطابق دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی CISI تهیه گردید (۱۶).

تهیه پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم: پروبیوتیک

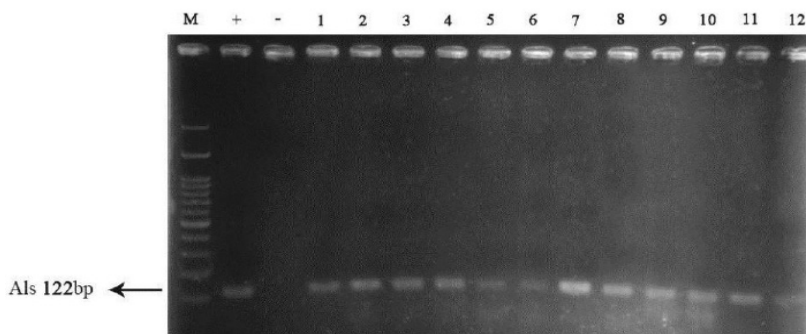
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم با شماره PTCC 1644 از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران خریداری گردید. باکتری در محیط MRS Broth رشد داده شد، سپس روی آن مخلوط وازپار (مخلوط وازلین پارافین) استریل جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از روی آن وازپار برداشته و از باکتری استفاده گردید. از غلظت نیم مک فارلند جهت تعیین Minimum inhibitory concentration (MIC) پروبیوتیک استفاده شد.

۱۰۰ میکرولیتر از هر دو تیمار در محیط کشت SDB به ۱۰۰

میکرولیتر سوسپانسیون قارچی در چاهک میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس در میکروپلیت‌ها بسته و به مدت ۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شد. به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید و از محیط کشت بدون عوامل ضدقارچی و بدون پروبیوتیک و سوسپانسیون قارچی به‌عنوان

برابر ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. نتیجه PCR ایزوله‌های حامل ژن *als*: نتایج آزمون PCR در ایزوله‌های مطالعه نشان داد که تمامی ایزوله‌ها دارای ژن *als* بود و در نتیجه حامل قطعه‌ی ۱۲۲ bp بودند (شکل ۱).

کمترین غلظت مهاري پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم: در این مطالعه، کمترین غلظت مهاري پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بر سویه‌های کاندیدا آلبیکنس برابر ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داده شده است. میزان شاخص غلظت مهاري نسبی (Fungal Inhibit Concentration (FIC): تعیین میزان غلظت مهاري FICI (کتوکونازول و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم)



شکل ۱: نتیجه PCR ایزوله‌های حامل ژن *als*; M؛ dna size ladder (100 bp) فرمنتاز، کنترل مثبت و کنترل منفی؛ پاهک‌های ۱۲-۱ نمونه‌های پرپودنتال ماوی کاندیدا آلبیکنس

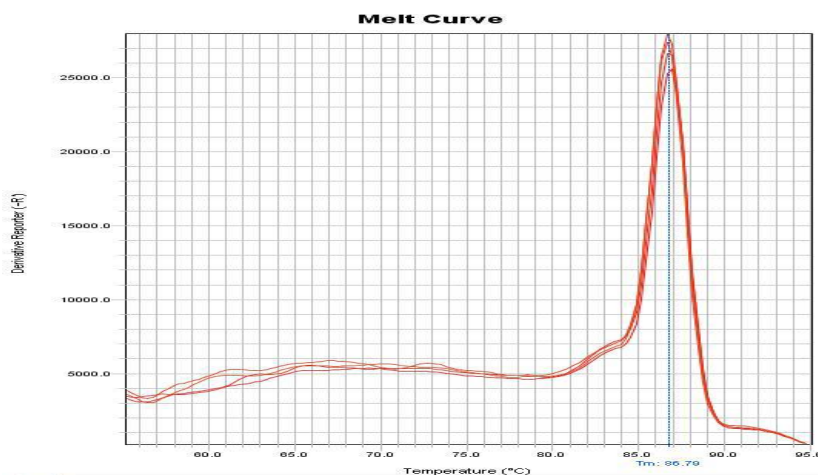
نتایج محصولات Real-Time PCR: نرم افزارهای مختلفی برای بررسی اختلاف بین بیان ژن نمونه و مرجع وجود دارد. در صورتی که تعداد نمونه‌ها زیاد باشد (تا ۱۰۰ نمونه) می‌توان از نرم افزارهای REST و REST-XL استفاده کرد.

جدول ۳: میزان RNA استخراج شده نمونه کاندیدی تحت مطالعه

میزان استخراج شده RNA	میزان توتال RNA (بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر)
سویه شاهد	۵۱۰
تیمار شده با کتوکونازول	۴۹۶
تیمار شده با بیفیدوباکتریوم	۵۲۱
تیمار ترکیبی (کتوکونازول+بیفیدوباکتریوم)	۴۷۳

نتایج ارزیابی RNA استخراج شده: RNA استخراج شده، برای اطمینان از صحت استخراج نمونه‌ی مورد نظر، مورد ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفت. برای بررسی کمی RNA استخراج شده از روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. در این روش ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت بین این دو طول موج و همچنین نسبت ۲۳۰/۲۶۰ هم بررسی گردید. در جدول ۳ قابل مشاهده است.

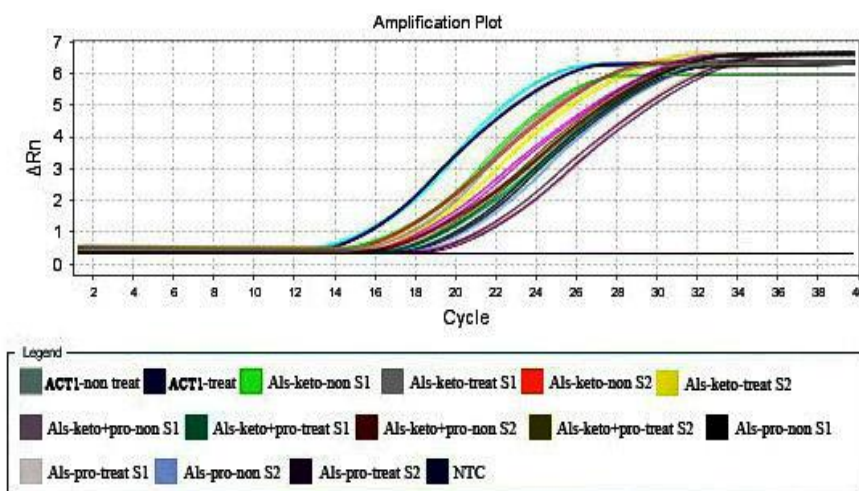
نتایج ارزیابی RNA استخراج شده: RNA استخراج شده، برای اطمینان از صحت استخراج نمونه‌ی مورد نظر، مورد ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفت. برای بررسی کمی RNA استخراج شده از روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. در این روش ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت بین این دو طول موج و همچنین نسبت ۲۳۰/۲۶۰ هم بررسی گردید. در جدول ۳ قابل مشاهده است.



نمودار ۱: منحنی ذوب بدست آمده از تکثیر ژن *als* در ایزوله‌ی کاندیدا آلبیکنس

نتایج بیان ژن *als* در ایزوله‌ی کاندیدا آلبیکنس: نتایج آنالیز Real-Time PCR نشان داد که بهترین دمای منحنی ذوب برای ژن *als* ۸۶/۷۹ درجه‌ی سانتیگراد می‌باشد (نمودار ۱). نتایج به‌دست آمده حاکی از

آن است که بیان ژن *als* در ایزوله‌ی کاندیدا آلبیکنس تیمار شده نسبت به ایزوله‌ی تیمار نشده پایین‌تر بود که بیانگر نقش مثبت دارو در کاهش بیان ژن *als* در ایزوله‌ی تحت مطالعه است (نمودار ۲).



نمودار ۲: نتایج Real-Time PCR برای ژن *als* در ایزوله‌ی کاندیدا آلبیکنس

تیمار به‌دست آورده و بر هم تقسیم شد.

محاسبه‌ی بیان ژن *als* در ایزوله کاندیدا آلبیکنس: در ابتدا تفاوت

CT هر دو ژن قبل از تیمار به‌دست آورده شد

$$\Delta CT_{\text{non-treat}} = CT_{\text{keto-non treat}} - CT_{\text{16S-non treat}}$$

$$(\Delta CT = \text{target} - \text{ref})$$

روش محاسبه داده‌های Real-Time PCR: در این تحقیق از

روش $\Delta\Delta CT$ برای محاسبه استفاده شد. در این روش با فرض اینکه بازده

ژن مورد نظر و ژن مرجع با هم برابر هستند، می‌توان تغییراتی را در فرمول

ایجاد کرد. در این حالت نسبت ژن مورد نظر و ژن مرجع قبل و بعد از

جدول ۴: نتایج fold change در سوبه‌های تمت مطالعه

treat	Fold change	P.value
keto	-۱/۴۷	۰/۰۱
Keto+pro	-۱/۶۱	۰/۰۵۰
pro	-۱/۲۹	۰/۰۰۸

شدن این قارچ‌ها می‌شود (۱۷).

کاندیدایزیس مهاجم یکی از عوارض شایع و بالقوه کشنده‌ی ناشی از سرطان و شیمی درمانی مرتبط با آن است. اکثر عفونت‌های کاندیدایی توسط کاندیدا آلبیکنس به‌وجود می‌آیند تقریباً در نیمی از بیماران سرطانی که تحت پرتودرمانی سر و گردن قرار می‌گیرند، گونه‌های کاندیدایی تجمع می‌یابند و تولید عفونت می‌کنند که اگر عفونت توسعه‌ی موضعی یا عمومی پیدا کند، به مرگ بیمار منتهی می‌شود. کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان قوی‌ترین گونه‌ی کاندیدایی مهم پزشکی شناخته می‌شود (۱۸). در نتیجه برای ژن *als* برابر ۱/۴۷- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیرتیمار شده ۱/۴۷ برابر کاهش یافته است.

Belmadani و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه‌ای با عنوان «فعالیت ضدقارچی و سینرژیسم آزول‌ها با زعفران لهستانی» دریافتند

نتایج محاسبه‌ی fold change نشان داد که ترکیب کتوکونازول و

پروبیوتیک توانست ۱/۶۱ درصد بیان ژن *als* را کاهش دهد (جدول ۴).

بحث

کاندیدا آلبیکنس یک قارچ طبیعی ساکن حیوان‌های خونگرم و انسان‌هاست. این قارچ، بسته به طبیعت میزبان، دو گروه عفونت را به‌وجود می‌آورد شامل: عفونت‌های سطحی (مانند: دهانی، مهلبی و کاندیدایزیس جلدی) که در افراد سالم هم دیده می‌شود، عفونت‌های عمیق (مانند: ریوی، گوارشی، ادراری و کاندیدی) که در افراد با اختلال شدید ایمنی رخ می‌دهد. مخمرها ارگانسیم‌های فرصت‌طلب هستند و عوامل مهارکننده‌ی سیستم ایمنی مثل: شیمی‌درمانی در بیماران سرطانی، پرتودرمانی، استفاده از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف، ایدز، دیابت شیرین و ... موجب مهاجم

حقیقی و همکاران (۱۳۹۰) به ارزیابی اثر کاتچین بر تشکیل بیوفیلم قارچی سویه‌های استاندارد حساس و مقاوم *کاندیدا/آلبیکانس* پرداختند. در این مطالعه‌ی تجربی که در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد، رقت‌های سریالی از محلول کاتچین در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تهیه شد. حداقل غلظت مهارکنندگی با روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع ارزیابی گردید. بیوفیلم *کاندیدا/آلبیکانس* در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تشکیل و اثر ضدکاندیدیایی کاتچین بر روی آن بررسی شد. درحالی‌که در این تحقیق میزان Fold Change برای ژن *Als* برابر $1/47$ - که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیرتیمار شده $1/47$ برابر کاهش یافته است. داده‌ها با آزمون آماری تی تست تجزیه و تحلیل شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی ۵۰ کاتچین، $5/77$ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهارکنندگی ۹۰، $8/33$ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن $9/47$ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. غلظت مهارکنندگی بیوفیلم کاتچین و فلوکونازول برای سویه‌ی حساس به فلوکونازول به ترتیب $19/35$ و 4 میکروگرم در میلی‌لیتر و همچنین برای سویه مقاوم به فلوکونازول به ترتیب $23/53$ و 8 میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۲۴).

پاکدل و همکاران (۱۳۹۲) به شناسایی دو ژن *als1* و *hwp1* در ایزوله‌های *کاندیدا/آلبیکانس* جدا شده از عفونت واژینال پرداختند. در این مطالعه ۷ جدایه به دست آمده از زنان مبتلا به عفونت واژینال از مراکز مختلف پزشکی تهران در سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ انتخاب شد. استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل صورت گرفت. سپس Multiplex PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. نتایج حاصل، حضور دو ژن *als1* و *hwp1* را به ترتیب با فراوانی 0.57% و 0.28% در جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد. نتایج این مطالعه دلالت بر این دارد که 0.50% از جدایه‌های واجد ژن *als1* دارای ژن *hwp1* نیز هست (۲۵). درحالی‌که در این تحقیق میزان $\Delta\Delta Ct$ - بیانگر آنست که برای ژن‌ها در گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده قابل ارزیابی بوده و ردیف Fold change نیز بیانگر میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می‌باشد. میزان Fold Change برای ژن *Als* برابر $1/47$ - که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیرتیمار شده $1/47$ برابر کاهش یافته است.

Urzu و همکاران در سال ۲۰۰۸، به شناسایی بیوفیلم گونه *کاندیدا* و تعیین پلی مورفیسم *ALS3* در ایزوله‌های بالینی *کاندیدا/آلبیکانس* پرداختند. گونه‌های مختلف *کاندیدا* از نمونه‌های خون، ادرار، ترشحات وولوواژینال و مایع دیالیز صفاتی جدا شدند. تولید بیوفیلم در 327 *کاندیدا*

که عصاره‌ی اتانولی پروپیل (EEP) در غلظت‌های زیر MIC، تبدیل فاز مخمر به میسلیم *کاندیدا/آلبیکانس* در محیط مایع را مهار می‌کند. اثر سینرژیک برای اثر EEP در ترکیب با فلوکونازول (FLU) و وریکونازول (VOR) در برابر *کاندیدا/آلبیکانس* مشاهده شد. در حضور EEP در غلظت‌های پایین 0.02% ، MIC های FLU و VOR به ترتیب 256 و 32 برابر کمتر از داروهای به تنهایی بود. این محققان بیان کردند که احتمالاً غشای سلولی قارچی به عنوان هدف احتمالی EEP می‌باشد (۱۹). در مقایسه با تحقیق حاضر همچنین، موافق با نتایج موجود *Gucwa* و همکاران دریافتند که کتوکونازول دارای اثر سینرژسم با بیورسین (BEA) می‌باشد (۲۰).

Yenishirli و همکاران در سال ۲۰۱۵ و در مطالعه‌ای با عنوان «حساسیت ضدقارچی ایزوله‌های *کاندیدا/آلبیکانس* در توکات» ترکیه دریافتند که تمامی سویه‌ها به آمفوتریسین و آنیدولافونگین حساس بودند. اگرچه هیچ‌یک از جدایه‌ها مقاومت به کاسپوفانژین نداشتند اما ۱۵ درصد از جدایه‌ها به عنوان نشان‌دهنده‌ی مقاومت حد واسط طبقه‌بندی شدند. مقاومت *کاندیدا/آلبیکانس* به کتوکونازول، فلوکونازول، ایتراکونازول، وریکونازول و پسوکونازول به ترتیب 32% ، 34% ، 21% ، 14% و 14% بود (۲۱).

Nailis و همکاران در سال ۲۰۱۰ به شناسایی ژن فاکتورهای ویرولانس بیوفیلم بالقوه در *کاندیدا/آلبیکانس* با روش Real-Time-PCR پرداختند. بیان ژن‌های بیوفیلم مربوط به *PLB*، *SAP*، *ALS*، *WPI* و *LIP* در *کاندیدا/آلبیکانس* مشاهده شد. *ALS1-5* در تمام ایزوله‌های مورد بررسی بیان بیشتری داشت درحالی‌که کمترین بیان ژن مربوط به *ALS9* مشاهده شد (۲۲). میزان Fold Change برای ژن *als* برابر $1/47$ - که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیرتیمار شده $1/47$ برابر کاهش یافته است.

Marc و همکاران در سال ۲۰۱۸ و در مطالعه‌ای با عنوان «N-(اکسازولیل متیل) تیاژولیدینون علیه بیوفیلم *کاندیدا/آلبیکانس* مهار کننده‌های بالقوه پروتئین‌های *Als*» دریافتند که با توجه به نقش مستندشده‌ی *Als1* و *Als3* در تشکیل بیوفیلم، کلاس جدیدی از ترکیبات که این پروتئین‌ها را هدف قرار می‌دهد، می‌تواند یک روش جدید در پیشگیری و مدیریت عفونت‌های *کاندیدا/آلبیکانس* باشد (۲۳). بنابراین در این تحقیق، میزان Fold Change برای ژن *als* برابر $1/47$ - است که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیرتیمار شده $1/47$ برابر کاهش یافته است.

change نیز بیانگر میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می‌باشد. میزان Fold Change برای ژن Als برابر $1/47$ بود که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار شده $1/47$ برابر کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری

مطابق با بررسی‌ها و تحقیقات این پژوهش، این مطالعه اولین بررسی اثر ترکیبی یک آزول ضدقارچ (کتوکونازول) و یک پروبیوتیک بی‌هوازی (بیفیدوباکتریوم بیفیدوم) بر بیان ژن کدکننده بیوفیلیم (als) در ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. نتایج مطالعه نشان داد که اثر سینرژیستی بین کتوکونازول و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در کاهش بیان ژن als (تولید بیوفیلیم) وجود دارد. در نتیجه از این خاصیت تقویت‌کنندگی می‌توان در بهبود عملکرد دارو استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مطالعه‌ای در زمینه میکروبیولوژی است و از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد ۹۷۰۰۲۵۶۳۸۰۸۱۲ اقتباس شده است. لازم به ذکر است نمونه‌برداری با رضایت آگاهانه به صورت شفاهی از بیماران انجام گردید. بدین وسیله از آزمایشگاه میکروبی پاسارگاد و به‌ویژه جناب آقای مهندس مجید صادق‌پور و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند، قدردانی و تشکر می‌گردد.

بررسی شد. از ۱۹۸ کل ایزوله کاندیدا با بیوفیلیم مثبت، ۷۲ و ۱۲۶ سویه تشکیل بیوفیلیم به صورت پایین و بالا در نظر گرفته شد. تولید بیوفیلیم توسط کاندیدا آلبیکنس به طور قابل توجهی پایین‌تر از ایزوله غیر آلبیکنس بود (۲۶). میزان $\Delta\Delta\text{act}$ بیانگر آنست که برای ژن‌ها در گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده قابل ارزیابی بوده و ردیف Fold change نیز بیانگر میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می‌باشد. میزان Fold Change برای ژن Als برابر $1/47$ - که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار شده $1/47$ برابر کاهش یافته است.

Barros و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی تأثیر کاندیدا کروزئی و کاندیدا گلابراتا بر بیان ژن بیوفیلیم در کاندیدا آلبیکنس شرایط آزمایشگاهی پرداختند. ژن‌های مطالعه شامل *als1, als3, hwp1, bcr1, efg1, tec1, sap5, plb2* و *lip9* بود. در حضور کاندیدا کروزئی، بیان ژن‌های *als3, tec1* و *efg1, bcr1, hwp1* کاندیدا آلبیکنس به طور کامل مهار شد، نشان‌دهنده تفاوت در رونوشت و تضاد فنوتیپی موجود بین این دو گونه است؛ اما ژن‌های مربوط به ترشح آنزیم‌های تحریک افزایش یافته بود. در حضور کاندیدا گلابراتا، کاندیدا آلبیکنس نشان داد یک پروفایل بیان ژن مشابه که به دست آمده در ارتباط با کاندیدا کروزئی، هر چند دامنه تغییرات میزانش کمتر بود (۲۷). میزان $\Delta\Delta\text{act}$ بیانگر آن است که برای ژن‌ها در گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده قابل ارزیابی بوده و ردیف Fold

منابع

1. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2004; 34(1): 9-21.
2. Shen TC, Chang PY, Lin CL, Chen CH, Tu CY, Hsia TC & et al. Risk of periodontal diseases in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A nationwide population-based cohort study. *Medicine* 2015; 94(46): e2047.
3. Kroes I, Lepp PW & Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96(25): 14547-52.
4. Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC & Relman DA. Methanogenic archaea and human periodontal disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101(16): 6176-81.
5. Larone DH. Medically important fungi: A guide to identification. Washington: ASM Press; 1995: 325-96.
6. Alby K & Bennett RJ. Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* 2009; 20(14): 3178-91.
7. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols* 2008; 3(9): 1494-500.
8. Martchenko M, Levitin A & Whiteway M. Transcriptional activation domains of the *Candida albicans* Gcn4p and Gal4p homologs. *Eukaryotic Cell* 2007; 6(2): 291-301.

9. Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM & Denfert C. *Candida albicans* biofilms: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic Cell* 2004; 3(2): 536-45.
10. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D & Martinez JP. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2008; 72(3): 495-544.
11. Finkel JS & Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology* 2011; 9(2): 109-18.
12. Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, et al. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)* 2008; 53(2): 179-83.
13. Nagendra R, Viswanatha SR, Kumar S, Murthy BVR & Venkat-Rao S. Effect of feeding milk formula containing lactulose to infants on faecal bifidobacterial flora. *Nutrition Research* 1995; 15(1): 15-24.
14. Burford M. Enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* in milk using oxygen-reducing membrane fraction. *Cultured Dairy Products Journal (USA)* 1989; 24(4): 21.
15. Hoyer LL, Fundyga R, Hecht JE, Kapteyn JC, Klis FM & Arnold J. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* 2001; 157(4): 1555-67.
16. Cockerill FR. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011: 143-52.
17. Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bakhshi B, Katirae F, Mohammadi R & Falahati M. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. *Advanced Biomedical Research* 2016; 5(1): 105.
18. de Sá NP, Possa A, Perez P, Ferreira J, Fonseca N, Lino C, et al. Antifungal activity directed toward the cell wall by 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole against *Candida albicans*. *Infectious Disorders Drug Targets* 2019; 19(4): 428-38.
19. Belmadani A, Semlali A & Rouabhia M. Dermaseptin S1 decreases *Candida albicans* growth, biofilm formation and the expression of hyphal wall protein 1 and aspartic protease genes. *Journal of Applied Microbiology* 2018; 125(1): 72-83.
20. Gucwa K, Kusznierevicz B, Milewski S, Van Dijck P & Szweda P. Antifungal activity and synergism with azoles of Polish propolis. *Pathogens* 2018; 7(2): e56.
21. Yenisehirli G, Bulut N, Yenisehirli A & Bulut Y. In vitro susceptibilities of *Candida albicans* isolates to antifungal agents in Tokat, Turkey. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2015; 8(9): e28057.
22. Nailis H, Kucharikova S, Ricicova M, Van-Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC Microbiology* 2010; 10(1): 114.
23. Marc G, Araniciu C, Oniga S, Vlase L, Pirnau A, Duma M, et al. New N-(oxazolylmethyl)-thiazolidinedione active against *Candida albicans* Biofilm: Potential Als Proteins Inhibitors. *Molecules* 2018; 23(10): e2522.
24. Haghighi F, Roudbar-Mohammadi SH & Farhadi Z. The effect of catechin on fungal biofilm formation of standard susceptible and resistant strains of *Candida albicans*. *Armaghane danesh* 2011; 16(4): 332-40 [Article in Persian].
25. Pakdel M, Zarrabi M, Asgarani E & Mohammadi P. Prediction of antigenic sites on ALS1 and HWP1 protein sequences in vaginal isolated *C. Albicans* of using bioinformatics analysis. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2015; 9(1): 29-34 [Article in Persian].
26. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Medical Mycology* 2008; 46(8): 783-93.
27. Barros PP, Ribeiro FC, Rossoni RD, Junqueira JC & Jorge AOC. Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression in in vitro biofilms. *Archives of Oral Biology* 2016; 64(1): 92-101.

The Synergistic Effect of Ketoconazole and Probiotic Bifidobacterium Bifidum on Isolated Composition of Expression of Candida Albicans Als Gene Biofilm from Oral Samples

Mina Rezaei¹ (M.S.) - Sedigheh Mehrabian² (Ph.D.) - Kiumars Amini³ (Ph.D.)

1 Master of Science in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3 Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Received: Aug 2019

Accepted: Dec 2019

Background and Aim: Candida albicans has numerous virulence factors such as the agglutinin-like sequence (ALS) genes which code the large glycoprotein family that has a role in the adherence of Candida. The present study was to observe the synergistic effect of ketoconazole and probiotic composition of Bifidobacterium bifidum on expression of C. albicans als gene biofilm isolated from oral samples.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 12 clinical isolates of C. albicans were collected from oral periodontal infection in patients referred to dental clinic in Kerman. The MIC and FIC values for each treatment (keto and probiotic alone and keto-probiotic composition) were obtained using micro broth dilution method. Finally, a real-time PCR test was performed to evaluate the level of ALS gene expression in the strains and the results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Results: The results showed that the combination of ketoconazole and bifidobacterium bifidum had synergistic effects. The results of this study showed that the effect of Ketoconazole (keto), B. bifidum (probiotic) alone and the effects of ketoconazole+Bifidobacterium (keto+pro) were 1.47, 1.61 and 1.29 times, reduced the als gene, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that synergistic effects between ketoconazole and probiotic B. bifidum have been shown to reduce als gene expression (biofilm production). Therefore, it is recommended to administer probiotic supplementation with ketoconazole in the treatment of candidal infections.

keywords: Candida Albicans, *Agglutinin Like Sequence (ALS)* Gene, Ketoconazole, Bifidobacterium Bifidum, Real-Time Polymerase Chain Reaction

* Corresponding Author:
Mehrabian S
Email :
mehrabian_s@au.ac.ir