

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

شاهین ابراهیمیان*^۱، علی میکائیلی^۲، فریده زینی^۳، ساسان رضایی^۴، شهلا صفری^۵، علی ملکی^۶

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

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

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

(۴) مرکز تحقیقات سلامت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۵

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 مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ mg/L و قند مالتوز را در غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ mg/L 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 میسلیومی و اسپورها توسط لام نئوبار در محدوده شمارش گلبول های سفید مورد شمارش قرار گرفت، به نحوی که در هر ۵۰ میکرولیتری از سوسپانسیون قارچی حاوی ۱۰۰۰ قطعه از میسلیوم واسپور قارچ باشد. سپس در مرکز هر یک از غلظت های مختلف محیط های کشت، یک چاهک به قطرهای یکسان ایجاد گردید و به هریک از چاهک های ایجاد شده در وسط محیط های کشت و محیط کشت شاهد از هر دو گروه قند مالتوز و داروی مالتوفر، ۵۰ 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

پروتئینی فریتین و ترانسفرین می باشد که شکل ذخیره ای و انتقالی آهن است. در درون سلول، پروتئین آپوفرتین وجود دارد که در اثر ترکیب با آهن ایجاد فریتین می کند، (۴). آهن در بدن انسان دارای ساختارهای مولکولی مختلف مانند فریتین، هموگلوبین، میو گلوبین، ترانسفرین، هموسیدرین، ولاکتوفرین می باشد، (۵)، آهن در ساختمان ماده زنده جزء عناصر کمیاب است و سهم آن در ساختمان اورگانسیم معمولا کمتر از ۰/۰۱ درصد می باشد که به عنوان کو فاکتور آنزیم ها فعالیت می کند، (۶). 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، (۷، ۸، ۹). 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، (۱۰). سیدروفورهای قارچی نوعی هیدروکسامیک اسید هستند که موارد شناسایی شده سیدروفورهای هیدروکسامات عبارتند از:

1. Ferrichroms
2. Fusarinines
3. Coprogens
4. 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 سیدروفور عمل می کنند، بلکه به عنوان ترکیب ذخیره کننده آهن نیز وارد عمل می شوند، (۱۱، ۱۲). تاکنون مکانیسم جذب و اثر آهن بر روی قارچ های کریپتوکوکوس نئوفورمنس، کاندیدا آلبیکنس، ژئوتریکوم کاندیدوم، هیستوپلاسما کپسولاتوم، تریاکوفایتون منتاگروفایتس، رایزوپوس اوریزا، ساکارومیسیس سروسیسه و پاراکوکسیدیوئیدس برازیلینسیس به عمل آمده است، (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). 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 مہاری خواهد داشت، (۱۹). در این تحقیق، ما اثرات داروی مالتوفر و قند مالتوز بر روی چهار درماتوفیت تریاکوفایتون روبروم، میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسیئوم، و اپیدرموفایتون فلوکوزوم را

درماتوفیت ها گروهی از قارچ ها هستند که دارای سه جنس تریاکوفایتون، میکروسپوروم و اپیدرموفایتون می باشند این قارچ ها توانایی کلنیزه شدن در پوست و ضمام آن را دارند، (۱). 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، (۲). 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 جیسیئوم به عنوان نماینده میکروسپوروم ها و خاک دوستان، اپیدرموفایتون فلوکوزوم به عنوان نماینده اپیدرموفایتون ها و انسان دوستان، تریاکوفایتون روبروم به عنوان نماینده تریاکوفایتون ها و انسان دوستان، و میکروسپوروم کانیس به عنوان نماینده میکروسپوروم ها و حیوان دوستان انتخاب گردیدند. (۲)

بیمارانی که عفونت درماتوفیتی دارند تحت درمان های مختلف دارویی قرار می گیرند که از این داروهای ضد قارچی، گروه آزول موثرترین ولی پر هزینه ترین داروها هستند، البته گریزوفولین بهترین دارو از نظر اثر و فقدان عوارض جانبی است که ممکن است در آینده نزدیک جای خود را به تربینافین بدهد، (۳). بنا بر 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 ها می باشد، این قند نیز در چرخه های مختلف زیستی سلول های قارچی اثر به سزایی دارد.

آهن دارای نقش فیزیولوژیکی در تنفس سلولی است، 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

ابتدا ۲ 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 ۵۰ سی سی رسید، مجدداً با آب مقطر حجم را به ۵۰ سی سی رسانده و سپس توسط دستگاه اتمیک ایزوریشن که بر اساس جذب اتمی کار می کند میزان آهن را اندازه گیری نموده که میزان آن بسیار ناچیز اعلام شد. (۲۰،۲۱،۲۲)

ج) محیط سازی اختصاصی:

در این بررسی، غلظت های مختلف مالتوفر و قند مالتوز به محیط کشت سابرو دکستروزاگار حاوی سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل (S.C.C) اضافه گردید که غلظت های مختلف مورد نظر در بررسی های اولیه به ترتیب: ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۵۰ 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، (۳،۲،۱). داروی مالتوفر حاوی آهن می باشد که دارای شکل سه ظرفیتی آهن در حجم ۲ سی سی و حاوی ۱۰۰ میلیگرم آهن در هر آمپول هستند. بنابراین، به علت اینکه محیط های کشت اختصاصی در حجم ۲۰۰ سی سی ساخته شدند، نیاز به محاسبه جهت ساخت این حجم دارد که از پودر سابرو دکستروزاگار به وزن ۱۳ گرم و سفتریاکسون که به جای کلرامفنیکل استفاده گردید به حجم ۴۰۰ میکرولیتر و ۲ سی سی از محلول استون حاوی ۵۰۰ میلی گرم سیکلوهگزامید در ۱۰ سی سی استون استفاده شد. ابتدا پودر سابرو دکستروزاگار 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 آن به حدود ۳۷ درجه سانتیگراد برسد، سپس محلول شفاف سفتریاکسون به آن افزوده و کاملاً 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 کاملاً مخلوط شد و قبل از ژله شدن محیط کشت، آن را در پلیت ها با حجم یکسان تقسیم نمودیم. (۳،۲،۱)

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 و روش 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 ۵ گرم از محیط کشت سابرو دکستروزاگار (S) را در ۷۷ سی سی آب مقطر حل کرده سپس ۵۰ سی سی از نمونه حاصله را در بشری جداگانه ریخته و به آن ۵ سی سی اسید نیتریک غلیظ افزوده می گردد، سپس یک شیشه ساعت را بر روی در بشر قرار داده و بر روی هیتر گذاشته تا حجم نمونه به حدود ۱۵ سی سی تقلیل یابد. بعد از آن، مجدداً ۵ سی سی اسید نیتریک غلیظ به آن افزوده و می جوشانیم، و ۵ سی سی دیگر اسید نیتریک غلیظ افزوده و دومرتبه می جوشانیم تا محیط کشت کاملاً 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 ۵۰ سی سی می رسانیم تا توسط دستگاه اتمیک ایزوریشن مقدار آهن مربوطه را اندازه گیری نماییم، به نحوی که ابتدا دستگاه را روی طول موج ۲۴۸/۶ 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 سابرو دکستروزاگار (S)، ۰/۰۱۷۶ میلی گرم آهن وجود دارد که پس از محاسبه با یک تناسب مشخص گردید در ۶۵ گرم پودر سابرو دکستروزاگار (S) که در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر حل می گردد معادل ۱/۱۴۴ 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. (۲۲،۲۱،۲۰)

ب) اندازه گیری آهن در آب مقطر:

نحوه محاسبه حجم مالتوفر مورد نیاز در غلظت‌های مختلف :

۱۰۰۰ سی سی محیط کشت ۱۰۰۰ میکرولیتر مالتوفر : غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر

۲۰۰ سی سی محیط کشت X = ۲۰۰ میکرولیتر مالتوفر

میکرولیتر در چهار خانه می باشد، می توان تعداد قطعات میسیلیومی و اسپوری موجود در ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون تلقیحی را محاسبه کرد. در این تحقیق مقرر گردید ۱۰۰۰ قطعه قارچی به هر یک از محیط های کشت تلقیح گردد، به طوری که بر روی لام نئوبار ۸ قطعه قارچی مورد شمارش قرارگیرد تا در هر ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون تلقیحی ۱۰۰۰ قطعه قارچی موجود باشد. (۳)

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 ۵۰ میکرولیتر از آن را در حفره تلقیح می نماییم. ما جهت ایجاد دقت در هر مرحله برای هریک از غلظت 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. (۳، ۲، ۱)

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:

$3/14 \times$ نصف قطر کوچک \times نصف قطر بزرگ = مساحت

جهت غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آهن به ترتیب ۴۰ و ۸۰ میکرولیتر مالتوفر و جهت غلظت های ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم در لیتر آهن به ترتیب ۲، ۴، ۸ سی سی مالتوفر استفاده شد. هم چنین، جهت ساخت محیط های کشت حاوی قند مالتوز نیز به غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر نیز مشابه روش فوق محاسبات لازم جهت برداشت پودر سابرو دکستروزاگار، سیکلو هگزامید، سفتریاکسون و قند مالتوز به عمل آمد و همانند پروتکل فوق اقدام به ساخت محیط های کشت حاوی قند مالتوز نمودیم. (۳، ۲، ۱)

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 ۲ 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. (۱، ۲)

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 قرار گرفته بر روی لام نئوبار در قسمت شمارش گلبول های سفید که معادل ۱/۱۰ میکرولیتر در هر خانه و در نهایت ۴/۱۰

که نتایج حاصله در جداول و نمودار زیر نشان داده شده است.

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

۲۰۰۰ mg/l	۱۵۰۰ mg/l	۱۰۰۰ mg/l	۵۰۰ mg/l	۲۰۰ mg/l	۱۰۰ mg/l	۵۰ mg/l	شاهد	غلظت مالتوفر بر حسب mg/l نام قارچ
۱۴/۸۵	۱۴/۸۵	۱۶/۵۳	۱۰/۱	۸	۸/۶	۷/۶	۶/۸۴	ترایکوفایتون روبروم
۱۸/۹۱	۱۸/۶	۱۵/۶۸	۱۵/۶۸	۹/۶۷	۱۱/۵۲	۱۳/۲۶	۱۳/۵	میکروسپوروم جیپسئوم
۲۸/۸۷	۲۸/۸۷	۲۹/۶۴	۳۴/۴۶	۳۴	۳۳/۳	۲۳/۴	۲۳	میکروسپوروم کانیس
۶/۳	۶/۸۴	۶/۱۲	۵/۱۱	۷/۷۲	۱۱/۲۵	۱۲/۵	۴/۲	اپیدرموفایتون فلوکوزوم

اختلاف بین گروه‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار می باشد. (p-value=0.000)

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

۲۰۰۰ mg/l	۱۰۰۰ mg/l	۵۰۰ mg/l	شاهد	غلظت مالتوز بر حسب mg/l نام قارچ
۱/۴۴	۱/۲۷	۱/۲	۰/۹۸	ترایکوفایتون روبروم
۴/۶۴	۴/۵	۳/۸۷	۳/۷۸	میکروسپوروم جیپسئوم
۲/۳۱	۲/۳۱	۲/۳	۲/۲۱	میکروسپوروم کانیس
۲	۱/۳۵	۱/۳۵	۰/۵۵	اپیدرموفایتون فلوکوزوم

اختلاف بین گروه‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار می باشد. (p-value=0.000)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
week2	Between Groups	2240.226	3	746.742	55.410	.000
	Within Groups	377.349	28	13.477		
	Total	2617.575	31			
week1	Between Groups	60.233	3	20.078	11.148	.000
	Within Groups	50.430	28	1.801		
	Total	110.663	31			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons							
Tukey HSD							
Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
week2	T.rubrum	M.gypseum	-3.68125	1.83553	.210	-8.6928	1.3303
		M.canis	-18.52125*	1.83553	.000	-23.5328	-13.5097
		E.floccosum	3.41625	1.83553	.267	-1.5953	8.4278
	M.gypseum	T.rubrum	3.68125	1.83553	.210	-1.3303	8.6928
		M.canis	-14.84000*	1.83553	.000	-19.8516	-9.8284
		E.floccosum	7.09750*	1.83553	.003	2.0859	12.1091
	M.canis	T.rubrum	18.52125*	1.83553	.000	13.5097	23.5328
		M.gypseum	14.84000*	1.83553	.000	9.8284	19.8516
		E.floccosum	21.93750*	1.83553	.000	16.9259	26.9491
	E.floccosum	T.rubrum	-3.41625	1.83553	.267	-8.4278	1.5953
		M.gypseum	-7.09750*	1.83553	.003	-12.1091	-2.0859
		M.canis	-21.93750*	1.83553	.000	-26.9491	-16.9259
week1	T.rubrum	M.gypseum	-1.82750	.67102	.051	-3.6596	.0046
		M.canis	-2.25875*	.67102	.011	-4.0908	-.4267
		E.floccosum	1.12875	.67102	.352	-.7033	2.9608
	M.gypseum	T.rubrum	1.82750	.67102	.051	-.0046	3.6596
		M.canis	-.43125	.67102	.917	-2.2633	1.4008
		E.floccosum	2.95625*	.67102	.001	1.1242	4.7883
	M.canis	T.rubrum	2.25875*	.67102	.011	.4267	4.0908
		M.gypseum	.43125	.67102	.917	-1.4008	2.2633
		E.floccosum	3.38750*	.67102	.000	1.5554	5.2196
	E.floccosum	T.rubrum	-1.12875	.67102	.352	-2.9608	.7033
		M.gypseum	-2.95625*	.67102	.001	-4.7883	-1.1242
		M.canis	-3.38750*	.67102	.000	-5.2196	-1.5554

*The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

week2				
Tukey HSD				
group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
E.floccosum	8	7.5050		
T.rubrum	8	10.9212	10.9212	
M.gypseum	8		14.6025	
M.canis	8			29.4425
Sig.		.267	.210	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

مساحت رشد کلنی قارچها در مجاورت مالتوز آگار پس از یک هفته

۲۰۰۰ mg/l	۱۰۰۰ mg/l	۵۰۰ mg/l	شاهد	غلظت مالتوز بر حسب mg/l	نام قارچ
۱/۴۴	۱/۲۷	۱/۲	۰/۹۸		ترایکوفایتون روبروم
۴/۶۴	۴/۵	۳/۸۷	۳/۷۸		میکروسپوروم جیپسوم
۲/۳۱	۲/۳۱	۲/۳	۲/۲۱		میکروسپوروم کانیس
۲	۱/۳۵	۱/۳۵	۰/۵۵		اپیدرموفایتون فلوکوزوم

اختلاف بین گروه ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار می باشد (p-value=0.000)

همان طور که در نمودارها مشاهده می گردد این افزایش رشد در مقایسه با نمونه های رشد یافته در مجاورت مالتوز کمتر رشد و نمو پیدا کرده اند.

از جدول فوق مشاهده می گردد هر چهار گونه قارچی در مجاورت قند مالتوز افزایش رشد نشان داده و این تحریک رشد با زیاد شدن قند افزایش می یابد. اما

ANOVA					
Maltose					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.565	3	7.522	49.959	.000
Within Groups	1.807	12	.151		
Total	24.372	15			

Post Hoc Tests

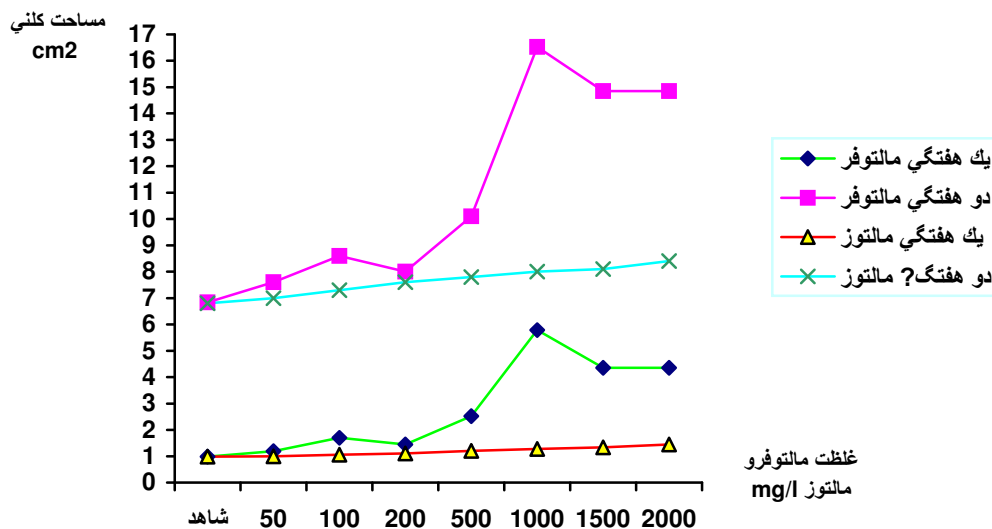
Multiple Comparisons						
Maltose						
Tukey HSD						
(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T.rubrum	M.gypseum	-2.95250*	.27437	.000	-3.7671	-2.1379
	M.canis	-1.06000*	.27437	.010	-1.8746	-.2454
	E.floccosum	-.09000	.27437	.987	-.9046	.7246
M.gypseum	T.rubrum	2.95250*	.27437	.000	2.1379	3.7671
	M.canis	1.89250*	.27437	.000	1.0779	2.7071
	E.floccosum	2.86250*	.27437	.000	2.0479	3.6771
M.canis	T.rubrum	1.06000*	.27437	.010	.2454	1.8746
	M.gypseum	-1.89250*	.27437	.000	-2.7071	-1.0779
	E.floccosum	.97000*	.27437	.019	.1554	1.7846
E.floccosum	T.rubrum	.09000	.27437	.987	-.7246	.9046
	M.gypseum	-2.86250*	.27437	.000	-3.6771	-2.0479
	M.canis	-.97000*	.27437	.019	-1.7846	-.1554

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Maltose				
Tukey HSD				
group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
T.rubrum	4	1.2225		
E.floccosum	4	1.3125		
M.canis	4		2.2825	
M.gypseum	4			4.1750
Sig.		.987	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



نمودار مقایسه رشد کلنی ترایکوفایتون روبروم در دو محیط مالتوز آگار و مالتوفرو آگار در ۱ و ۲ هفتگی

می نمایند. داروی مالتوفرو 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 رشد 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، میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و اپیدرموفایتون فلوکوزوم بر اثر افزایش غلظت مالتوفرو نسبت به نمونه شاهد می باشد، به نحوی که بیشترین رشد قارچ ترایکوفایتون روبروم در یک و دو هفتگی در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفرو بوده، در حالی که کمترین میزان رشد این قارچ در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفرو در مقایسه با نمونه شاهد بود. میکروسپوروم جیپسئوم در غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر مالتوفرو بیشترین رشد را در یک هفتگی از خود نشان داد، در صورتی که کمترین رشد کلنی آن در مدت مذکور در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفرو صورت گرفت. حال آن که، پس از دو هفته، این درماتوفیت در غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفرو به حداکثر رشد رسید و کمترین میزان رشد آن در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفرو بروز کرد. میکروسپوروم کانیس نیز در طول هفته اول بیشترین رشد را در غلظت ۱۰۰۰

در آنالیز آماری به عمل آمده، مشخص گردید که اختلاف بین مساحت رشد کلنی ها در ۴ گونه قارچ مورد بررسی با داروی مالتوفرو 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.

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 مالتوفرو 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 مالتوفرو رشد بیشتر و در غلظت های مختلف گستردگی نامنظم تری از خود نشان دادند، در حالی که رشد کلیه قارچ ها در محیط 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 جزء مواد مغذی برای قارچ ها محسوب می گردد، با افزایش میزان غلظت آن رشد قارچ ها نیز افزایش یافته، اما این افزایش رشد سیر صعودی زیادی نداشت، بنابراین، می توان گفت قارچ های درماتوفیت تنها به میزان مورد نیاز جهت مصرف خود اقدام به جذب قند مالتوز

قارچ ها توکسیک بوده و این موضوع اجتناب ناپذیر است، در صورتی که، در این تحقیق داروی مالتوفر که حاوی آهن است تا غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر نیز اثر کاهنده بر رشد درماتوفیت های مختلف نداشت. (۲۳) سـرـای اس کی و همکاران در سال ۲۰۰۲ اشاره ای به عبور آهن به شکل ۲ 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. (۲۴)

مراهیل و میتکه در سال ۲۰۰۷ مطالعات جالب توجه ای جهت تشخیص و درمان 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 بر این 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. (۲۵)

سپاس گذاری

عکس بررداری 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

1-Khosravi A. [Medical mycology(a practical approach)].Tehran University, Jahad e Daneshgahi Pub 2000.p.30-6.(Persian)
2-Zaini F,Mehbod A, Emami M. [Comperhnsive medical mycology].1st ed. Tehran University Pub 1999.P.85. (Persian)

میلی گرم در لیتر مالتوفر داشته و کمترین میزان رشد در غلظت ۲۰۰ 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 ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آهن بالاترین نرخ رشد و در غلظت ۲۰۰۰ و ۱۵۰۰ 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 ۲۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفر بود و کمترین رشد آن در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفر در قیاس با نمونه شاهد از خود بروز داد، ولی در طول هفته دوم، در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر مالتوفر به حداکثر رشد خود رسید و در غلظت ۵۰۰ 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 ۴ 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 بر روی 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 ۲۰۰۸ 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

3-Topley & Wilson's. Microbiology and microbial infections. vol 4. A jello L, J hay R. Medical mycology, the dermatophytes. 9th ed. Arnold, London, Oxford University Press 1998.P. 216-7, 219, 227-8.

4-Shahbazi P, Maleknia N. [General biochemistry], 19th ed. Vol 2. Tehran University Pub 2001. (Persian)

- 5-Rahimi J.[The effect of Iron on with or whitout capsule Cryptococcus neoformans]. School of Hearth & Research, Tehran University. Thesis No: 2091-1372. (Persian)
- 6-Norzad G.[Cellular and molecular biology], 3rd ed. Mashhad; Mashhad Jahad e Daneshgahi Pub 1993.P.39-40. (Persian)
- 7-Lieu P, Heiskala T, Marjar. The roles in health and disease, molecular aspects of medicine. Microbiology J 2001; 22 81-7.
- 8-Schumann. K, Moret, M. Iron regulatory protein as an endogenous sensor of iron in rat intestinal mucosa, European j biochem 1999; 260: 362-72.
- 9-Andrews NC, Fleming MD, Gunshin H. Iron transport across biologic membrances. Nutr Rev 1999; 57: 114-23.
- 10-Byers B. R. Microbial iron transport: Iron acquisition by pathogenic microorganisms. Metal Ions Biol. Syst 1998; 35: 37-66.
- 11-D H Jennings. The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press 1995.p. 367-72.
- 12-Joy IW, john HI. Comparative nutrition of Iron and copper. Annu Rev Nutr 1997; 17: 501-26.
- 13-Danieal J K. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. Molecular Microbiology 2003; 47 (5): 1185-97.
- 14-Dexter H. Howard. Acquisition, transport, and storage of Iron by pathogenic fungi. Clinical Microbiology Reviews. 1999.p. 394-404.
- 15-D H Jennings, G lysek. Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. BIOS Scientific Publishers 1999.p. 61-3.
- 16-Julian c, Rutherford & Amanda, J Bird. Metal-responsive transcription factors that regulate Iron,zinc,and copper homestasis in Eukaryotic cells. Eukaryotic Cell 2004.p.1-13.
- 17-Morrissey J A, P H Williams, A M Cashmore. Candida albicans has a cell-associated ferric reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. Microbiology 1996; 142: 485-92.
- 18-Richard F, Hassett, Annette M, Romeo, Daniel J, Kosman. Regulation of high affinity Iron uptake in the yeast saccharomyces cerevisiae. J Biological Chemistry, 1998; 273(13): 7628-36.
- 19-Artis Wm,Wade TR,Jones HE. Restorvation T. mentagrophytes growth in medium depleted metals by chelation: importance of iron. Sabouraudia 1983. P. 41-8.
- 20-Olof P M, Hauz Kh. How to Measure Total Iron. Technical Assistance Hydrology Project. New Delhi, September 2000.
- 21-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/600/R-98/128, September 1998.
- 22-Gladis Z, Xiufu Sh. Management of Iron in irrigation water. Fact Sheet FS516. Published, December 2005.
- 23-Johnson L. Iron and siderophores in fungal-host interactions. Mycol Res. 2008; 112(2):170-83. Epub 2007 Dec 14.
- 24-Srai SK, Bomford A, McArdle HJ. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. Best Pract Res Clin Haematol 2002; 15(2):243-59.
- 25-Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol Mol Biol Rev. 2007; 71(3):413-51.

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

Ebrahimian Sh^{1*}, Mikaeili A², Zeini F³, Rezaei S³, Safari Sh⁴, Maleki A⁴

(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 floccosom* from human *Epidermophyton*s, *Trichophyton rubrum* from human *Trichophyton*s 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 50,100, 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 μ L 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 μ L 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 Research Center, Health School, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran