مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و نهم (۱۳۸۲) شماره ۲ (۳۴۲-۳۲۷)

بررسی تأثیرات طیف نوری UVB برروی قارچهای درماتوفیت

پیام بهزادی[۱]- ساسان رضایی[۲]- محمدرضا خرمی‌زاده[۳]- الهام بهزادی[۴] - مسعود امامی[۲]

۱- بخش میکروبیولوژی - دانشکده علوم‌پایه- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شمال عضو باشگاه پژوهشگران جوان.

۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی‌پزشکی دانشکده‌بهداشت دانشگاه علوم‌پزشکی‌تهران.

۳- گروه پاتوبیولوژی دانشکده‌بهداشت دانشگاه علوم‌پزشکی‌تهران.

۴- دانشجوی کارشناسی‌ارشد رشته‌میکروبیولوژی-دانشکده‌علوم‌پایه- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات عضو باشگاه پژوهشگران جوان.

(دریافت: ۸۱/۴/۲۲ ؛ پذیرش:۸۱/۱۲/۱۹)

چکیده

در بررسی حاضر، سعی بر آن شده است تا تغییرات مورفولوژیکی ناشی از اثرات اشعه UV برروی چهار گونه از قارچهای درماتوفیت (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes,* *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum canis*) مطالعه، و نتایج بدست‌آمده از این بررسی، با روش مولکولی تا حد ممکن تجزیه و تحلیل گردد. برای تعیین تغییرات احتمالی مولکولی ناشی از تابش اشعه UV در درماتوفیت‌ها (مانند آپوپتوزیز)، مولکول‌های DNA سوش شاهد و اشعه دیده *Trichophyton rubrum* استخراج گردیده و با استفاده از روش الکتروفورز برروی ژل آگارز، مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتیجه بدست‌آمده از این مطالعه، نشان می‌دهد که رشد کلنی‌های اشعه‌دیده دچار وقفه گردیده و با افزایش زمان اشعه‌دهی، میزان رشد سوش‌های مورد مطالعه کاهش می‌یابد. بعلاوه، تغییرات ایجاد شده درشکل کلنی‌ها و پیگمانتاسیون برخی از سوش‌ها، کاملاً مشهود بود. همچنین در مطالعات میکروسکوپی سوش‌های اشعه‌دیده، تغییراتی درشکل میسلیوم‌ها، شکل و اندازه ماکروکنیدی‌ها و تراکم ماکروکنیدی‌ها و میکروکنیدی‌ها دیده‌شد. در بررسیهای به عمل آمده برروی مولکول های DNA جدا شده از سوش‌های شاهد و اشعه دیده *Trichophyton rubrum*، هیچ نشانه‌ای از آپوپتوزیز در مولکول‌های DNA آنها مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: *اشعه UVB، قارچهای درماتوفیت، میکروکنیدی، ماکروکنیدی، DNA، آپوپتوزیز.*

مقدمه

اشعه ماوراء بنفش به عنوان یک عامل جهش زا، نقش مهمی را در ایجاد موتاسیون و جهش در موجودات زنده از خود ایفا می نماید (آل‌محمد و رحمانی، ۱۳۷۸). درسال۱۸۰۷ میلادی اشعه UV کشف شد (Berger, 1994). این‌اشعه از سه طیف نوری UVA,UVB وUVC تشکیل‌شده و طیف UVB بیشترین اثر تخریبی را برروی موجودات زنده داراست؛ که علت این امر، حداکثر جذب این طیف از اشعه بوسیله مولکولهای DNA ارگانیزم‌هاست.

اشعه ماوراء بنفش به طور طبیعی در نور خورشید وجود داشته و از آنجائیکه یک عامل جهش زای طبیعی بشمار می‌رود مطالعات زیادی در زمینه تأثیرات طول موجهای مختلف این اشعه برروی میکروارگانیزم های متفاوت انجام پذیرفته است. با وجود این، مطالعات زیادی در مورد اثرات اشعه ماوراء بنفش برروی قارچهای پاتوژن و بویژه درماتوفیت‌ها صورت نگرفته است. درماتوفیت‌ها دسته‌ای از قارچهای کراتین دوست هستند که قادر به ایجاد عفونت درپوست و ضمائم کراتین‌دار آن می‌باشند. درماتوفیت‌ها ازجمله قارچهای بیماریزایی هستند که عفونتهایی را تحت عنوان Tinea ایجاد نموده و می‌توانند تا ۱۵ ماه در محیط، زنده بمانند (بهزادی و بهزادی، ۱۳۸۱). درمطالعه حاضر، با استفاده از یک روش مشخص و مدون (بهزادی، ۱۳۸۱) اثرات اشعه ماوراء بنفش برروی چهار قارچ شاخص از قارچهای درماتوفیت بررسی گردیده است. سوش‌های مورد مطالعه عبارتند از *Microsporum canis*، *Epidermophyton floccosum*، *Trichophyton rubrum* و *Trichophyton mentagrophytes* که از بیماران مراجعه‌کننده به بخش قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت، انسیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا شده و جهت بررسی در این مطالعه انتخاب گردیدند.

با توجه به مطالعات انجام شده در دنیا، در این مطالعه نیز سعی بر آن شده است تا زمانهای خاصی را جهت پرتودهی سوش‌های قارچی انتخاب نموده و اثرات پرتودهی در زمانهای مختلف، از نظر میکروسکوپی، ماکروسکوپی و وزنی تعیین گردیده و همچنین به کمک روش مولکولی کلاسیک و با استفاده از ژل آگارز، تغییرات احتمالی ناشی از اشعه دهی در مولکول‌های DNA (آپوپتوزیز)، بررسی و تجزیه و تحلیل گردد (Rickwood *et al.,* 1995).

روشها

نمونه‌برداری از بیماران مراجعه کننده که مشکوک به بیماریهای قارچی جلدی بودند، در واحد قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت؛ نمونه‌ها را در محیط‌های سابورو دکستروز آگار و سابورو دکستروز آگار حاوی سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل

کشت داده و در حرارت آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از رشد کلنی‌ها درمحیط‌های فوق، ازگونه‌های *Microsporum canis* ، *Epidermophyton floccosum*، *Trichophyton rubrum* و *Trichophyton mentagrophytes* که با روشهای موجود در آزمایشگاه تشخیص داده‌شده بودند در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تهیه محیط‌های کشت در این بررسی، پلیت‌ها و اسلایدکالچرهای تهیه شده از سوش‌های قارچی مورد مطالعه، کدگذاری گردیدند.

به هر یک از سوش‌های قارچی مورد مطالعه چهار پلیت حاوی سابورو دکستروز براث، دو پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار، دو پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار محتوی سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل اختصاص داده شد و از هر یک از درماتوفیت‌های مورد بررسی، دو اسلایدکالچر نیز به عمل آمد. از چهار پلیت حاوی سابورو دکستروز براث برای هر سوش قارچی، یکی به عنوان پلیت کنترل و سه پلیت دیگر، بترتیب ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه اشعه‌دهی شدند. همچنین از دو پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار، دو پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار محتوی سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل، و دو پلیت اسلایدکالچر تهیه شده از هر درماتوفیت، یکی به عنوان کنترل و دیگری ۱۰ دقیقه اشعه‌دهی گردید.

برای کشت سوش‌های قارچی، ابتدا در زیر هود به کمک پیپت ۱۰ میلی‌لیتر محیط سابورو دکستروز براث استریل بدرون هرکدام از پلیت‌های استریل که دارای قطری برابر ۷/۵ سانتیمتر بودند اضافه گردیده و به هر سوش قارچی چهار پلیت تخصیص داده شد. پس از کدگذاری پلیت‌ها، با استفاده از پانچ، مقادیر مساوی از سوش‌های قارچی به پلیت‌ها اضافه گردید. همچنین همانطور که قبلاً به آن اشاره شد، به هر یک از درماتوفیت‌های مورد بررسی دو پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار و دو پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار محتوی سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل نیز اختصاص داده شد که سوش‌های قارچی در این محیط‌ها با استفاده از پانچ به اندازه مساوی و به صورت نقطه ای در مرکز محیط‌های فوق کشت گردیدند. کلیه مراحل انجام شده در زیر هود و درکنار شعله انجام گرفت تا از هر گونه آلودگی احتمالی جلوگیری به عمل آید. پس از انجام کار، محیط‌های فوق در دمای معمولی آزمایشگاه نگهداری شدند. محیط‌های سابورو دکستروز آگار و سابورو دکستروز آگار محتوی سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل حاوی سوش‌های قارچی مورد مطالعه بعد از گذشت ۷ روز از زمان کشت و به مدت ۱۰ دقیقه (بجز نمونه‌های کنترل) و محیط‌های سابورو دکستروز براث حاوی درماتوفیت‌های کشت داده شده، بعد از گذشت ۱۰ روز از زمان کشت، بترتیب به مدت ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه (بجز نمونه‌های کنترل) بوسیله دستگاه Trans illuminator با طول موج ۳۰۲ نانومتر و در فاصله ۸ سانتیمتری از منبع تولید اشعه، پرتودهی شدند.

علاوه بر موارد فوق، از هر یک از سوش‌های قارچی مورد مطالعه دو اسلایدکالچر نیز تهیه گردید و بعد از ۷ روز نگهداری در دمای معمولی آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه (بجز نمونه‌های کنترل) با اشعه ماوراء بنفش با طول موج ۳۰۲ نانومتر در فاصله ۸ سانتیمتری از منبع تولید کننده اشعه، پرتودهی گردیدند. لازم به ذکر است که در زمان اشعه‌دهی، درب پلیت‌ها برداشته شده بود تا اشعه، جذب قارچ گردد و همچنین اسلاید کالچرها بدون لامل بودند. اما بعد از اشعه‌دهی، درب پلیت‌ها گذاشته شد و برروی اسلایدکالچرها نیز لامل قرارداده شد. درهمه حالات، بعد از پرتودهی، پلیت‌ها و اسلایدکالچرها (بجز پلیت‌ها و اسلایدکالچرهای کنترل) در تاریکی مطلق و در دمای معمولی آزمایشگاه نگهداری شدند تا با کمک واکنش ترمیمی فتورآکتیواسیون، آسیبهای احتمالی وارد شده ترمیم پیدا نکنند. نکته دیگر اینکه در زمان پرتودهی سوش‌های قارچی، اطاق کاملا تاریک بود تا خللی در شدت اشعه ایجاد نگردد. منبع تولید کننده اشعه نیز جدید و دارای حداکثر انرژی تابشی و حداقل انرژی گرمایی بود.

در قسمت دیگری از این تحقیق، مجددا با استفاده از پانچ، هر یک از سوش‌های قارچی از پلیت شاهد برداشت گردیده و به همان صورت اولیه، در چهار پلیت حاوی سابورو دکستروز براث کشت داده شده و به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا بخوبی رشد نمایند. سپس کلنی‌ها با ترازوی دقیق توزین شدند. مقادیر بدست آمده از توزین هر چهار پلیت یکسان بود. سپس درمورد هرگونه قارچی، از چهار پلیت، یکی به عنوان شاهد و سه پلیت دیگر به‌ترتیب ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه اشعه‌دهی شدند. پلیت‌های اشعه داده شده در مورد هر گونه قارچی در تاریکی، به مدت دو هفته نگهداری گردیدند. تمامی پلیت‌های مربوط به یک سوش قارچی در هفته‌های اول و دوم بعد از اشعه‌دهی، توزین شده و مقادیر بدست آمده یادداشت و نتایج به صورت نمودار ترسیم گردیدند.

همچنین دراین مطالعه، تغییرات ژنتیکی احتمالی ناشی از اشعه ماوراء بنفش (آپوپتوزیز) با استفاده از روش کلاسیک مولکولی بصورت تشکیل باندهای DNA برروی ژل آگارز و مقایسه نمونه‌های اشعه‌دیده با شاهد، مورد بررسی قرار گرفت (Rickwood *et al.,* 1995). از آنجائیکه، در اکثر موارد، عامل ایجاد کننده بیماریهای درماتوفیتوزیس مزمن، *Trichophyton rubrum* می‌باشد، بنابراین در بررسی مولکولی از این قارچ به عنوان الگویی از پاتوژن‌های درماتوفیتی استفاده گردید. با استفاده از پانچ مقدار مساوی از *Trichophyton rubrum* شاهد را برداشته و در چهار پلیت حاوی محیط سابورو دکستروز براث کشت داده و در دمای معمولی آزمایشگاه قرار داده و بعد از گذشت یک هفته که کلنی‌های قارچی به اندازه مناسب رشد نمودند، یکی از پلیت‌ها به عنوان شاهد و سه پلیت دیگر به مدت ۱۰ دقیقه با طول موج ۳۰۲ نانومتر و در

فاصله ۸ سانتیمتری ازمنبع، اشعه‌دهی گردیده و بترتیب پس‌از ۱،۲۴ و۷۲ ساعت انکوباسیون دراطاق تاریک و دردمای معمولی آزمایشگاه، میسلیوم‌های‌آنها بهمراه میسلیوم‌های پلیت شاهد، جمع‌آوری و پس‌از شستشو در(1XPBS(Phosphate-Buffered Saline استریل در دمای۸۰- درجه سانتیگراد منجمد شدند.

سپس DNA قارچ، با استفاده از میسلیوم‌های حاصل به روش ویژه‌ای (رضایی و همکاران، ۱۹۹۹، ۱۹۹۹، ۲۰۰۰) جدا گردیدند. بطور خلاصه میسلیوم‌های حاصله بصورت جداگانه درون یک هاون چینی ریخته شده و با کمک نیتروژن مایع تا بدست آمدن یک پودر نرم خرد گردیدند. سپس به پودر حاصل، بافر لیز کننده شامل (SDS 3% EDTA) 50Mm, Tris-HCl 50mM (pH=8) اضافه گردیده و پس از افزودن۲۰ میکرولیتر Proteinase K و ۲۰ میکرولیترRNase H به سوپرناتانت حاصله و انکوباسیون در دماهای بترتیب ۶۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد، مایع محتوی DNA قارچ توسط فنل-کلروفرم (به نسبت ۲۴-۲۵) شستشو داده‌شد. سپس DNA قارچ، به کمک الکل و در مجاورت NaAc 3M (استات‌سدیم) رسوب داده‌شد. مولکول‌های DNA جدا شده درنهایت به روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ آزمایش شده و پس از رویت بوسیله اتیدیوم بروماید با دستگاه Trans illuminator ، از نظر نحوه رانش، وزن مولکولی و شکل ظاهری مولکول‌های DNA (قطعه قطعه‌شدن، لیزشدن و یا سالم‌بودن) مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور کسب اطمینان ازنتایج حاصل، کلیه مراحل یاد شده در این بررسی سه بار در شرایط کاملا یکسان تکرار گردید.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثرات اشعه ماورأ بنفش با طول موج۳۰۲ نانومتر برروی گونه‌های قارچی مورد مطالعه، متفاوت بود.

از نظر ماکروسکوپی در محیط‌های جامد، در سوش‌های اشعه دیده، تغییرات زیادی در قطر کلنی، فرورفتگیهای موجود در سطح کلنی (شکل۱e و۱f) و پیگمانتاسیون نسبت‌به سوش‌های شاهد دیده‌شد. با افزایش زمان اشعه‌دهی و گذشت زمان تغییرات بارزتر می‌گردیدند. در محیط‌های مایع نیز سوش‌های اشعه‌دیده از رشد کمتری برخوردار بودند و برای بهتر نمایاندن این مطلب سوش‌های مورد مطالعه توزین گردیده و با یکدیگر مقایسه شدند (نمودار۱). تاثیرات اشعه برروی درماتوفیت‌های مورد مطالعه درمحیط سابورو دکستروز آگار حاوی سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل درمقایسه با تاثیرات اشعه برروی این قارچها در محیط سابورو دکستروز آگار فاقد آنتی بیوتیک کاملاً برابر و یکسان بود. بررسی تغییرات ناشی از تابش اشعه ماوراءبنفش برروی

گونه‌های قارچی کشت داده شده در محیط‌های جامد، نمایانگر کاهش سرعت رشد درتمامی این گونه‌ها بود. علاوه براین در *M. canis* چین‌خوردگی‌های شعاعی درکلنی اشعه‌دیده نسبت به کلنی شاهد، عمیق‌تر شده بود. قطر کلنی اشعه‌دیده کاملاً محدود گردیده و با گذشت زمان، نسبت قطر کلنی شاهد به قطر کلنی ۱۰ دقیقه اشعه‌دیده بیشتر می‌شد. در *E. floccosum* قطر کلنی و میزان چین‌خوردگی‌های روی کلنی اشعه‌دیده نسبت به نمونه شاهد، کاملاً کاهش یافته بود (شکل۱e و۱f). در این گونه نیز بمانند *M. canis* ، با گذشت زمان نسبت قطر کلنی شاهد به قطر کلنی اشعه‌دیده، افزایش می‌یافت (جدول۱).

جدول۱- مقایسه قطر کلنی‌های شاهد و ۱۰ دقیقه اشعه‌دیده قارچهای درماتوفیت درمحیط سابورو دکستروز آگار بعد از گذشت۳ و ۷ روز از زمان اشعه‌دهی.

(A *M. canis* (B *E. floccosum* (C *T. rubrum* (D *T. mentagrophytes*.

زمان (روز) / قطر کلنی (cm)	۳	۷
پلیت شاهد	۲/۵	۴
پلیت ۱۰ دقیقه اشعه‌دیده	۲	۳

A

زمان (روز) / قطر کلنی (cm)	۳	۷
پلیت شاهد	۰/۸	۱/۵
پلیت ۱۰ دقیقه اشعه‌دیده	۰/۷	**۱**

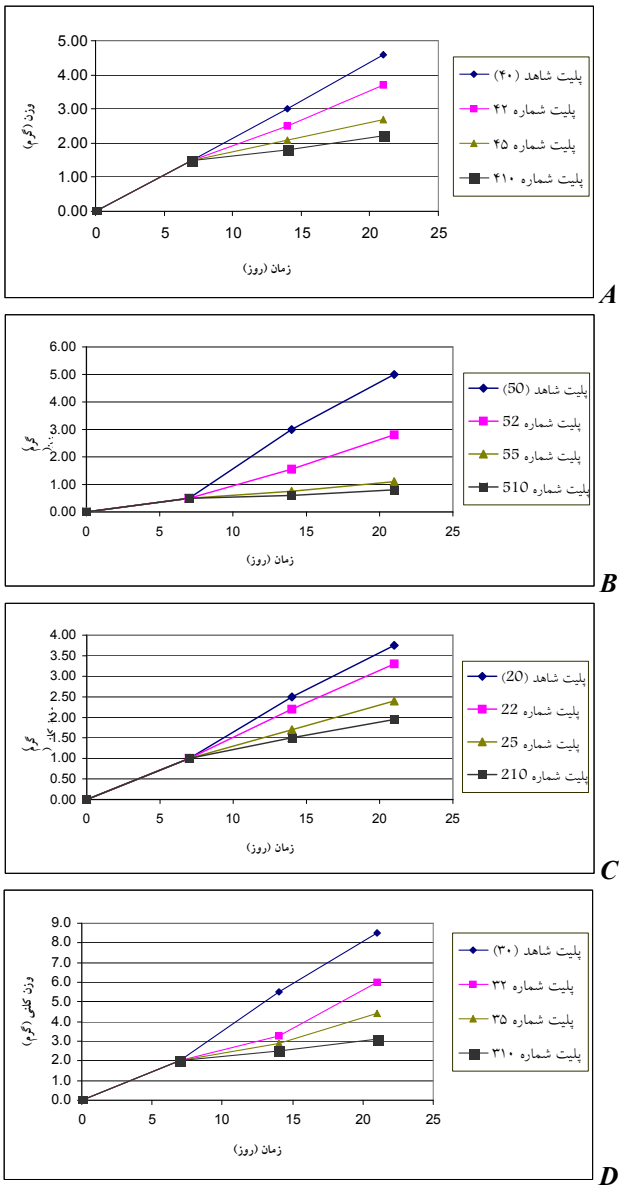
B

زمان (روز) / قطر کلنی (cm)	۳	۷
پلیت شاهد	۳	۴/۲
پلیت ۱۰ دقیقه اشعه‌دیده	۲/۵	۳/۱

C

زمان (روز) / قطر کلنی (cm)	۳	۷
پلیت شاهد	۴/۱	۶
پلیت ۱۰ دقیقه اشعه‌دیده	۳/۸	۵/۲

D



نمودار۱- مقایسه وزن کلنی‌ها در پلیت‌های شاهد و اشعه‌دیده قارچهای درماتوفیت درمحیط سابورو دکستروز براث.

A) *M. canis* **B)** *E. floccosum* **C)** *T. rubrum* **D)** *T. mentagrophytes*

در *T. rubrum* اشعه ماوراءبنفش برروی رنگ پشت کلنی مؤثر بود، بطوریکه درکلنی شاهد، رنگ پشت کلنی قرمز کم‌رنگ و منتشر بود درحالیکه رنگ پشت کلنی اشعه دیده به صورت قرمز پر رنگ و متمرکز مشاهده می‌شد. این حالت با گذشت زمان محسوس‌تر می‌گردید در حالیکه رنگ روی کلنی‌ها با یکدیگر تفاوتی نداشتند. نکته دیگر اینکه برجستگیهای مرکزی روی کلنی، درنمونه اشعه‌دیده کاهش یافتند. در *T. rubrum* نیز با گذشت زمان، قطر کلنی شاهد نسبت به کلنی اشعه‌دیده افزایش می‌یافت. در *T. mentagrophytes* قطر کلنی اشعه‌دیده نسبت به قطر کلنی شاهد کاملاً کاهش پیدا کرده بود و این تغییر بمرور زمان بیشتر می‌گردید. علاوه بر این، در رنگ پشت کلنی نیز تغییراتی ایجاد شد به نحوی که رنگ پشت کلنی شاهد، زردلیموئی منتشر بود درحالیکه رنگ پشت کلنی اشعه‌دیده، زرد پررنگ و متمرکز بود. همچنین تغییراتی در فرورفتگیهای مرکزی منظره کلنی اشعه‌دیده مشاهده شد، ولی تغییری دررنگ روی کلنی اشعه‌دیده، مشاهده نگردید.

بررسی تغییرات ماکروسکوپی ناشی از اشعه‌دهی گونه‌های قارچی مورد مطالعه درمحیط مایع نشاندهنده کاهش میزان رشد کلنی‌ها و تراکم آنها در تمامی گونه‌ها با افزایش زمان اشعه‌دهی در پلیت‌های ۵،۲ و ۱۰ دقیقه اشعه داده شده بود (شکل۱a و۱b). همچنین نتایج توزین میسلیوم‌های قارچی در تمام گونه‌های مورد مطالعه و مقایسه وزن پلیت‌های شاهد با اشعه‌دیده، نمایانگر کاهش وزن در تمامی کلنی‌های اشعه‌دیده بود، بطوریکه وزن کلنی‌های شاهد بین ۲/۵ تا ۸ گرم و کلونی‌های۱۰ دقیقه اشعه‌دیده بین ۰/۶ تا ۳/۱ گرم اندازه‌گیری شد (نمودار۱). در گونه‌های *E. floccosum*، *T. rubrum* و *T. mentagrophytes*، با افزایش زمان تابش اشعه، از تعداد میسلیوم‌های هوایی کاسته شده و کلنی‌های اشعه‌دیده کرکی شده بودند.

بررسی تغییرات میکروسکوپیک در گونه‌های مورد مطالعه که بوسیله اسلاید کالچر انجام پذیرفت نمایانگر یکسری تغییراتی در این قارچها بود که از آن‌جمله می‌توان به تغییر شکل هیف‌ها و ماکرو کنیدی‌ها، تغییر درتراکم میکرو و ماکرو کنیدی‌ها اشاره نمود. ولی درکلیه موارد، هیف‌ها دارای دیواره عرضی بوده و شفافیت خود را حفظ نموده بودند.

بررسی اسلایدکالچر انجام شده در مورد *M. canis* نشاندهنده تغییرات زیادی درشکل میکروسکوپی این قارچ بود، بطوریکه درسوش اشعه‌دیده، هیف‌ها تغییر شکل پیدا کرده بودند یعنی اشکال بدشکل و نامنظمی را ایجاد، ولی همچنان دیواره عرضی و شفافیت هیف‌ها مشاهده می‌شد. تعداد میکرو کنیدی و ماکرو کنیدی‌ها افزایش یافته بود و ماکرو کنیدی‌ها تغییرشکل‌یافته و به اشکال خیاری شکل و هلالی شکل مشاهده می‌شدند که خارها و ضخامت دیواره خود را از دست داده و سلول‌های درونی آنها طویل و نازک بودند. این تغییرات با گذشت

زمان بارزترگردیدند. درمیکروکنیدی‌های این قارچ، تغییرات مورفولوژیکی مشاهده نگردید ولی تعداد آنها افزایش یافته بود. این درحالی بود که اسلایدکالچر نمونه شاهد این درماتوفیت نمایانگر هیف‌های ظریف، شفاف، باریک، منظم، منشعب و با دیواره عرضی، ماکروکنیدی‌های با دیواره ضخیم، خشن، خاردار، که در دو سر خود دارای زوائد نامتقارنی بوده و واجد چندین خانه یا سلول و میکروکنیدی‌های کروی شکل با دیواره نازک بیشتری بود.

در اسلایدکالچر *E. floccosum* شاهد هیف‌های ظریف، شفاف، باریک، منظم، منشعب و با دیواره عرضی مشاهده گردید که از تراکم بالایی برخوردار بودند. در بین هیف‌ها ماکروکنیدی‌های متعدد و راکتی شکل کوتاه که تعداد خانه‌های موجود در آنها بین ۱ تا ۳ عدد بود مشاهده گردید (شکل۱g). درمطالعه سوش اشعه‌دیده، تغییراتی از حیث تراکم و شکل ظاهری هیف‌ها و ماکروکنیدی‌ها در این سوش قارچی دیده شد. تعداد ماکروکنیدی‌ها در سوش اشعه‌دیده به شدت کاهش یافته بود و ماکرو کنیدی‌ها کشیده و طویل شده بودند. بدنبال این تغییر مورفولوژیکی، تعداد خانه‌های موجود در ماکروکنیدی‌ها نیز بطور متوسط بین ۳ تا ۴ خانه افزایش یافته بودند. هیف‌های سوش اشعه‌دیده مورد بررسی تا حدودی تغییرشکل یافته بودند با این وجود، هیف‌ها همچنان شفاف و دارای دیواره عرضی بودند (شکل۱h).

اسلایدکالچر *T. rubrum* نمونه شاهد، نمایانگر هیف‌های ظریف، شفاف، باریک، منظم، منشعب و با دیواره عرضی بودکه از تراکم بالایی برخوردار بودند. همچنین، ماکروکنیدی‌های مدادی شکل تا سوسیسی شکل و نیز میکروکنیدی‌های کروی تا بیضی شکل متعددی دیده شد (شکل۱c). مطالعه میکروسکوپی نمونه اشعه دیده، نشانگر وجود هیف‌های شفاف، با دیواره عرضی بود که برخی از آنها بصورت کج و معوج بوده و تغییر شکل داده بودند. تعداد ماکروکنیدی‌های کوتاه و باریک درمقایسه با سوش شاهد کاهش یافته بود. همچنین از تعداد میکروکنیدی‌ها کاسته شده بود ولی تغییری درشکل ظاهری آنها ایجاد نگردیده بود (شکل۱d).

اسلایدکالچر *T. mentagrophytes* در نمونه شاهد، هیف‌های ظریف، شفاف، باریک، منظم، منشعب و با دیواره عرضی را نشان می‌داد که از تراکم بالایی برخوردار بودند. همچنین هیف‌های تغییر شکل یافته بصورت مارپیچی که به وفور وجود داشتند، مشاهده گردید. تراکم ماکروکنیدی‌های چماقی شکل با جدار نازک پایین بود در حالیکه میکروکنیدی‌های آن که گرد و کروی بودند با تراکم بالا وجود داشتند. در مشاهدات میکروسکوپی که از نمونه اشعه دیده به عمل آمد، هیف‌ها تا حدودی تغییر شکل یافته بودند ولی شفافیت و دیواره عرضی خود را از دست نداده بودند. همچنین اندازه ماکروکنیدی‌های نمونه اشعه‌دیده کوتاه شده بود ولی تا حدودی شکل چماقی تا گرزی‌شکل خود را حفظ نموده بودند. از تراکم ماکروکنیدی‌ها و

میکروکنیدی‌ها نیز کاسته شده بود ولی هیچگونه تغییری در شکل ظاهری میکروکنیدی‌ها ایجاد نگردیده بود.

نتایج حاصل از بررسی مولکول‌های DNA نمونه‌های شاهد و اشعه‌دیده *T. rubrum* که با روش الکتروفورز برروی ژل آگارز مورد مطالعه قرار گرفت نشاندهنده تغییری در باندهای حاصل از الکتروفورز در روش ژل آگارز نبود و هیچ‌گونه تغییری درالگوی مولکول‌های DNA نمونه‌های شاهد و اشعه دیده‌که نمایانگر پدیده مرگ طبیعی سلولی یا آپوپتوزیز باشد مشاهده نگردید (شکل۲).

بحث

یکی‌از عوامل مهم جهش‌زا در موجودات زنده، اشعه ماوراء بنفش است که در آزمایشگاه جهت ایجاد جهش درموجودات مورد مطالعه، اعم از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها، استفاده می‌نمایند (آل‌محمد و رحمانی، ۱۳۷۸). اثرات مخرب اشعه ماوراء بنفش بسیار مشهود بوده و دراین میان، اشعه UVB اثر تخریبی بیشتری‌را نسبت به UVA و UVC برروی پوست انسان داراست (Häder & Tevini, 1987). تخریب ایجاد شده در DNA ویروس‌ها و فاژها بر اثر تابش اشعه ماوراء بنفش، با استفاده از سیستم ترمیم حذفی سلول میزبان، و در یوکاریوت‌های پست مانند قارچها، جلبک‌ها و پروتوزوئرها، توسط سیستم ترمیمی فتورآکتیواسیون برطرف می‌گردند (Häder & Tevini, 1987). اشعه UV، رشد و تقسیم سلولی را درسلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی متوقف می‌سازد (Bånrud et al, 1995).

تأثیر اشعهUV برروی قارچها که از زمره یوکاریوت‌های پست به حساب می‌آیند، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. اثر اشعه UV برروی مخمرهای جنس *Pityrosporum* و دیگر میکروارگانیزم‌های پوست بدن انسان مورد مطالعه قرار گرفته است و مشخص شده که با تابش اشعه UV، رشد مخمرهای *Pityrosporum* متوقف می‌شود (Wikler *et al.,* 1990). همچنین طی بررسیهای به عمل آمده مشخص گردیده که اسپورسازی دربرخی‌از قارچها توسط اشعه UV تحریک‌شده و با تابش این اشعه اسپورهای زیادی توسط قارچ تولید می‌شود (Deacon, 1997).

ازآنجا که قارچهای درماتوفیت از جمله عوامل مهم عفونت‌زای قارچی برای انسان و حیوان بوده و با توجه به اینکه تا کنون مطالعات اندکی در زمینه تأثیر اشعه UV برروی جنبه‌های مختلف این گروه از قارچها صورت گرفته است، از اینرو درمطالعه حاضر چهار گونه *Trichophyton rubrum*، *Epidermophyton floccosum*، *Microsporum canis*

و*Trichophyton mentagrophytes* انتخاب گردیده و ازنقطه نظر تأثیرات اشعه UV تحت بررسی قرار گرفتند. دراین مطالعه سعی‌شده است تا تغییرات احتمالی (آپوپتوزیز) که بر اثر تابش اشعه ماوراء بنفش با طول موج ۳۰۲ نانومتر در این گونه‌های قارچی ایجاد می‌شوند کاملاً کنترل و مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرند. بنابراین کلیه تغییرات اعم از ماکروسکوپی، میکروسکوپی، وزنی و مولکولی، مد نظر بوده که تا حد ممکن مورد ارزیابی قرار گرفته اند.

اشعه ماوراء بنفش به طرق مختلف بر قارچها اثر می‌گذارد و بسته به گونه قارچی و برنامه زمانی اشعه‌دهی، اشعه UV می‌تواند متوقف‌کننده رشد قارچ، جهش‌زا و یا قارچ‌کش باشد. مطالعاتی که تا کنون انجام گرفته است، نشان می‌دهد که درماتوفیت‌ها، واکنشهای متفاوتی را در مقابل دوزهای مختلفی از نور مرئی و اشعه UV از خود نشان می‌دهند (Brasch & Menz, 1995).

در مطالعه J. Brasch و Anne Menz، تأثیر اشعه‌های UVA و UVB برروی سه‌گونه: *M. canis, T. rubrum, T. mentagrophytes* مطالعه گردیده است. نتایج این مطالعه مشخص نمود که نمونه‌های مزبور نسبت به اشعه UVB، از خود نورگرایی منفی نشان‌داده و نسبت به اکسیژن از خود گرایش مثبت نشان می دهند. نتیجه ای که از این بررسی بدست آمد این بود که درماتوفیت‌ها در شرایط in vitro از دوزهای بالا و مخرب اشعه UVB می‌گریزند که این عمل‌را با نورگرایی منفی از خود نشان می‌دهند. این توانایی یک مکانیزم محافظتی برای درماتوفیت‌ها محسوب می‌شود (Brasch & Menz, 1995).

همچنین دربررسیKoshy (۱۵۷۷) نیز، از گونه‌هایی استفاده گردید که بدلیل پاساژهای مکرر، فاقد قدرت ایجاد ماکروکنیدی بودند. این گونه‌ها عبارتند از:

T. rubrum, M. canis, T. mentagrophytes, *M. gypseum, E. floccosumT. tonsurans, T. violaceum*.

این گونه‌ها به‌مدت ۱ تا ۱۰ دقیقه با اشعه UV پرتودهی گردیده و فاصله نمونه‌ها از منبع تولیدکننده اشعه UV ۴ سانتیمتر بود. از میان نمونه‌های مورد مطالعه تنها *M. gypseum* و *E. floccosum* شروع به تولید ماکروکنیدی نموده و *M. canis* نیز تا حدودی تولید ماکروکنیدی کرده ولی دیگر نمونه‌ها این قابلیت را پیدا نکردند. با این حال اشعه UV بیشترین اثر کشندگی را برروی سلول‌های *Epidermophyton* و *Microsporum* داشت. *M. gypseum* و *E. floccosum* در مدت ۵ تا ۶ دقیقه اشعه‌دهی، بیشترین میزان تولید ماکروکنیدی را داشتند. حتی تعداد سلول‌های ماکروکنیدی این دو گونه اخیر با نمونه‌های عادی برابر بود. با افزایش زمان پرتودهی از مقدار ماکرو کنیدی‌ها کاسته شد. انتهای میسلیوم نمونه‌هایی‌که ۱ تا ۳ دقیقه و یا ۷ دقیقه بیشتر اشعه‌دهی شدند متورم شده بود و این مورد در نمونه‌های ۵ تا ۶ دقیقه

اشعه‌دیده کمتر دیده می‌شد. نکته مهمی‌که دراین مطالعه بدست آمد برگشت پذیر بودن پدیده ماکرو کنیدی‌زایی درنمونه‌های اشعه دیده بود یعنی بر اثر پاساژهای پی در پی *M. gypseum* و *E. floccosum*، این پدیده القاء شده توسط اشعه برگشت داده می‌شود و دوباره قابلیت ماکروکنیدی‌زایی خود را از دست می‌دهند (Koshy, 1977).

در بررسی Buchníček مقاومت قارچهای درماتوفیت نسبت به اشعه UV که یکی از عوامل مهم طبیعی‌است مورد مطالعه قرار گرفته است. دراین مطالعه، دوگونه *T.ajelloi* و *M.cookei* مورد بررسی قرار گرفتند. اشعه UV درفاصله۵۰ سانتیمتری، تندش اسپور را دراین گونه‌های قارچی متوقف کرده و اسپورها را تخریب نمود (Buchniček, 1976).

ازآنجا که هیچکدام از مطالعات انجام شده فوق درزمینه نحوه تأثیرات اشعه UV برروی قارچها و درماتوفیت‌ها پیشنهاد خاصی را ارائه نمی‌نمایند، دراین مطالعه سعی شده است تا برای اولین بار اقدام به یک مطالعه مدون و مستدل گردیده و اهداف مشخصی در زمینه تأثیر اشعه ماوراء بنفش برروی درماتوفیت‌ها و استفاده احتمالی از آن برای مطالعات بعدی بیان شود.

در این بررسی، طول موج۳۰۲ نانومتر به دلیل اینکه درطیف نوریUVB قرار داشته و بیشترین خاصیت کشندگی را داراست برای مطالعه انتخاب گردید. فاصله منبع تولید کننده اشعه UV از نمونه‌های قارچی، ۸ سانتیمتر انتخاب، تا اثرات اشعه UV برروی ارگانیزم‌ها در اندازه‌ای معقول درحد فاصل مقادیر مورد استفاده در مطالعهKoshy و Buchníček مورد بررسی قرار گیرند. نمونه‌های انتخابی که از جمله مهمترین عوامل عفونت‌زای قارچی درانسان به شمار می‌آیند در محیط‌های جامد و مایع کشت گردیدند تا نتایج انتهایی با یکدیگر مقایسه گردند.

برنامه پرتودهی برای زمانهای۲، ۵ و ۱۰ دقیقه و آن هم فقط یکبار اشعه‌دهی انتخاب شد تا مشخص شود که این زمانهای نسبتاً کم پرتودهی، تا چه میزانی قادر به تأثیر برروی فعالیت حیاتی درماتوفیت‌های مورد مطالعه می‌باشد.

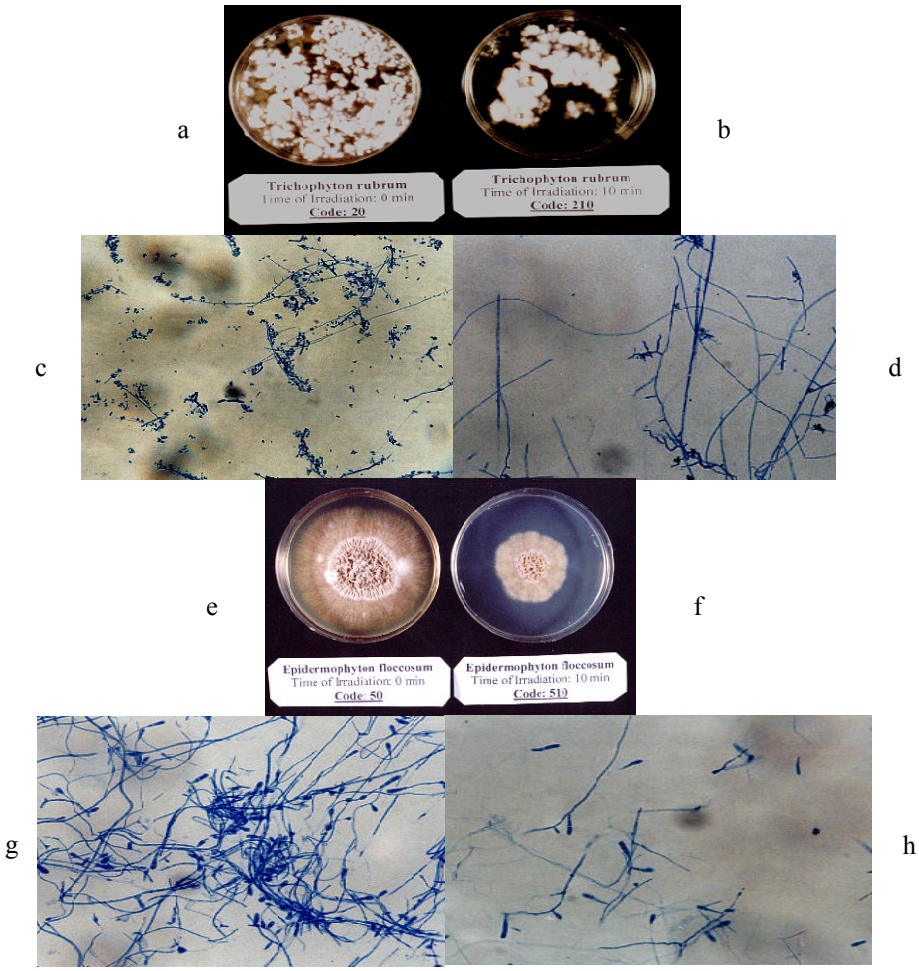
در این بررسی، با افزایش زمان اشعه‌دهی توقف رشد و مرگ سلول‌های قارچی نیز بیشتر مشاهده می‌گردید. کاهش تعداد ماکرو کنیدی‌ها و میکروکنیدی‌ها، همچنین تغییر شکل ماکرو کنیدی‌ها و میسلیوم‌ها، کم شدن قطر ظاهری کلنی نمونه‌ها، کم وزن شدن نمونه‌های اشعه دیده و تغییر در پیگمانتاسیون برخی‌از گونه‌ها، همگی ازجمله اثرات قابل توجه و مهم میکروسکوپی و ماکروسکوپی بودند که در اثر تابش اشعه UV به سوش‌های مورد مطالعه، مشاهده گردیدند.

در مطالعه حاضر، براساس تجربیات بدست آمده از مطالعه J. Brasch و همکارش، عوامل قارچی اشعه‌دیده پس‌از پرتودهی، دراتاق تاریک قرار داده شدند. این مسئله به منظور جلوگیری

از فعالیت سیستم‌های ترمیمی موجود در ارگانیزم که بر اثر تابش نور طبیعی فعال می‌گردند، صورت پذیرفت.

در ادامه بررسی، تغییرات احتمالی در ژنوم نمونه‌های اشعه دیده (آپوپتوزیز) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. دراین زمینه قارچ *T. rubrum*، بعنوان مهمترین و شایعترین عامل عفونتهای درماتوفیتوزیس بررسی و DNA جدا شده از این قارچ به روش الکتروفورز مورد مطالعه قرار گرفت؛ ولی پدیده آپوپتوزیز در این نمونه‌ها دیده نشد (شکل۲) و به نظر می‌رسد که تغییرات بوجود آمده دراشکال میکروسکوپی و ماکروسکوپی این سوش‌ها توسط اشعه UV، بدلیل تأثیر این اشعه برروی ژن‌ها و یا ساختمان پروتئین‌های سنتز شده درسلول‌های قارچی بوده است که بیان این مطلب بصورت یک اصل علمی نیاز به انجام مطالعات وسیعتری دارد. همچنین با توجه به مطالعات انجام شده توسط دانشمندان مختلف و با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آنها با نتایج دیگر مطالعات چنین به نظر می‌رسد که اشعه UV با طول موجهای مختلف برروی رشد درماتوفیت‌ها مؤثر می‌باشد. چنانچه دراین مطالعه نشان داده شده است که با افزایش زمان تابش اشعه، توقف رشد میسلیوم در سوش‌های مورد مطالعه مشهود تر بوده و میزان کنیدی‌زایی آنها نیز کاهش یافته است.

علاوه بر موارد مذکور، تغییر شکل هیف‌ها و تغییر در پیگمانتاسیون برخی‌از سوش‌ها کاملاً بارز و آشکار است؛ بطوریکه طول موج۳۰۲ نانومتر از اشعه UV روی DNA هسته اثری نداشته و سبب نکروز شدن سلول و یا بروز پدیده مرگ طبیعی سلولی (آپوپتوزیز) نمی‌گردد. از اینرو، برای مشاهده این دو مورد، در نتیجه اثر اشعه UV نیاز به زمان پرتودهی بیشتر و یا استفاده از طول‌موجهای کشنده‌تر می‌باشد.



شکل۱- اثرات طیف UVB بر شکلهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچهای درماتوفیت.

a) *T. rubrum* شاهد درمحیط سابورو دکستروز براث.

b) *T. rubrum* پس‌از۱۰ دقیقه پرتودهی درمحیط سابورو دکستروزبراث.

c) تصویر میکروسکوپی از اسلایدکالچر *T. rubrum* شاهد.

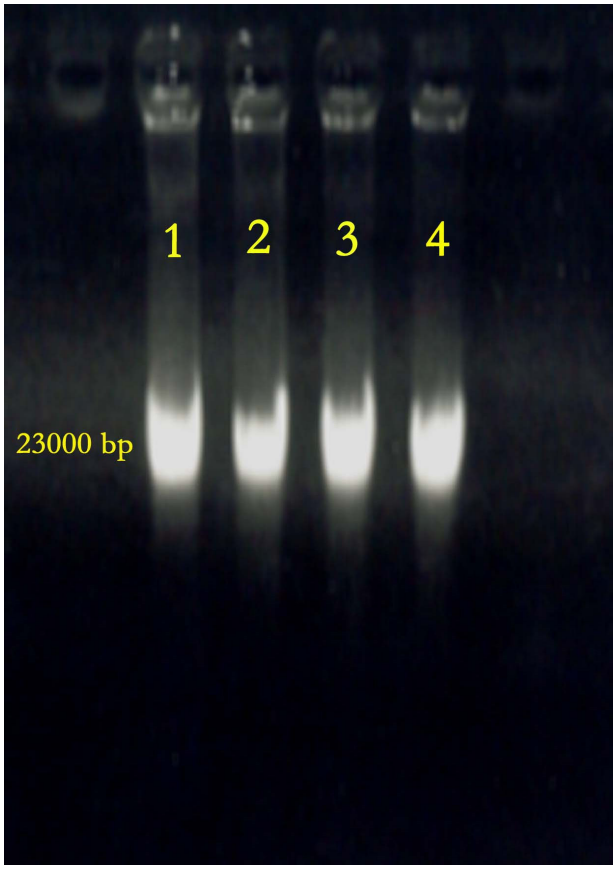
d) تصویر میکروسکوپی از اسلایدکالچر *T. rubrum* پس‌از۱۰ دقیقه پرتودهی.

e) تصویر *E. floccosum* شاهد درمحیط سابورو دکستروز آگار.

f) تصویر *E. floccosum* پس‌از۱۰ دقیقه پرتودهی درمحیط سابورو دکستروز آگار.

g) تصویر میکروسکوپی‌از اسلایدکالچر *E. floccosum* شاهد.

h) تصویر میکروسکوپی از اسلایدکالچر *E. floccosum* پس از ۱۰ دقیقه پرتودهی.



شکل۲- بررسی مولکول‌های DNA جدا شده‌از *T. rubrum*

۱) باند مربوط به *T. rubrum* DNA شاهد.

۲) باند مربوط به *T. rubrum* DNA پس‌از۱۰ دقیقه پرتودهی و یک ساعت انکوباسیون دراتاق تاریک.

۳) باند مربوط به *T. rubrum* DNA پس‌از۱۰ دقیقه پرتودهی و ۲۴ ساعت انکوباسیون دراتاق تاریک.

۴) باند مربوط به *T. rubrum* DNA پس‌از۱۰ دقیقه پرتودهی و ۷۲ ساعت انکوباسیون دراتاق تاریک.

References

Bånrud, H., Stokke, T., Moan, J., and Berg, K. (1995). S phase arrest and induction of multinucleated cells after exposure to ultraviolet radiation, Carcinogenesis, **16(5),** 1087-1094.

Berger D. (1994). A comparison of spectroradiometers to radiometers for UV radiation measurements, Solar light Co., Inc., Philadelphia, USA. www.solar.com/ftp/papers/spectro.pdf

Brasch, J., Menz, A. (1995). UV susceptibility and negative phototropism of dermatophytes, Mycoses, **38(5-6),** 197-203.

Buchniček, J. (1976). Light resistance in geophilic dermatophytes, Sabouraudia **14(1),** 75-80.

Deacon, J.W. (1997). Modern Mycology, Blackwell Science Ltd., pp. 132-134.

Häder, D.P., Tevini, M. (1987). Biological effects of ultraviolet radiation, General photobiology, First edition, Pergamon Press, Chapter 14.

Koshy, T.K. (1977). The formation of macroconidia in dermatophytes following UV irradiation and temperature treatment, Can J Microbiol, **23,** 1289-1301.

Rezaie, S. (1999). Isolation of total RNA from dermatophytes, Mycoses, **42,** 615-617.

Rezaie, S. (1999). Molecular investigation of dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*, Dissertation thesis, University of Vienna, Austria.

Rezaie, S., Ban J., Mildner J., Poitschek C., Brna C., and Tschachler E. (2000). Characterization of a Cdna clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermathophyte pathogen *Trichophyton rubrum*, Gene, **241(1),** 27-33.

Rickwood, D., Hames B.D., Studzinski G.P. (1995). Cell growth and apoptosis, a practical approach, Oxford University press, pp. 121

Wikler, J.R., Janssen, N., Bruynzeel D.P., and Nieboer, C. (1990). The effect of UV-light on *Pityrosporum* yeasts: Ultrastructural changes and inhibition of growth, Acta Derm. Venerol. **70(1),** 69-71.

آل‌محمد، ع. رحمانی، م. (۱۳۷۸) *مبانی ژنتیک مولکولی*، انتشارات فاطمی، ۱۲۵ و ۱۲۶.

بهزادی، پ. بهزادی، ا. (۱۳۸۱) *قارچ شناسی پزشکی و روشهای تشخیص آزمایشگاهی درماتوفیت های بیماری‌زا*، انتشارات کمال دانش، ۲۲.

بهزادی، پ. (۱۳۸۱) *بررسی تأثیرات اشعه UV برروی قارچهای درماتوفیت*، پایان‌نامه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.