Archive of SID

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی – پژوهشی

بررسی تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز (آلیوم سپا) بر رشد و فعالیت آنزیم لیپاز در مالاسزیا فورفور

نویسندگان: دکتر معصومه شمس‌قهفرخی[1]، ژینوس رفائی[2]، دکتر عبدالامیر علامه[3] و دکتر مهدی رزاقی‌ابیانه[4]

۱. استادیار گروه قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲. دانش آموخته گروه قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استاد گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۴. استادیار بخش قارچ‌شناسی انستیتو پاستور ایران

چکیده

تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز بر رشد و فعالیت آنزیم لیپاز در قارچ *مالاسزیا فورفور* مورد بررسی قرار گرفت. بهترین تولیدکننده آنزیم لیپاز از طریق غربالگری ۱۰ ایزوله *مالاسزیا فورفور* جداسازی شده از مبتلایان به پیتریازیس ورسیکالر بر روی محیط جامد اختصاصی شناسایی گردید. در ادامه، شرایط بهینه تولید آنزیم لیپاز از نظر دما، pH و زمان در محیط کشت مایع چاپکس تغییریافته تعیین شد. تمامی ۱۰ ایزوله قادر به تولید لیپاز در محیط‌های کشت جامد و مایع بودند. حداکثر فعالیت آنزیم لیپاز در کشت‌های مایع مربوط به کشت ۴ روزه ایزوله شماره ۱۳۲ در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود. فعالیت لیپاز داخل و خارج سلولی در ایزوله‌های مختلف *مالاسزیا* در شرایط بهینه به ترتیب در محدوده ۶/۱۶ ـ ۰/۹۸ و ۹۹/۸۷ ـ ۱۲/۸۱ میلی‌واحد در میلی‌گرم پروتئین تعیین گردید. عصاره آبی پیاز بر خلاف روغن پیاز، رشد *مالاسزیا فورفور* ایزوله شماره ۱۳۲ را از طریق وابسته به غلظت مهار کرد. حداقل و حداکثر مهار رشد قارچ به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۰/۶۲ و ۴۰ میلی‌لیتر عصاره آبی پیاز و برابر ۲/۶۴ و ۱۰۰ درصد گزارش گردید. فعالیت آنزیم لیپاز توسط هر دو نوع عصاره آبی و روغن پیاز از طریق وابسته به غلظت مهار گردید و حداکثر این مهار به ترتیب برابر ۶۶/۹۴ و ۴۰/۷۲ درصد تعیین شد. این اولین گزارش در خصوص مهار فعالیت آنزیم لیپاز *مالاسزیا فورفور* توسط گیاه پیاز است. از آن‌جا که رشد و تولید آنزیم لیپاز در پاتوژنز عفونت‌های ناشی از *مالاسزیا فورفور* نقش بسزایی دارند، جایگزینی داروهای ضدقارچی واجد آثار جانبی شدید با ترکیبات طبیعی نظیر گیاه پیاز توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پیاز (آلیوم سپا)، آنزیم لیپاز، *مالاسزیا فورفور*، آثار مهاری

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مالاسزیا فورفور از گونه‌های مهم جنس مخمری ***مالاسزیا*** است که به‌عنوان فلور طبیعی پوست انسان مطرح است. این قارچ در اتیولوژی بیماری‌های مختلف، شامل پیتریازیس وریسکالر، دندروف، درماتیت سبوره، فولیکولیت، درماتیت اتوپیک و سپتی‌سمی‌های ناشی از مصرف کاتترهای آلوده به قارچ دخیل است [۱]. شرایطی که منجر به بیماری‌زا شدن قارچ می‌گردد تاکنون به‌طور کامل شناسایی نگردیده است. با این حال محققین نشان داده‌اند که عوامل مختلف، شامل فاکتورهای ژنتیکی، تغییر و بر هم خوردن تعادل فلور میکروبی پوست، نقایص سیستم ایمنی و افزایش موضعی مخمر در سطح پوست بدن میزبان و تفاوت بین گونه‌ای فعالیت آنزیم‌های هیدرولاز و لیپاز در ایزوله‌های ***مالاسزیا*** در پاتوژنز عفونت‌های ناشی از این قارچ دخیل هستند [۱و۲]. تاکنون حضور آنزیم لیپاز در ارگانیسم‌های مختلف از جمله قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها و باکتری‌ها به اثبات رسیده است [۷ـ۳]. اسیدهای چرب حاصل از فعالیت این آنزیم در مراحل بعد جهت تولید انرژی و سنتز ترکیبات ساختاری سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و بدین ترتیب آنزیم لیپاز می‌تواند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در پاتوژنز عفونت‌های میکروبی دخیل باشد. لیپازها، بخصوص انواع با منشأ قارچی، علاوه بر نقش در هیدرولیز چربی‌ها در صنایع مختلف شامل داروسازی، شیمیایی، لبنی، چرم‌سازی، کاغذسازی، آرایشی، بهداشتی و غذایی نیز کاربرد دارند [۷و۸].

ران (Ran) و همکاران او در سال ۱۹۹۳ نقش آنزیم لیپاز را در رشد ***مالاسزیا فورفور*** و پاتوژنز عفونت‌های مربوط تأیید کردند [۹]. این قارچ دارای ساختار پیچیده سلولی بوده و به‌دلیل حضور لیپیدهای کمپلکس در ساختار دیواره سلولی نسبت به اکثر داروهای ضدقارچی شناخته شده مقاوم است. از طرف دیگر، این داروها به‌دلیل یوکاریوتیک بودن قارچ‌ها شبیه سلول‌های پستانداری، دارای عوارض جانبی شدید به‌ویژه در مصارف طولانی مدت در انسان هستند. به همین دلیل، بسیاری از برنامه‌های تحقیقاتی در مورد درمان عفونت‌های قارچی به‌ویژه در سال‌های اخیر در جهت یافتن ترکیبات طبیعی واجد آثار ضدقارچی مناسب و آثار جانبی ناچیز جهت‌گیری شده است [۱۲ـ۱۰]. در این باره، نشان داده شده که انواع عصاره‌های به‌دست آمده از گیاه پیاز، علاوه بر آثار ضدسرطانی و مهار تولید برخی از مایکوتوکسین‌ها، قادر به مهار رشد ارگانیسم‌های مختلف شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها ویروس‌ها هستند [۱۶ـ۱۳]. مطالعات اخیر ما برای اولین بار نشان داد که عصاره آبی پیاز علاوه بر مهار رشد یک درماتوفیت مهم به نام ***ترایکوفیتون منتاگروفایتس***، قادر به مهار فعالیت آنزیم بسیار با اهمیتی به نام کراتیناز در قارچ مذکور است [۱۷]. به همین دلیل و با توجه به نقش آنزیم لیپاز در پاتوژنز عفونت‌های ناشی از ***مالاسزیا فورفور***، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز بر رشد و تولید آنزیم لیپاز در ***مالاسزیا فورفور*** انجام گرفت. تعداد ۱۰ ایزوله ***مالاسزیا فورفور*** جداسازی شده از مبتلایان به پیتریازیس ورسیکالر مورد استفاده قرار گرفت. این تحقیق اولین گزارش در خصوص مهار رشد ***مالاسزیا فورفور*** توسط عصاره آبی پیاز و مهار فعالیت آنزیم لیپاز خارج سلولی توسط هر دو نوع عصاره آبی و روغن پیاز است.

مواد و روش‌ها

ارگانیسم‌ها

تعداد ۱۰ ایزوله ***مالاسزیا فورفور*** جداسازی شده از مبتلایان به پیتریازیس ورسیکالر مورد بررسی قرار گرفت. این ایزوله‌ها براساس مورفولوژی ماکرو و میکروسکوپی و ویژگی‌هایی نظیر توانایی رشد بر روی محیط سابورو دکستروز آگار، تست کاتالاز و الگوی جذب انواع توئین‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ مورد شناسایی قرار گرفتند [۱۸].

دوماهنامه علمی - پژوهشی دانشور پزشکی / دانشگاه شاهد / شهریور ۸۳ / سال یازدهم / شماره ۵۲

www.SID.ir

Archive of SID

غربالگری تولید آنزیم لیپاز در محیط جامد

ایزوله‌های ***مالاسزیا فورفور*** از نظر توانایی تولید لیپاز خارج سلولی با استفاده از روش محسین (Muhsin) و همکارانش [۵] بررسی شدند. مقدار ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول‌های مخمری (حاوی 10^6 سلول در میلی‌لیتر) که بر روی محیط دیکسون تغییر یافته رشد کرده بود در مورد هر ایزوله به طور جداگانه به محیط جامد غربالگری حاوی پپتون (۱۰ گرم)، کلرید سدیم (۵ گرم)، کلرید کلسیم واجد یک مولکول آب تبلور (۰/۱ گرم)، توئین ۲۰ (۱۰ میلی‌لیتر)، آگار (۲۰ گرم) و آب مقطر (۱ لیتر) پیش از منجمد شدن محیط افزوده شد و کشت‌ها به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تولید لیپاز خارج سلولی براساس مشاهده یک هاله رسوبی در اطراف کلنی‌های مخمری ارزیابی گردید. قطر هاله رسوبی به عنوان معیار فعالیت آنزیم محاسبه و درنظر گرفته شد.

تهیه عصاره آبی و روغن پیاز

عصاره آبی پیاز براساس روش شمس (Shams) و همکاران او [۱۷] از پیاز سفید و تازه همدان تهیه شد. روغن پیاز نیز براساس روش بلاک (Block) [۱۹] و با استفاده از حلال اتر تهیه گردید. عصاره آبی پیاز از طریق فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۲۲ میکرون استریل گردید. این عصاره و روغن پیاز به صورت تازه مورد استفاده قرار گرفت.

کشت در محیط مایع اختصاصی

ایزوله‌های ***مالاسزیا*** ابتدا در محیط جامد دیکسون تغییر یافته به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس مطابق روش پلاتکین (Plotkin) و همکاران او [۲۰]، سوسپانسیون سلول‌های مخمری در آب مقطر استریل تهیه شد و به میزان 10^6 سلول به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت در محیط مایع اختصاصی تلقیح گردید. این محیط حاوی پودر چاپکس برات (۳ درصد)، عصاره مخمر (۰/۲۵ درصد)، توئین ۸۰ (۰/۱ درصد)، سیکلوهگزامید (۰/۰۵ درصد) و کلرامفنیکل (۰/۰۰۵ درصد) بود و در مقادیر ۵۰ میلی‌لیتری در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری توزیع گردید. به‌طور همزمان، عصاره‌های آبی و روغن پیاز در مقادیر مشخص و به‌طور جداگانه به کشت‌ها افزوده شدند (برای هر غلظت از هر عصاره ۳ ارلن درنظر گرفته شد) و به کشت‌های کنترل هیچ‌گونه عصاره‌ای افزوده نشد. حجم تمامی ارلن‌ها با استفاده از بافر فسفات استریل یکسان گردید. کشت‌ها به‌طور جداگانه در شرایط ساکن و متحرک در حرارت‌های ۲۸، ۳۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز نگهداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز سیتوزولی

مایع رویی حاصل از سانتریفوژ سلول‌های مخمری خرد شده در $100/000 \times g$ به مدت ۶۰ دقیقه به عنوان سایتوزول مورد استفاده قرار گرفت. میزان پروتئین سایتوزول با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد [۲۱]. فعالیت لیپاز داخل و خارج سلولی با استفاده از روش کوردل (Kordel) و همکاران او [۲۲] اندازه‌گیری شد. ۲ میلی‌لیتر از سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات (۳۰ میلی‌گرم پارانیتروفنیل پالمیتات در مخلوط ۱۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول، ۹۰ میلی‌لیتر بافر تریس گلایسین ۰/۱ مولار با pH ۸/۹ و ۰/۹ میلی‌لیتر تریتون ۱۰۰ ـ x حل گردید) به ۰/۳ میلی‌لیتر از فیلترای کشت و یا عصاره سلولی (سایتوزول) افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در ادامه، مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۰/۱ مولار به عنوان متوقف‌کننده واکنش آنزیمی به مجموعه افزوده شد و بلافاصله جذب نهایی توسط اسپکتروفتومتر دبل بیم Shimadzu UV/VIS 1601 در طول موج ۴۱۰ نانومتر در مقابل شاهد قرائت گردید. نمونه شاهد حاوی تمامی اجزای نمونه تست بود، با این تفاوت که منبع آنزیم (سایتوزول و یا محیط کشت) همزمان با متوقف‌کننده

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش آنزیمی به مجموعه افزوده شد. فعالیت آنزیم لیپاز با استفاده از ضریب خاموشی آنزیم (۱۵۰۰۰ = ε) و براساس میکرومول در میلی‌لیتر محاسبه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم لیپاز بنابه تعریف، میزانی از آنزیم است که بتواند تولید یک میکرومول ρ ـ نیتروفنل را در هر دقیقه در شرایط آزمایش کاتالیز کند. فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد فعالیت آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. وزن خشک قارچ نیز پس از خشک کردن کامل وزن مشخصی از سلول‌های مخمری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد.

نتایج

غربالگری تولید لیپاز در محیط جامد

بررسی ۱۰ ایزوله ***مالاسزیا فورفور*** مطابق بخش مواد و روش‌ها در محیط کشت غربالگری اولیه نشان داد که تمامی ایزوله‌ها قادر به تولید لیپاز خارج سلولی بودند. فعالیت این آنزیم براساس تولید یک هاله رسوبی در اطراف کلنی‌های ***مالاسزیا*** ارزیابی گردید. بر این اساس نشان داده شد که ایزوله‌های تحت بررسی، هاله‌های رسوبی با قطر ۸ تا ۲۵ میلی‌متر تولید می‌کنند که در این میان، ایزوله شماره ۳ کم‌ترین فعالیت آنزیمی لیپاز (قطر هاله برابر ۸ میلی‌متر) و ایزوله شماره ۱۳۲ بیش‌ترین فعالیت آنزیمی (قطر هاله برابر ۲۵ میلی‌متر) را از خود نشان دادند. بدین‌ترتیب، ایزوله شماره ۱۳۲ جهت مراحل بعدی تحقیق انتخاب شد و مورد استفاده قرار گرفت.

بهینه‌سازی تولید لیپاز در کشت‌های غوطه‌ور

به‌منظور تأیید نتایج حاصل از تست غربالگری اولیه بر روی محیط جامد، ***مالاسزیا فورفور*** ایزوله شماره ۱۳۲ (بهترین تولیدکننده لیپاز خارج سلولی) در محیط کشت مایع اختصاصی تلقیح گردید و تأثیر پارامترهای مختلف، شامل مدت زمان کشت، هوادهی و دما بر رشد قارچ و تولید آنزیم لیپاز مطابق بخش مواد و روش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان رشد قارچ و فعالیت ویژه آنزیم لیپاز در تمامی دوره‌های زمانی کشت در شرایط متحرک (۱۰۰ دور در دقیقه) در مقایسه با شرایط ساکن، بالاتر و این اختلاف از نظر آماری در سطح کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار بود. فعالیت فرم خارج سلولی لیپاز در مقایسه با فرم داخل سلولی آنزیم در تمامی دوره‌های زمانی کشت بالاتر گزارش گردید. حداکثر این فعالیت در کشت‌های ۴ روزه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد که به ترتیب برابر ۷۰/۶۱ و ۴/۸۵ میلی واحد در میلی گرم پروتئین بود. حداکثر میزان رشد توتال قارچ نیز در کشت‌های ۱۲ روزه و به میزان ۰/۱۳ گرم ثبت شد. در مجموع، حداکثر فعالیت آنزیم لیپاز مربوط به فرم خارج سلولی آنزیم بود که در کشت‌های متحرک ۴ روزهٔ نگهداری شده در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به‌دست آمد (جزئیات نشان داده نشده است).

به‌منظور مقایسه فعالیت آنزیمی در محیط‌های جامد غربالگری و مایع، تمامی ۱۰ ایزوله ***مالاسزیا فورفور*** در شرایط بهینه تعیین شده در مراحل قبل کشت داده شدند. میزان رشد توتال ایزوله‌ها بین ۰/۰۳ تا ۰/۱۱ گرم وزن خشک گزارش‌گردید. همچنین سطح‌فعالیت ویژه لیپاز داخل و خارج سلولی به ترتیب در محدوده ۶/۱۶ـ۰/۹۸ و ۹۹/۸۷ـ۱۲/۸۱ میلی واحد در میلی گرم پروتئین در میان ایزوله‌ها ثبت گردید (نمودار ۱). اختلاف میزان رشد و سطح فعالیت ویژه آنزیم لیپاز در میان برخی از ایزوله‌های ***مالاسزیا فورفور*** از نظر آماری معنادار گزارش گردید ($P<0/05$).

بررسی تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز بر رشد قارچ و فعالیت لیپاز خارج سلولی

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و روغن پیاز بر الگوی رشد ***مالاسزیا فورفور*** ایزوله شماره ۱۳۲ در شرایط بهینه از پیش تعیین شده نشان داد که عصاره آبی پیاز، رشد قارچ را از طریق وابسته به غلظت مهار می‌سازد، در حالی که روغن پیاز فرایند

www.SID.ir

Archive of SID

رشد را از طریق وابسته بـه غلظـت تحریـک مـی‌کنـد (جدول ۱). حداقل و حداکثر مهار رشد قـارچ توسـط عصاره آبی پیاز به ترتیب برابر ۲/۶۴ و ۱۰۰ درصـد در غلظت‌های نهایی ۰/۶۲ و ۴۰ میلی‌لیتر عصاره گـزارش گردید. میزان مهار رشد برای غلظت‌های نهایی بالاتر از ۱/۲۵ میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل (فاقد عصاره) از نظر آماری معنادار گزارش گردید (P<۰/۰۵). بـدین‌ترتیـب میزان MIC_{50} و MFC عصاره آبی پیاز بـرای قـارچ ***مالاسزیا فورفور*** به ترتیب برابر ۱۰ و ۴۰ میلی‌لیتـر در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت گزارش شد (جدول ۱).

در مورد روغن پیاز، حداقل و حداکثر تحریک رشد قارچ به ترتیـب در غلظـت‌هـای نهـایی ۰/۰۵ و ۰/۶۰ میلی‌لیتر و برابـر ۱۸۹ و ۴۰۶ درصـد گـزارش گردیـد (جدول ۱). این تحریک رشد در تمـامی غلظـت‌هـای روغن پیاز از نظر آماری در مقایسـه بـا کنتـرل (فاقـد عصاره) معنادار گزارش شد (P<۰/۰۵)ژ

جدول ۱ تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز بر رشد و فعالیت آنزیم لیپاز خارج سلولی در *مالاسزیا فورفور* ایزوله ۱۳۲ در کشت‌های متحرک غوطه‌ور نگهداری شده به مدت ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد[a]

نوع عصاره	غلظت نهایی عصاره (بر حسب میلی‌لیتر)	وزن خشک توتال (بر حسب میلی‌گرم)	میزان مهار[b] یا تحریک[c] رشد قارچ (درصد)	فعالیت ویژه لیپاز خارج سلولی (درصد کنترل)
آبی	۰ (کنترل)	۸۰/۲۳±۹/۱۸	۰/۰۰[b]	۱۰۰[d]
	۰/۶۲	۷۸/۱۳±۴/۱۲	۲/۶۴	۷۸/۶۳
	۱/۲۵	۷۰/۱۱±۵/۹۰	۱۲/۶۱	۶۵/۶۴
	۲/۵	۶۵/۴۷±۶/۱۵	۱۸/۴۰	۵۹/۹۲
	۵	۶۰/۶۸±۶/۳۶	۲۴/۳۷	۴۰/۱۵
	۱۰	۳۰/۱۸±۵/۱۹	۶۲/۳۸	۳۶/۶۴
	۲۰	۲۰/۲۲±۴/۴۶	۷۴/۸۰	۳۲/۰۶
	۴۰	۰/۰۰	۱۰۰	–
روغن	۰ (کنترل)	۸۰/۲۳±۹/۱۸	۰/۰۰[c]	۱۰۰[d]
	۰/۰۵	۱۵۲/۱۱±۱۷/۵۱	۱۸۹/۵۹	۹۰/۳۲
	۰/۱۰	۲۴۲/۹۳±۱۹/۵۵	۳۰۲/۷۹	۸۰/۶۴
	۰/۱۵	۲۹۴/۳۱±۲۴/۸۲	۳۶۶/۸۳	۶۴/۵۲
	۰/۳۰	۳۱۶/۷۷±۲۵/۲۷	۳۹۴/۵۳	۵۹/۳۵
	۰/۶۰	۳۲۶/۴۰±۲۴/۹۳	۴۰۶/۸۰	۵۹/۲۸

a : نتایج مربوط به ۲ آزمایش هریک به صورت ۳ تایی است.

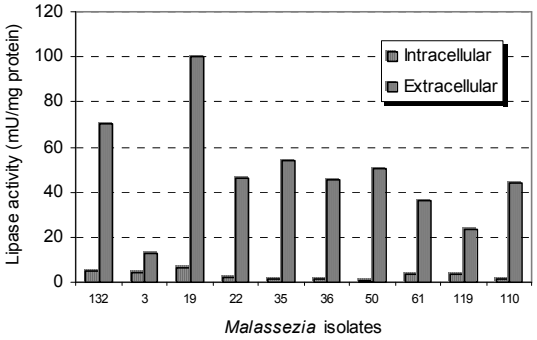
b : مهار رشد

c : تحریک رشد

d : ۱۰۰ درصد به معنای فعالیت ویژه لیپاز خارج سلولی برابر ۴۵/۱۸ و ۶۸/۲۷ میلی‌واحـد در میلـی‌گـرم پـروتئین بـه ترتیـب بـرای کنترل‌های مربوط به کشت‌های مجاور شده با عصاره آبی و روغن پیاز است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱ تولید اشکال داخل و خارج سلولی آنزیم لیپاز در محیط کشت چاپکس تغییر یافته مایع در شرایط بهینه در ایزوله‌های مختلف مالاسزیا

بررسی تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز بر فعالیت لیپاز خارج سلولی نشان داد که هر دو عصاره به‌طور معنادار قادر به مهار فعالیت آنزیم از طریق وابسته به غلظت هستند (جدول ۱). این مهار در مورد عصاره آبی در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با غلظت‌های مورد استفاده از روغن در سطح بالاتر گزارش گردید. حداکثر مهار فعالیت آنزیم لیپاز توسط عصاره آبی و روغن پیاز به ترتیب در غلظت‌های نهایی ۲۰ و ۰/۶ میلی‌لیتر برابر ۶۷/۹۴ و ۴۰/۷۲ درصد ثبت شد (جدول ۱). این مهار در رابطه با عصاره آبی و روغن به ترتیب در غلظت‌های نهایی بالاتر از ۰/۶۲ و ۰/۱۰ میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل (فاقد عصاره) از نظر آماری معنادار گزارش گردید ($P<0/05$).

بحث

نقش آنزیم لیپاز ***مالاسزیا*** در رشد قارچ و ایجاد پاسخ‌های التهابی، در بیماری‌هایی نظیر پیتریازیس ورسیکالر و درماتیت سبوره به اثبات رسیده است [۲۳]. با وجود این، گزارش‌هایی دال بر مقاومت دارویی قارچ مالاسزیا و عوارض قابل توجه داروهای ضدقارچی سنتتیک به‌ویژه در درمان‌های طویل المدت، توجه محققین را در به‌کارگیری عصاره‌های گیاهی طبیعی در درمان عفونت‌های میکروبی از جمله عفونت‌های قارچی از زمان‌های بسیار دور به خود جلب کرده است. در این خصوص نقش عصاره‌های گیاهان سیر و پیاز علیه برخی از انواع باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها به اثبات رسیده است [۱۷ــ۱۵]. مطالعات اخیر ما نشان داد که عصاره‌های آبی سیر و پیاز علاوه بر مهار رشد یک درماتوفیت به نام ***ترایکوفیتون متاگروفایتس***، قادر به مهار فعالیت آنزیمی به نام کراتیناز هستند که در رشد درماتوفیت‌ها و پاتوژنز عفونت‌های مربوط نقش غیرقابل انکاری دارد [۱۷]. همچنین حسن و محمود (Hasan & Mahmoud) [۲۵] نشان دادند که روغن پیاز قادر به مهار فعالیت آنزیم لیپاز در قارچ‌های ***آسپرژیلوس فلاووس*** و ***آسپرژیلوس پارازیتیکوس*** است. باتوجه به این موضوع، در تحقیق حاضر، تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز بر رشد قارچ ***مالاسزیا فورفور*** و فعالیت آنزیم لیپاز به‌عنوان یک آنزیم با اهمیت در رشد و پاتوژنز قارچ مورد بررسی قرار گرفت. غربالگری اولیه ایزوله‌ها و مالاسزیا فورفور در محیط کشت جامد نشان داد که تمامی ایزوله‌ها قادر به تولید لیپاز خارج سلولی هستند. تولید لیپاز توسط این ایزوله‌ها بدنبال کشت در شرایط بهینه تعیین شده در محیط مایع اختصاصی تأیید گردید. همانند نتایج غربالگری، تفاوت‌های قابل توجهی در تولید آنزیم لیپاز در میان ایزوله‌های مختلف ***مالاسزیا فورفور*** گزارش گردید و نشان داده شد که این آنزیم ترجیحاً یک آنزیم خارج سلولی است که در فاصله کوتاهی پس از تولید توسط قارچ به محیط اطراف ترشح می‌گردد. نتایج محققین مختلف در این رابطه نشان‌دهنده حضور اشکال مختلف داخل سلولی، وابسته به دیواره و خارج سلولی از آنزیم لیپاز در قارچ ***مالاسزیا*** است [۹، ۲۰و۲۴]. این‌طور به نظر می‌رسد که تولید آنزیم لیپاز در شرایط آزمایشگاهی علاوه‌بر نوع محیط کشت مورد استفاده، به استرین قارچ نیز وابسته

دوماهنامه علمی – پژوهشی دانشور پزشکی / دانشگاه شاهد / شهریور ۸۳ / سال یازدهم / شماره ۵۲

www.SID.ir

Archive of SID

است. ران و همکاران او [۹] در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که تولید آنزیم لیپاز با رشد ***مالاسزیا فورفور*** ارتباط مستقیم دارد. در تحقیق حاضر نشان داده شد که رشد ***مالاسزیا فورفور*** و تولید آنزیم لیپاز تنها در مرحله تصاعدی رشد قارچ (دوره زمانی ۲ تا ۶ روز) با هم مرتبط هستند. این‌طور به نظر می‌رسد که قارچ در مرحله رشد سریع جهت مصرف منابع لیپید موجود در محیط کشت و سنتز ترکیبات ساختاری، مقادیر قابل توجهی از آنزیم لیپاز را تولید و ترشح می‌کند و بدین‌ترتیب لیپیدهای محیط کشت را به اشکال ساده‌تر تبدیل کرده، قابل جذب می‌سازد. این احتمال وجود دارد که فرایند مذکور در شرایط *In vivo* نیز در سطح بدن موجودات زنده اتفاق بیفتد. در تحقیق حاضر، ارتباط معناداری بین تولید آنزیم در محیط‌های جامد و مایع مشاهده نگردید. همچنین علی‌رغم بالاتربودن فعالیت فرم خارج سلولی آنزیم در مقایسه با فرم داخل سلولی در تمامی ایزوله‌ها، نسبت این دو فرم به یکدیگر در میان ایزوله‌های تحت بررسی متغیر و غیروابسته به سطح فعالیت آنزیم گزارش گردید. این موضوع می‌تواند ناشی از متفاوت بودن اجزای تشکیل‌دهنده محیط‌های مذکور، شرایط متفاوت کشت و رفتار متفاوت قارچ در محیط کشت باشد. این مسأله در مطالعات قبلی نیز در مورد تولید آنزیم کراتیناز خارج سلولی توسط ***ترایکوفیتون منتاگروفایتس*** گزارش شده بود [۱۷].

نتایج به‌دست آمده از تأثیر عصاره آبی و روغن پیاز بر الگوی رشد و تولید لیپاز مالاسزیا فورفور نشان داد که عصاره آبی پیاز رشد قارچ را از طریق وابسته به غلظت مهار می‌سازد و این مهار در بالاترین مقدار عصاره به ۱۰۰ درصد می‌رسد. این در حالی است که روغن پیاز، رشد قارچ را بر خلاف عصاره آبی از طریق وابسته به غلظت تحریک کرد و این اثر تحریکی در مقادیر ۰/۶ میلی لیتر روغن به حداکثر (حدود ۴ برابر کنترل) رسید. گزارش‌های مختلف دال بر توانایی عصاره‌های آبی و روغن پیاز در مهار رشد برخی از قارچ‌ها نظیر ***آسپرژیلوس نیجر***، ***پسیلومایسس واریوتی***، ***ترایکوفیتون روبروم***، ***ترایکوفیتون منتاگروفایتس***، ***پنی‌سیلیوم کرایزوژنوم***، ***آلترناریا آلترناتا*** و ***اسکوپولاریوپسیس برویکالیس*** است [۲۶، ۱۷ـ۱۴]. این نتایج با نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی پیاز بر رشد ***مالاسزیا فورفور*** مطابقت دارد؛ در حالی که در مورد تحریک رشد ***مالاسزیا فورفور*** توسط روغن پیاز می‌توان این‌طور استنباط کرد که از آن‌جا که این قارچ برخلاف سایر قارچ‌ها یک مخمر چربی دوست است، احتمالاً از روغن پیاز به‌عنوان یک منبع تغذیه‌ای جهت رشد بهتر استفاده می‌کند. در تحقق حاضر، هر دو نوع عصاره آبی و روغن پیاز، فعالیت آنزیم لیپاز خارج سلولی را از طریق وابسته به غلظت مهار کردند و در این رابطه، تأثیر عصاره آبی در مقایسه با روغن پیاز در سطح بالاتر گزارش گردید. حداکثر مهار فعالیت آنزیم لیپاز توسط عصاره آبی و روغن پیاز به ترتیب در حدود ۷۰ و ۴۰ درصد در مقایسه با کنترل ثبت شد. باتوجه به نتایج به‌دست آمده چنین به نظر می‌رسد که تأثیر پیاز بر رشد و فعالیت آنزیم لیپاز در قارچ ***مالاسزیا فورفور*** با مکانیسم‌های متفاوتی صورت می‌گیرد که درک آن نیاز به انجام مطالعات بیش‌تر و دقیق‌تر دارد. این تحقیق، اولین گزارش در خصوص توانایی عصاره آبی پیاز در مهار رشد و مهار فعالیت لیپاز خارج سلولی در ***مالاسزیا فورفور*** است. نتایج تحقیق حاضر در مجموع نشان‌دهنده آن است که عصاره آبی پیاز را می‌توان به‌عنوان ماده موثر اصلی در تهیه داروهای ضد ***مالاسزیا*** و بالطبع درمان عفونت‌های ناشی از این قارچ در سطوح بالینی مورد استفاده قرار داد. همچنین عصاره‌های آبی و روغن پیاز می‌توانند به ترتیب به عنوان عوامل مهار کننده و محرک رشد ***مالاسزیا فورفور*** در بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

بیولوژی و فیزیولوژی این قارچ دارای اهمیت پزشکی مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

1. Midgley G, Gueho E, Guillot, J: Diseases caused by *Malassezia* species. In :Ajello, L, Hay R.J, editors. Topley and Wilson¨s Microbiology and Microbial Infections. Vol. 4: Medical Mycology. New York: Oxford University Press; 1998 .pp. 201-221.
2. Mayser P, Scheurer C, Papavassilis C, Grunder K: Hydrolase activity of 150 *Malassezia furfur* isolates of different clinical origin. Mycoses 1996; 39: 225-231.
3. Borgestrom B, Brockman HL: Lipases. Amsterdam: Elsevier Publishers: 1984.
4. Rapp P, Backhaus S: Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. Enzyme Microb Technol 1992; 14: 938-943.
5. Mushin TM, Aubaid AH, AL-Duboon AH: Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. Mycoses 1997; 40: 465-469.
6. Mancinati F, Rum A, Nardoni S, Corazza M: Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. Mycopathologia 2001; 149(3): 131-135.
7. Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS: Purification strategies for microbial lipases. J Microbiol Methods 2003; 52(1): 1-18.
8. Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP, Davidson S: Microbial lipases: production and applications. Sci Prog 1996; 79: 119-157.
9. Ran Y, Yoshiike T, Ogawa H: Lipase of *Malassezia furfur* : some properties and their relationship to cell growth. J Med Vet Mycol 1993; 31: 77-85.
10. Lorenz KJ, Kulp K: Handbook of Cereal Science and Technology. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. pp. 233-270.
11. Rasoamiaranjanahary L, Marston A, Guilet D, Schenk K, Randimbivololona F, Hostettmann K: Antifungal diterpenes from *Hypostes serpans* (Acanthaceae). Phytochemistry 2003; 62: 333-337.
12. Goun E, Cunningham G, Chu D, Nguyen C, Miles D: Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. Fitoterapia 2003; 76: 592-596.
13. Park EJ, Pezzuto JM: Botanicals in cancer chemoprevention. Cancer Metastasis Rev 2002; 21: 231-255.
14. Fan JJ, Chen JH: Inhibition of aflatoxin - producing fungi by Welsh onion extracts. J Food Prot 1999; 62: 414-417.
15. Elnima EI, Ahmed SA, Mekkawi AJ, Mossa JS: The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. Pharmazie 1983; 38: 747-748.
16. Zohri AN, Abdel - Gawad K, Saber S: Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion) *Allium cepa*) oil. Microbiol Res 1995; 150: 167-172.
17. Shams Ghahfarokhi M, Razafsha, M, Allameh A, Razzaghi Abyaneh M: Inhibitory effects of aqueous onion and garlic extracts on growth and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes* . Iran Biomed J 2003; 7: 113-118.
18. Shams M, Rasaee MJ, Moosavi M, Razzaghi M: Identification of *Malassezia* species in patients with pityreasis versicolor submitted to the Razi Hospital in Tehran. Iran Biomed J 2001; 5: 121-126.
19. Block E: The organosulfur chemistry of the genus *Allium* : Implication for the organic chemistry of sulfur. Angew Chem Int Ed Engl 1992; 31: 1135-1178.
20. Plotkin LI, Squiquera L, Mathov I, Galimberti R, Leoni J: Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur.* J Med Vet Mycol 1996; 34: 43-48.
21. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
22. Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD: Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystalization and preliminary X - ray diffraction data. J Bacterial 1991; 28: 4839-4841.
23. Parry ME, Sharpe GR: Seborrhoeic dermatitis is not caused by an altered immune response to *Malassezia* yeast. Br J Dermatol 1998; 139: 254-263.
24. Catterall MD, Ward ME, Jocobs R: A reappraisial of the role of *Pityrosporum orbiculare* in pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase. J Invest Dermatol 1978; 71: 398-401.
25. Hasan HAH, Mahmoud ALE: Inhibitory effect of spice oils on lipase and mycotoxin production. Zentralbl Microbiol 1993; 148: 543-548.
26. Bogy MM, Shanawany AA, Abdel - Mallek AY: Saprophytic and cycloheximide resistant fungi isolated from golden hamster. Acta Microbiol Immunol Hung 1998; 45: 195-207.

www.SID.ir