مقایسه اثرات داروی مالتوفر و قند مالتوز بر میزان رشد و مرفولوژی کلنی برخی از درماتوفیت ها

شاهین ابراهیمیان*[1]، علی میکائیلی[2]، فریده زینی[3]، ساسان رضایی[3]، شهلا صفری[4]، علی ملکی[4]

1) گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج

2) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3) گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

4) مرکز تحقیقات سلامت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

تاریخ دریافت: 88/8/15 **تاریخ پذیرش: 89/6/25**

چکیده

مقدمه: درماتوفیت ها گروهی از قارچ ها هستند که در انسان و حیوان ایجاد ضایعه می نمایند. این قارچ ها دارای انواع مختلف بوده که از جهت اثرات داروی مالتوفر و قند مالتوز بایستی گونه هایی انتخاب شوند که بتوان آن ها را نماینده کلیه درماتوفیت ها دانست. بنابراین میکروسپوروم جیپسئوم به عنوان نماینده میکروسپوروم ها و خاک دوست، اپیدرموفایتون فلوکوزوم به عنوان نماینده اپیدرموفایتون ها و انسان دوست، ترایکوفایتون روبروم به عنوان نماینده ترایکوفایتون ها و انسان دوست، و میکروسپوروم کانیس به عنوان نماینده میکروسپوروم ها و حیوان دوست انتخاب گردیدند.

مواد و روش ها: در تحقیق مذکور داروی مالتوفر(که از دو جزء قند مالتوز و آهن (III) باند شده به یکدیگر تشکیل شده است) را در غلظت های مختلف50، 100، 200، 500، 1000، 1500و mg/L 2000 و قند مالتوز را در غلظت های500، 1000، mg/L2000 به محیط کشت S.c.c به طور جداگانه افزوده شد. سپس قارچ های چند بار پاساژ داده شده را در سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون در آورده و قطعات میسیلیومی و اسپورها توسط لام نئوبار در محدوده شمارش گلبول های سفید مورد شمارش قرار گرفت، به نحوی که در هر 50 میکرولیتری از سوسپانسیون قارچی حاوی 1000 قطعه از میسلیوم واسپور قارچ باشد. سپس درمرکز هر یک از غلظت های مختلف محیط های کشت، یک چاهک به قطرهای یکسان ایجاد گردید و به هریک ازچاهک های ایجاد شده در وسط محیط های کشت و محیط کشت شاهد از هر دو گروه قند مالتوز و داروی مالتوفر،50 میکرولیتری از سوسپانسیون قارچی تلقیح گردید. پس از تلقیح، تمامی محیط های کشت را در شرایط یکسان دمایی و رطوبتی به مدت دو هفته نگهداری و در هفته های اول و دوم قطر هر یک از کلنی ها مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت.

یافته های پژوهشی: در بررسی به عمل آمده از مساحت کلنی قارچ ها پس از یک و دو هفته مشخص گردید که هر چهار گونه قارچی مذکور در هر دو ماده افزوده شده به محیط های کشت نسبت به نمونه شاهد رشد بیشتری داشته اند. اما در قیاس با یکدیگر، قارچ های تلقیح شده به محیط های حاوی داروی مالتوفر رشد بیشتر و در غلظت های مختلف گستردگی نامنظم تری از خود نشان دادند، در صورتی که رشد کلیه قارچ ها در محیط های حاوی قند مالتوز رشد کمتر و یکنواخت تری از خود بروز دادند به نحوی که با افزایش قند مالتوز میزان قطر کلنی نیز افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری: براساس یافته ها می توان چنین استنباط کرد که با توجه به این که قند مالتوز جزء مواد مغذی برای قارچ ها محسوب می شود با افزایش میزان غلظت آن رشد قارچ ها نیز افزایش یافته، اما این افزایش رشد سیر صعودی زیادی نداشته است. بنابراین می توان گفت قارچ های درماتوفیت تنها به میزان مورد نیاز جهت مصرف خود اقدام به جذب قند مالتوز می نمایند. داروی مالتوفر نیز که حاوی آهن می باشد و با توجه به این که آهن جزء میکروالمنت های مورد نیاز قارچ ها است در غلظت های مختلف اثرات متفاوتی بر روی رشد درماتوفیت ها نسبت به نمونه شاهد و نمونه های قند مالتوز داشته است. از این رو، با توجه به مشترک بودن قند مالتوز، موجود در ساختمان دارویی مالتوفر و محیط کشت حاوی قند مالتوز افزایش رشد در محیط حاوی داروی مالتوفر میتواند مربوط به وجود آهن(III) موجود در ترکیبات داروی این ماده باشد.

واژه های کلیدی: مالتوفر، درماتوفیت، مالتوز

***نویسنده مسئول:** گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج

Email: Shaahin_ebrahimian@yahoo.com

مقدمه

درماتوفیت ها گروهی از قارچ ها هستند که دارای سه جنس ترایکوفایتون، میکروسپوروم و اپیدرموفایتون می باشند این قارچ ها توانایی کلنیزه شدن در پوست و ضمائم آن را دارند،(1). هر چند این نوع عفونت به لایه شاخی غیر زنده محدود می شود، تغییرات پاتولوژیکی متنوعی در میزبان ایجاد می کند که ناشی از حضور عوامل عفونی و محصولات متابولیک آنهاست. این گروه از بیماری ها را با نام درماتوفیتوزیس می شناسند. شدت این بیماری به سوش یا گونه های درماتوفیت، حساسیت میزبان به آن قارچ خاص، و نیز وضعیت عمومی میزبان از نظر سیستم ایمنی بدن بستگی دارد،(2). این قارچ ها دارای انواع مختلف بوده که از جهت اثـــرات داروی مـالتوفر و قند مالتوز بایستی گونه هایی انتخاب شوند که بتوان آن ها را نماینده کلیه درماتوفیت ها دانست. بنابراین، میکروسپوروم جیپسئوم به عنوان نماینده میکروسپوروم ها و خاک دوستان، اپـــیدرموفایتون فلوکوزوم به عنوان نماینده اپیدرموفایتون ها و انسان دوستان، ترایکوفایتون روبروم به عنوان نماینده ترایکوفایتون ها و انسان دوستان، و میـــکروسپوروم کانیس به عنوان نماینده میکروسپوروم ها و حیوان دوستان انتخاب گردیدند.(2)

بیمـــارانی که عفونت درماتوفیتی دارند تحت درمان های مختلف دارویی قرار می گیرند که از این داروهای ضد قارچی، گروه آزول موثـــرترین ولـــی پر هزینه ترین داروها هستند، البته گریزوفولوین بهترین دارو از نظر اثر و فقدان عوارض جانبی است که ممکن است در آینده نزدیک جای خود را به تربینافین بدهد،(3). بنابر این، با توجه به این که داروی مالتوفر دارای آهن بوده که می تواند به رشد قارچ های درماتوفیت کمک کند و از سوی دیگر قند مالتوز نیز یکی از فاکتورهای مورد نیاز جهت رشد قارچ هـــا می باشـــد، این قند نیز در چرخه های مختلف زیستی سلول های قارچی اثر به سزایی دارد.

آهن دارای نقش فیزیولوژیکی در تنفس سلولی اسـت، از طرفی مقداری از این عنصر در ساختمان آنزیم هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز به کار می رود. در بدن انسان، مقداری ناچیز از آهن به صورت ترکیب پروتئینـی فریتین و ترانسفرین می باشد که شکل ذخیره ای و انتقالی آهن است. در درون سلول، پروتئین آپوفریتین وجود دارد که در اثر ترکیب با آهن ایجاد فریتین می کند،(4). آهن در بدن انسان دارای ساختارهای مولکولی مختلف مانند فریتین، هموگلوبین، میو گلوبین، ترانسفرین، هموسیدرین، ولاکتـــوفرین می باشد،(5)، آهن در ساختمان ماده زنده جزء عناصر کمیاب است و سهم آن در ساختمان اورگانیسم معمولا کمتر از 0/01 درصد می باشد که به عنوان کو فاکتور آنزیم ها فعالیت می کند،(6). هم چنین آهن در درون سلول در سنتز ATP و انتقال الکترون نقش دارد، به طوری که بدون آهن، سلول ها قابلیت انتقال الکترون و متابولیسم انرژی خود را از دست می دهد،(9،8،7). آهن دارای دو شکل Fe^{+2} و Fe^{+3} بوده که اغلب اوقات به عنوان کوفاکتور برای آنزیم های اکسیداسیون-احیاء مورد استفاده قرار می گیرد،(10). سیدروفورهای قارچی نوعی هیدروکسامیک اسید هستند که موارد شناسایی شده سیدروفورهای هیدروکسامات عبارتند از:

۱.Ferrichroms ۲.Fusarinines
۳.Coprogens ٤.Rhodotorulic acid

تری استیل فوزارینین نوعی سیدروفور شناخته شده دیگر است که از طریق باند شدن به آهن وارد قارچ می گردد. کوپروژن ها نیز نه تنها به عنوان سیدروفورعمل می کنند، بلکه به عنوان ترکیب ذخیره کننده آهن نیز وارد عمل می شوند،(12،11). تاکنون مکانیسم جذب و اثر آهن برروی قارچ های کریپتوکوکـــوس نـــئوفورمنس، کـــاندیدا آلبیکنس، ژئوتریکوم کـــاندیدوم، هیستوپلاسما کپسولاتوم، ترایکوفایتـــون منتـــاگروفایتس، رایزوپوس اوریزا، ســـاکارومیسس ســـرویسیه و پاراکوکسیدیوئیدس بـــرازیلینسیـــس بـــه عمـــل آمـــده است،(18،17،16،15،14،13). هرگاه میزان آهن فراوان و به شکل رادیکال های آزاد در آید، بر روی سلول ها خاصیت توکسیک دارد، البته اگر در محیط کشت میزان آهن از حد مشخصی کمتر شود بر روی رشد قارچ اثر مهاری خواهد داشت،(19). در این تحقیق، ما اثرات داروی مالتوفر و قند مالتوزبر روی چهار درماتوفیت ترایکوفایـــتون روبـــروم، میکـــروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم، و اپیدرموفایتون فلوکوزوم را

بررسی کردیم که این چهار جنس به نمایندگی درماتوفیت های گروه انسان دوست، حیوان دوست و خاک دوست و هم چنین از سه جنس ترایکوفایتون ها، میکروسپوروم ها و اپیدرموفایتون ها انتخاب گردیدند.

مواد وروش ها

الف) اندازه گیری آهن در محیط کشت:

برای اندازه گیری دقیق میزان آهن مجاور شده با هر یک از قارچ ها بایستی میزان احتمالی آهن موجود در محیط کشت و حتی آب مقطر دوبار تقطیر شده را نیز کنترل نمود. بر این اساس، اقدام به اندازه گیری آهن در محیط کشت شده به نحوی که 5 گرم از محیط کشت سابرودکستروزاگار(S) را در 77 سی سی آب مقطر حل کرده سپس 50 سی سی از نمونه حاصله را در بشری جداگانه ریخته و به آن 5 سی سی اسید نیتریک غلیظ افزوده می گردد، سپس یک شیشه ساعت را برروی در بشر قرار داده و بر روی هِیتر گذاشته تا حجم نمونه به حدود 15 سی سی تقلیل یابد. بعد از آن، مجددا 5 سی سی اسید نیتریک غلیظ به آن افزوده و می جوشانیم ، و 5 سی سی دیگر اسید نیتریک غلیظ افزوده و دومرتبه می جوشانیم تا محیط کشت کاملا شفاف و روان شود. بعد از این مرحله، اقدام به صاف کردن نمونه کرده و توسط آب مقطر حجم نمونه صاف شده را دوباره به 50 سی سی می رسانیم تا توسط دستگاه اتمیک ابزوربشن مقدار آهن مربوطه را اندازه گیری نماییم، به نحوی که ابتدا دستگاه را روی طول موج 248/6 نانومتر قرار داده و توسط آب مقطر جهت حذف آهن احتمالی موجود در آب مقطری که به محیط کشت افزوده ایم را صفر می کنیم. پس از اندازه گیری، مشخص گردید که در یک گرم از پودر محیط کشت سابرودکستروزاگار(S)، 0/0176 میلی گرم آهن وجود دارد که پس از محاسبه با یک تناسب مشخص گردید در 65 گرم پودر سابرودکستروزاگار(S) که در 1000 سی سی آب مقطر حل می گردد معادل 1/144 میلی گرم آهن وجود دارد. این اندازه گیری ها در آزمایشگاه آنالیز آب گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفت.(22،21،20)

ب) اندازه گیری آهن در آب مقطر:

ابتدا 2 لیتر آب مقطر را با اسید نیتریک اسیدی کرده تا به PH زیر دو برسد، سپس بر روی هیتر گذاشته و گرم می کنیم تا حدی که به جوش نیاید. زمانی که حجم نمونه به زیر 50 سی سی رسید، مجددا با آب مقطر حجم را به 50 سی سی رسانده و سپس توسط دستگاه اتمیک ابزوربشن که بر اساس جذب اتمی کار می کند میزان آهن را اندازه گیری نموده که میزان آن بسیار ناچیز اعلام شد.(۲۲،۲۱،۲۰)

ج) محیط سازی اختصاصی :

در این بررسی، غلظت های مختلف مالتوفر و قند مالتوز به محیط کشت سابرودکستروزاگار حاوی سیکلوهکزامید و کلرامفنیکل(S.C.C) اضافه گردید که غلظت های مختلف مورد نظر در بررسی های اولیه به ترتیب: 2000 و۱۰۰،۲۰۰،۵۰۰،۱۰۰۰،۱۵۰۰ ،50 میلی گرم در لیتر پیش بینی گردید. قارچ های مذکور که در مجاورت این غلظت ها کشت داده شدند با یک نمونه شاهد نیز مقایسه گردیدند،(3،2،1). داروی مالتوفر حاوی آهن می باشد که دارای شکل سه ظرفیتی آهن در حجم 2 سی سی و حاوی 100 میلیگرم آهن در هر آمپول هستند. بنابراین، به علت اینکه محیط های کشت اختصاصی در حجم 200 سی سی ساخته شدند، نیاز به محاسبه جهت ساخت این حجم دارد که از پودر سابرودکستروزاگار به وزن 13 گرم و سفتریاکسون که به جای کلرامفنیکل استفاده گردید به حجم 400 میکرولیتر و 2 سی سی از محلول استون حاوی 500 میلی گرم سیکلوهگزامید در 10 سی سی استون استفاده شد. ابتدا پودر سابرودکستروزاگار را در آب مقطر حل کرده، سپس محلول استون حاوی سیکلوهگزامید را به آن افزوده و اتوکلاو گردید. پس از اتوکلاو، محیط کشت را در دمای اتاق گذاشته تا دمای ان به حدود 37 درجه سانتیگراد برسد، سپس محلول شفاف سفتریاکسون به آن افزوده و کاملا مخلوط گردید. همزمان با افزودن سفتریاکسون به محیط کشت، مقادیر مختلف آهن را که بر اساس تناسب های زیر محاسبه گردید به هر یک از محیط های کشت افزوده و کاملا مخلوط شد و قبل از ژله شدن محیط کشت، آن را در پلیت ها با حجم یکسان تقسیم نمودیم.(3،2،1)

نحوه محاسبه حجم مالتوفر مورد نیاز در غلظتهای مختلف :

1000 سی سی محیط کشت 1000 میکرولیتر مالتوفر :غلظت 50 میلی گرم در لیتر

200 سی سی محیط کشت X= 200 میکرولیتر مالتوفر

جهت غلظت های ۲۰۰،۱۰۰ میلی گرم در لیتر آهن به ترتیب400 و800 میکرولیترمالتوفرو جهت غلظت های ۲۰۰۰،۱۵۰۰،۱۰۰۰،۵۰۰ میلی گرم در لیتر آهن به ترتیب 2، 4، 6و 8 سی سی مالتوفر استفاده شد. هم چنین، جهت ساخت محیط های کشت حاوی قند مالتوز نیز به غلظت های 500و1000و1500و2000 میلی گرم در لیتر نیز مشابه روش فوق محاسبات لازم جهت برداشت پودر سابرودکستروزاگار، سیکلو هگزامید، سفتریاکسون و قند مالتوز به عمل آمد و همانند پروتکل فوق اقدام به ساخت محیط های کشت حاوی قند مالتوز نمودیم.(3،2،1)

د) تهیه سوسپانسیون قارچی:

هریک از چهار قارچ ذکر شده را بایستی به صورت سوسپانسیون در آورده و پس از شمارش قطعات میسیلیومی و اسپوری کشت داد تا در کلیه غلظت ها نسبت یکسانی از قارچ تلقیح گردد. و در پایان بتوان استدلال جامعی از تحقیق به عمل آورد. برای تهیه سوسپانسیون قارچی، قطعه ای از کلنی را توسط آنس برداشته و به لوله آزمایش حاوی 2 سی سی سرم فیزیولوژی استریل اضافه می کنیم و توسط شیکر به شدت شیک می کنیم تا میسیلیوم و اسپورها از ژلوز جدا شوند. سپس توسط یک سمپلر و سرسمپلر استریل از سوسپانسیون حاصله در چند مرحله برداشته و در لوله آزمایش دوم حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال می دهیم و دومرتبه لوله را شیک می کنیم تا سوسپانسیون یکنواختی ایجاد شود.(1،2)

بعد از آن، مقداری از آن را بر روی لام نئوبار برده و قطعات میسیلیومی و اسپوری را شمارش می کنیم. با توجه به حجم سوسپانسیون قرارگرفته بر روی لام نئوبار در قسمت شمارش گلبول های سفید که معادل 1/10 میکرولیتر در هر خانه و در نهایت 4/10 میکرولیتر در چهار خانه می باشد، می توان تعداد قطعات میسیلیومی و اسپوری موجود در 50 میکرولیتر سوسپانسیون تلقیحی را محاسبه کرد. در این تحقیق مقرر گردید 1000 قطعه قارچی به هر یک از محیط های کشت تلقیح گردد، به طوری که بر روی لام نئوبار 8 قطعه قارچی مورد شمارش قرارگیرد تا در هر50 میکرولیتر سوسپانسیون تلقیحی 1000 قطعه قارچی موجود باشد.(3)

ه) کشت اختصاصی درماتوفیت ها:

کلنی های قارچی را جهت تحریک اسپورزایی چند بار پاساژ داده، سپس از هر کدام سوسپانسیون قارچی تهیه گردید. در مرحله کشت اختصاصی، پلیت های مربوط به هریک از غلظت های مالتوفر و قند مالتوز را نام گذاری کرده و پس از رسیدن به دمای اتاق، در مرکز آن ها حفره یکسان و کوچکی ایجاد گردید و سوسپانسیون قارچی به خوبی شیک کرده و 50 میکرولیتراز آن را در حفره تلقیح می نماییم. ما جهت ایجاد دقت در هر مرحله برای هریک ازغلظت ها و نمونه شاهد دو پلیت را کشت دادیم و در پایان نتایج را با یکدیگر مقایسه و از صحت کار مطمئن شدیم. پس از کشت چهار درماتوفیت در کلیه غلظت های مختلف، آن ها را در دمای اتاق نگهداری کردیم. پس از یک و دو هفته، رشد کلنی ها تحت ارزیابی قرار گرفت و مساحت کلنی، رنگ پشت و روی آن و نمای ظاهری مورد بررسی و عکس برداری قرار گرفت.(3،2،1)

یافته های پژوهشی

در این تحقیق، کلنی درماتوفیت ها از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی بررسی گردید، به نحوی که در بررسی ماکروسکوپی مساحت کلنی ها براساس فرمول بیضی زیر محاسبه گردید:

مساحت = نصف قطربزرگ × نصف قطر کوچک × 3/14

که نتایج حاصله درجداول و نمودار زیر نشان داده شده است.

مساحت رشد کلنی قارچ‌ها پس از دو هفته در محیط مالتوفر آگار

غلظت مالتوفر بر حسب mg/l / نام قارچ	شاهد	50 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	500 mg/l	1000 mg/l	1500 mg/l	2000 mg/l
ترایکوفایتون روبروم	6/84	7/6	8/6	8	10/1	16/53	14/85	14/85
میکروسپوروم جیپسئوم	13/5	13/26	11/52	9/67	15/68	15/68	18/6	18/91
میکروسپوروم کانیس	23	23/4	33/3	34	34/46	29/64	28/87	28/87
اپیدرموفایتون فلوکوزوم	4/2	12/5	11/25	7/72	5/11	6/12	6/84	6/3

اختلاف بین گروه ها در سطح اطمینان 95 درصد معنی دار می باشد.(p-value=۰،۰۰۰)

مساحت رشد کلنی قارچ‌ها در محیط مالتوز اگار پس از یک هفته

غلظت مالتوز برحسب mg/l / نام قارچ	شاهد	500 mg/l	1000 mg/l	2000 mg/l
ترایکوفایتون روبروم	0/98	1/2	1/27	1/44
میکروسپوروم جیپسئوم	3/78	3/87	4/5	4/64
میکروسپوروم کانیس	2/21	2/3	2/31	2/31
اپیدرموفایتون فلوکوزوم	0/55	1/35	1/35	2

اختلاف بین گروه ها در سطح اطمینان 95 درصد معنی دار می باشد.(p-value=۰،۰۰۰)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
week۲	Between Groups	۲۲۴۰,۲۲۶	۳	۷۴۶,۷۴۲	۵۵,۴۱۰	.۰۰۰
	Within Groups	۳۷۷,۳۴۹	۲۸	۱۳,۴۷۷		
	Total	۲۶۱۷,۵۷۵	۳۱			
week۱	Between Groups	۶۰,۲۳۳	۳	۲۰,۰۷۸	۱۱,۱۴۸	.۰۰۰
	Within Groups	۵۰,۴۳۰	۲۸	۱,۸۰۱		
	Total	۱۱۰,۶۶۳	۳۱			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons							
Tukey HSD							
Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	۹۵٪ Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
week۲	T.rubrum	M.gypseum	-۳,۶۸۱۲۵	۱,۸۳۵۵۳	.۲۱۰	-۸,۶۹۲۸	۱,۳۳۰۳
		M.canis	-۱۸,۵۲۱۲۵*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۰	-۲۳,۵۳۲۸	-۱۳,۵۰۹۷
		E.floccosum	۳,۴۱۶۲۵	۱,۸۳۵۵۳	.۲۶۷	-۱,۵۹۵۳	۸,۴۲۷۸
	M.gypseum	T.rubrum	۳,۶۸۱۲۵	۱,۸۳۵۵۳	.۲۱۰	-۱,۳۳۰۳	۸,۶۹۲۸
		M.canis	-۱۴,۸۴۰۰۰*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۰	-۱۹,۸۵۱۶	-۹,۸۲۸۴
		E.floccosum	۷,۰۹۷۵۰*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۳	۲,۰۸۵۹	۱۲,۱۰۹۱
	M.canis	T.rubrum	۱۸,۵۲۱۲۵*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۰	۱۳,۵۰۹۷	۲۳,۵۳۲۸
		M.gypseum	۱۴,۸۴۰۰۰*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۰	۹,۸۲۸۴	۱۹,۸۵۱۶
		E.floccosum	۲۱,۹۳۷۵۰*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۰	۱۶,۹۲۵۹	۲۶,۹۴۹۱
	E.floccosum	T.rubrum	-۳,۴۱۶۲۵	۱,۸۳۵۵۳	.۲۶۷	-۸,۴۲۷۸	۱,۵۹۵۳
		M.gypseum	-۷,۰۹۷۵۰*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۳	-۱۲,۱۰۹۱	-۲,۰۸۵۹
		M.canis	-۲۱,۹۳۷۵۰*	۱,۸۳۵۵۳	.۰۰۰	-۲۶,۹۴۹۱	-۱۶,۹۲۵۹
week۱	T.rubrum	M.gypseum	-۱,۸۲۷۵۰	.۶۷۱۰۲	.۰۵۱	-۳,۶۵۹۶	.۰۰۴۶
		M.canis	-۲,۲۵۸۷۵*	.۶۷۱۰۲	.۰۱۱	-۴,۰۹۰۸	-.۴۲۶۷
		E.floccosum	۱,۱۲۸۷۵	.۶۷۱۰۲	.۳۵۲	-.۷۰۳۳	۲,۹۶۰۸
	M.gypseum	T.rubrum	۱,۸۲۷۵۰	.۶۷۱۰۲	.۰۵۱	-.۰۰۴۶	۳,۶۵۹۶
		M.canis	-.۴۳۱۲۵	.۶۷۱۰۲	.۹۱۷	-۲,۲۶۳۳	۱,۴۰۰۸
		E.floccosum	۲,۹۵۶۲۵*	.۶۷۱۰۲	.۰۰۱	۱,۱۲۴۲	۴,۷۸۸۳
	M.canis	T.rubrum	۲,۲۵۸۷۵*	.۶۷۱۰۲	.۰۱۱	.۴۲۶۷	۴,۰۹۰۸
		M.gypseum	.۴۳۱۲۵	.۶۷۱۰۲	.۹۱۷	-۱,۴۰۰۸	۲,۲۶۳۳
		E.floccosum	۳,۳۸۷۵۰*	.۶۷۱۰۲	.۰۰۰	۱,۵۵۵۴	۵,۲۱۹۶
	E.floccosum	T.rubrum	-۱,۱۲۸۷۵	.۶۷۱۰۲	.۳۵۲	-۲,۹۶۰۸	.۷۰۳۳
		M.gypseum	-۲,۹۵۶۲۵*	.۶۷۱۰۲	.۰۰۱	-۴,۷۸۸۳	-۱,۱۲۴۲
		M.canis	-۳,۳۸۷۵۰*	.۶۷۱۰۲	.۰۰۰	-۵,۲۱۹۶	-۱,۵۵۵۴

*The mean difference is significant at the ۰,۰۵ level.

Homogeneous Subsets

week۲				
Tukey HSD				
		Subset for alpha = ۰,۰۵		
group	N	۱	۲	۳
E.floccosum	۸	۷,۵۰۵۰		
T.rubrum	۸	۱۰,۹۲۱۲	۱۰,۹۲۱۲	
M.gypseum	۸		۱٤,٦۰۲۵	
M.canis	۸			۲۹,٤٤۲۵
Sig.		.۲٦۷	.۲۱۰	۱,۰۰۰

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

مساحت رشد کلنی قارچ‌ها در مجاورت مالتوزآگار پس از یک هفته

غلظت مالتوز برحسب mg/l / نام قارچ	شاهد	500 mg/l	1000 mg/l	2000 mg/l
ترایکوفایتون روبروم	0/98	1/2	1/27	1/44
میکروسپوروم جیپسئوم	3/78	3/87	4/5	4/64
میکروسپوروم کانیس	2/21	2/3	2/31	2/31
اپیدرموفایتون فلوکوزوم	0/55	1/35	1/35	2

اختلاف بین گروه ها در سطح اطمینان 95 درصد معنی دار می باشد(p-value=۰,۰۰۰)

از جدول فوق مشاهده می‌گردد هر چهار گونه قارچی در مجاورت قند مالتوز افزایش رشد نشان داده و این تحریک رشد با زیاد شدن قند افزایش می‌یابد. اما همان طور که در نمودارها مشاهده می‌گردد این افزایش رشد در مقایسه با نمونه‌های رشد یافته در مجاورت مالتوفر کمتر رشد و نمو پیدا کرده‌اند.

ANOVA					
Maltose					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	۲۲,٥٦٥	۳	۷,٥۲۲	٤۹,۹٥۹	.۰۰۰
Within Groups	۱.۸۰۷	۱۲	.۱٥۱		
Total	۲٤,۳۷۲	۱٥			

Post Hoc Tests

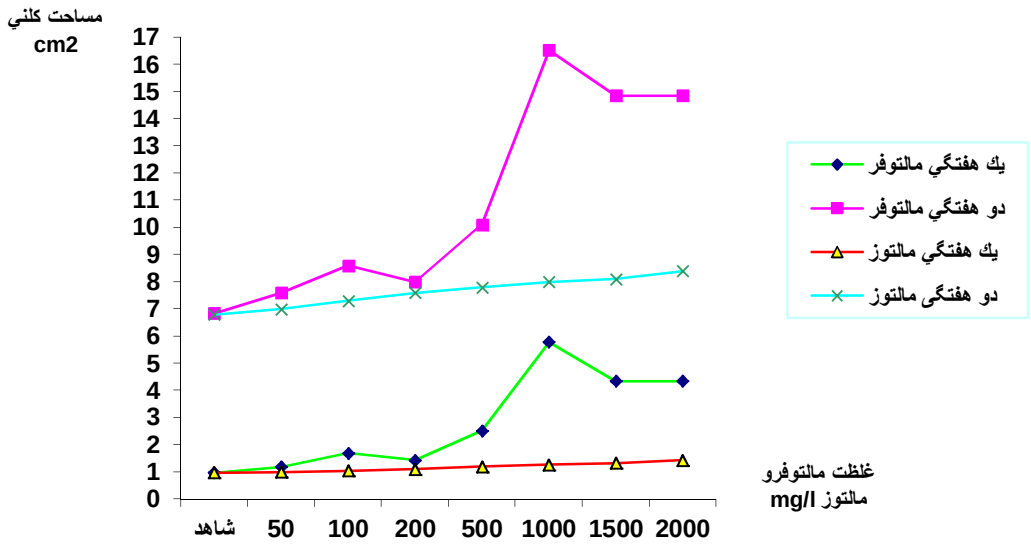
Multiple Comparisons						
Maltose Tukey HSD						
		Mean Difference			۹۵٪ Confidence Interval	
(I) group	(J) group	(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
T.rubrum	M.gypseum	-۲,۹۵۲۵۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۰۰	-۳.۷۶۷۱	-۲,۱۳۷۹
	M.canis	-۱,۰۶۰۰۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۱۰	-۱,۸۷۴۶	-.۲۴۵۴
	E.floccosum	-.۰۹۰۰۰	.۲۷۴۳۷	.۹۸۷	-.۹۰۴۶	.۷۲۴۶
M.gypseum	T.rubrum	۲,۹۵۲۵۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۰۰	۲,۱۳۷۹	۳,۷۶۷۱
	M.canis	۱,۸۹۲۵۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۰۰	۱,۰۷۷۹	۲,۷۰۷۱
	E.floccosum	۲,۸۶۲۵۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۰۰	۲,۰۴۷۹	۳,۶۷۷۱
M.canis	T.rubrum	۱,۰۶۰۰۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۱۰	.۲۴۵۴	۱,۸۷۴۶
	M.gypseum	-۱,۸۹۲۵۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۰۰	-۲,۷۰۷۱	-۱,۰۷۷۹
	E.floccosum	.۹۷۰۰۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۱۹	.۱۵۵۴	۱,۷۸۴۶
E.floccosum	T.rubrum	.۰۹۰۰۰	.۲۷۴۳۷	.۹۸۷	-.۷۲۴۶	.۹۰۴۶
	M.gypseum	-۲,۸۶۲۵۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۰۰	-۳,۶۷۷۱	-۲,۰۴۷۹
	M.canis	-.۹۷۰۰۰*	.۲۷۴۳۷	.۰۱۹	-۱,۷۸۴۶	-.۱۵۵۴

*. The mean difference is significant at the ۰,۰۵ level.

Homogeneous Subsets

Maltose				
Tukey HSD				
		Subset for alpha = ۰,۰۵		
group	N	۱	۲	۳
T.rubrum	٤	۱,۲۲۲۵		
E.floccosum	٤	۱,۳۱۲۵		
M.canis	٤		۲,۲۸۲۵	
M.gypseum	٤			٤,۱۷۵۰
Sig.		.۹۸۷	۱,۰۰۰	۱,۰۰۰

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



نمودار مقایسه رشد کلنی ترایکوفایتون روبروم در دو محیط مالتوزآگار و مالتوفرآگار در 1 و 2 هفتگی

در آنالیز آماری به عمل آمده، مشخص گردید که اختلاف بین مساحت رشد کلنی ها در 4 گونه قارچ مورد بررسی با داروی مالتوفر و قند مالتوز افزوده شده به محیط های کشت نسبت به یکدیگر دارای نسبت معنـــی داری بوده و p-value های به دست آمده از آن ها نیز صفر بوده است.

بحث و نتیجه گیری

در بررسی به عمل آمده از مساحت کلنی قارچ ها پس از یک و دو هفته، مشخص گردید که هر چهار گونه قارچی مذکور در هر دو ماده افزوده شده مالتوفر و مالتوز به محیط های کشت نسبت به نمونه شاهد رشد بیشتری داشته اند. اما در قیاس با یکدیگر، قارچ های تلقیح شده به محیط های حاوی داروی مالتوفر رشد بیشتر و در غلظت های مختلف گستردگی نامنظم تری از خود نشان دادند، در حالی که رشد کلیه قارچ ها در محیـــط های حاوی قند مالتوز رشد کمتر و یکنواخت تری از خود بروز دادند. در مطالعه انجام شده، مشخص گردید با توجه به اینکه قند مالتوز جـــزء مواد مغذی برای قارچ ها محسوب می گردد، با افزایش میزان غلظت آن رشد قارچ ها نیز افزایش یافته، اما این افزایش رشد سیر صعـــودی زیادی نداشت، بنابراین، می توان گفت قارچ های درماتوفیت تنها به میزان مورد نیاز جهت مصرف خود اقدام به جذب قند مالتـــوز می نمایند. داروی مالتوفر نیز که حاوی آهن می باشد و با توجه به این که آهن جزء میکروالمنت های مورد نیاز قارچ هاست در غلظت های مختلف اثرات متفاوتی بر روی رشـــد درماتوفیت ها نسبت به نمونه شاهد و نمونه های قند مالتوز داشت. بنابراین، نتایج به دست آمده نمایانگر عدم مهار رشد قارچ های درماتوفیت ترایکوفایتون روبروم، میکـــروسپـــوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و اپیدرموفایتون فلوکوزوم براثر افزایش غلظت مالتوفر نسبت به نمونه شاهد می باشد، به نحوی که بیشترین رشد قارچ ترایکوفایتون روبروم در یک و دو هفتگی در غلظت 1000 میلی گرم در لیتر مالتوفر بوده، در حالی که کمترین میزان رشد این قارچ در غلـــظت200 میلی گرم در لیتر مالتوفر در مقایسه با نمونه شاهد بود. میکروسپوروم جیپسئوم در غلظت50 میلی گرم در لیتر مالتوفر بیشترین رشد را در یک هفتگی از خود نشان داد، در صورتی که کمترین رشد کلنـــی آن در مـــدت مذکور در غلـــظت1000 میلی گرم در لیتر مالتوفر صورت گرفت. حال آن که، پس از دو هفته، این درمـــاتوفیت در غلظت2000 میلی گرم در لیتر مالتوفر به حداکثر رشد رسید و کمـــترین میزان رشد آن در غلظت 200 میلی گرم در لیتر مالتوفر بروز کرد. میکروسپوروم کانیس نیز در طول هفته اول بیشترین رشـــد را در غلظت1000

میلی گرم در لیتر مالتوفر داشته و کمترین میزان رشد در غلظت 200 میلی گرم در لیتر مالتوفر را در قیاس با نمونه شاهد داشت، در حالی که، میزان رشد این قارچ در طول هفته دوم در غلظت 500 میلی گرم در لیتر آهن بالاترین نرخ رشد و در غلظت 2000 و 1500 میلی گرم در لیتر مالتوفر کمترین نرخ رشد را در قیاس با نمونه شاهد دارا بود. اپیدرموفایتون فلوکوزوم نیز در هفته اول رشد خود دارای بیشترین رشد در غلظت 200 میلی گرم در لیتر مالتوفر بود و کمترین رشد آن در غلظت 500 میلی گرم در لیتر مالتوفر در قیاس با نمونه شاهد از خود بروز داد، ولی در طول هفته دوم، در غلظت50 میلی گرم در لیتر مالتوفر به حداکثر رشد خود رسید و در غلظت500 میلی گرم در لیتر مالتوفر کمترین رشد پیدا نمود.

بنابراین، در آنالیز آماری به عمل آمده، مشخص گردید اختلاف بین مساحت رشد کلنی ها در 4 گونه قارچ مورد بررسی با داروی مالتوفر و قند مالتوز افزوده شده به محیط های کشت نسبت به یکدیگر دارای نسبت معنی داری بوده و p-value های به دست آمده از آن ها نیز صفر بوده است. حال با توجه به این که قند مالتوز در هر دو گروه از محیط های کشت موجود می باشد، می توان صرفا نتایج حاصله از سایر محققین که بر روی اثرات آهن برروی قارچ ها و سایر سلول ها تحقیق کرده اند با این پژوهش مقایسه کرد، زیرا بر اساس بررسی های انجام شده توسط محققین مختلف مشخص شده است که آهن به میزان کم برای رشد قارچ ها ضروری است. جانسن ال در سال 2008 اذعان داشت با توجه به این که نیاز قارچ به آهن برای فعالیت های بیوشیمیایی ضروری است و بر روی فعل و انفعال های قارچ و میزبان نقش های گوناگونی دارد، میزان آهن فراوان برای قارچ ها توکسیک بوده و این موضوع اجتناب ناپذیر است، در صورتی که، دراین تحقیق داروی مالتوفر که حاوی آهن است تا غلظت 2000 میلی گرم در لیتر نیز اثر کاهنده بر رشد درماتوفیت های مختلف نداشت.(23)

سرای اس کی و همکاران در سال 2002 اشاره ای به عبور آهن به شکل 2 ظرفیتی از غشاء سلولی کرده اند که این امر در موجودات متکامل صورت گرفته و آهن به فرم ذخیره ای و به شکل غیر توکسیک آن در سلول ذخیره می شوند. این موضوع احتمال ذخیره شدن آهن در سلول های قارچی را در این تحقیق تقویت می کند.(24)

ماراهیل و میتکه در سال 2007 مطالعات جالب توجه ای جهت تشخیص ودرمان به کمک سیدروفورها انجام دادند که بر اساس آهن بود و مشخص گردید که ترکیبات داروی سنتز شده و مواد طبیعی آهن دار می توانند جهت درمان بیماری های عفونی و یا پیشگیری از آن ها مورد استفاده قرار گیرند. این مهار کننده های پاتوژن از کونجوگه شدن سیدروفور-آنتی بیوتیک به عنوان مهار کننده مسیر سیدروفور شناخته شدند. حال اگر به این پژوهش استناد کنیم، مالتوفر علاوه براین که در درمان آنمی های شدید ناشی از فقر آهن کاربرد دارد، احتمالا می تواند به عنوان بازدارنده رشد پاتوژن ها نیز مد نظر قرار گیرد.(25)

سپاس گزاری

عکس برداری و ثبت سایر اثرات هنری در این پژوهش با همکاری سرکار خانم مهندس صفا مرجانی انجام پذیرفته که از تلاش و همکاری ایشان صمیمانه قدردانی می نمایم.

References

۱-Khosravi A. [Medical mycology(a practical approach)].Tehran University, Jahad e Daneshgahi Pub ۲۰۰۰.p.۳۰-۶.(Persian)

۲-Zaini F,Mehbod A, Emami M. [Comperhrnsive medical mycology].۱st ed. Tehran University Pub ۱۹۹۹.P.۸۵. (Persian)

۳-Topley & Wilson's. Microbiology and microbial infections. vol ٤. A jello L, J hay R. Medical mycology, the dermattophytes. ۹th ed. Arnold, London, Oxford University Press ۱۹۹۸.P. ۲۱٦-۷, ۲۱۹, ۲۲۷-۸.

٤-Shahbazi P,Maleknia N.[General biochemistry],۱۹th ed. Vol ۲. Tehran University Pub ۲۰۰۱. (Persian)

۵-Rahimi J.[The effect of Iron on with or whitout capsule Cryptoccous neoformans]. School of Hearth & Research, Tehran University. Thesis No: ۲۰۹۱-۱۳۷۲. (Persian)
۶-Norzad G.[Cellular and molecular biology], ۳rd ed. Mashhad; Mashhad Jahad e Daneshgahi Pub ۱۹۹۳.P.۳۹-۴۰. (Persian)
۷-Lieu P, Heiskala T, Marjar. The roles in health and disease, molecular aspects of medicine. Microbiology J ۲۰۰۱; ۲۲ ۸۱-۷.
۸-Schumann. K, Moret, M. Iron regulatory protein as an endogenous sensor of iron in rat intestinal mucosa, European j biochem ۱۹۹۹; ۲۶۰: ۳۶۲-۷۲.
۹-Andrews NC, Fleming MD, Gunshin H. Iron transport across biologic membrances. Nutr Rev ۱۹۹۹; ۵۷: ۱۱۴-۲۳.
۱۰-Byers B. R. Microbial iron transport: Iron acquisition by pathogenic microorganisms. Metal Ions Biol. Syst ۱۹۹۸; ۳۵: ۳۷-۶۶.
۱۱-D H Jennings. The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press ۱۹۹۵.p. ۳۶۷-۷۲.
۱۲-Joy IW, john Hl. Comparative nutrition of Iron and copper. Annu Rev Nutr ۱۹۹۷; ۱۷: ۵۰۱-۲۶.
۱۳-Danieal J K. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. Molecular Microbiology ۲۰۰۳; ۴۷ (۵): ۱۱۸۵-۹۷.
۱۴-Dexter H. Howard. Acquisition, transport, and storag of Iron by pathogenic fungi. Clinical Microbiology Reviews. ۱۹۹۹.p. ۳۹۴-۴۰۴.
۱۵-D H Jennings, G lysek. Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. BIOS Scientific Publishers ۱۹۹۹.p. ۶۱-۳.
۱۶-Julian c, Rutherford & Amanda, J Bird. Metal-responsive transcription factors that requlate Iron,zinc,and copper homestasis in Eukaryotic cells. Eukaryotic Cell ۲۰۰۴.p.۱-۱۳.
۱۷-Morrissey J A, P H Williams, A M Cashmore. Candida albicanse has a cell-associated ferric reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. Microbilogy ۱۹۹۶; ۱۴۲: ۴۸۵-۹۲.
۱۸-Richard F, Hassett, Annette M, Romeo, Daniel J, Kosman. Regulation of high affinity Iron uptake in the yeast saccharomyces cerevisiae. J Biological Chemistry, ۱۹۹۸; ۲۷۳(۱۳): ۷۶۲۸-۳۶.
۱۹-Artis Wm,Wade TR,Jones HE. Restorvation T. mentagrophytes growth in medium depleted metals by chelation: importance of iron. Sabouraudia ۱۹۸۳. P. ۴۱-۸.
۲۰-Olof P M, Hauz Kh. How to Measure Total Iron. Technical Assistance Hydrology Project. New Delhi, September ۲۰۰۰.
۲۱-Todd H, Wiedemeier, Matthew A, Swanson, David E, MoutouxJohn T, et al, Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water. EPA/۶۰۰/R-۹۸/۱۲۸, September ۱۹۹۸.
۲۲-Gladis Z, Xiufu Sh. Management of Iron in irrigation water. Fact Sheet FS۵۱۶. Published, December ۲۰۰۵.
۲۳-Johnson L. Iron and siderophores in fungal-host interactions. Mycol Res. ۲۰۰۸; ۱۱۲(۲):۱۷۰-۸۳. Epub ۲۰۰۷ Dec ۱۴.
۲۴-Srai SK, Bomford A, McArdle HJ. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. Best Pract Res Clin Haematol ۲۰۰۲; ۱۵(۲):۲۴۳-۵۹.
۲۵-Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol Mol Biol Rev. ۲۰۰۷; ۷۱(۳):۴۱۳-۵۱.

Comparison of Maltofer And Maltose Effects on Growth And Morphology of Dermatophyte spp Colonies

Ebrahimian Sh[1], Mikaeili A[2], Zeini F[3], Rezaei S[3], Safari Sh[4], Maleki A[4]*

(Received: 6 Nov. 2009 Accepted: 16 sep. 2010)

Abstract

Introduction: Dermatophytes are a group of fungi that cause infection to humans and animals. These fungi have different species. In view of the effects of Maltofer and Maltose, varieties of them should be selected to represent all the different types of dermatophytes. Therefore, Microsporum gypseum from soil Microsporums, Epidermophyton fluccosom from human Epidermophytons, Trichophyton rubrum from human Trichophytons and Microsporum canis from animal Microsporums were chosen as representatives.

Materials and Methods: In this research, Maltofer (consisting of Maltose and Fe III as components) in ۵۰،۱۰۰, 200, 500, 1000, 1500 and 2000 mg / L concentrations and Maltose in 500, 1000 and 2000 mg / L concentrations were separately added to SCC culture medium. Then, the fungi were suspended in normal saline and mycelia segments and spores were counted in WBC count part of Neubauer slide, so that each 50 µL of fungal suspension contained 1000 mycelium segments and fungi spores. Then, in the center of each different concentration of culture media and also control culture, wells with equal diameters were created to which both Maltose and Maltofer groups of 50 µL of fungal suspension were injected. After inoculation, all the culture media were set in the same temperature and moisture conditions for two weeks. In the first and second weeks, the diameter of each colony was evaluated and measured.

Findings: In evaluation of fungal colony area after 1 and 2 weeks, it was observed that all the four above mentioned fungal varieties in both Maltofer and Maltose groups showed more growth than the control. The fungi inoculated in Maltofer containing media showed more growth and irregularity in different concentrations while the growth of all fungi in Maltose containing media was lesser and more uniform, so the more increased Maltose concentration the more increased the diameter of colonies.

Discussion and Conclusion: According to the finds, it can be deduced that Maltose a nutrient for the fungi, increase in its concentration causes increase in fungal growth, but not with an escalating trend. So, it is assumed that dermatophytes just absorb Maltose up to their level of requirement. Maltofer contains iron, i.e. a microelement of fungi with different effects in various concentrations on dermatophyte growth compared to control and Maltose containing media. Regarding presence of Maltose in Maltofer and culture media containing Maltose, increased growth in Maltofer containing media may be related to iron III presence in them.

Keywords: maltofer, dermatophytes, maltose

1. *Dept of Nursing,Nursing School, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj,Iran(corresponding author)*

2. *Dept of Medical Mycology,Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran*

3.*Dept of Medical Mycology, Health & Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

4. *Health ResearchCcenter, Health School, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran*