مجله بهداشت ایران، سال بیستم، شماره ۱ تا ۴، ۱۳۷۰

فعالیت آنزیمی ترایکوفایتون روبروم، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و ترایکوفایتون وروکوزوم

دکتر فریده زینی*

واژه‌های کلیدی: ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، ترایکوفایتون روبروم، ترایکوفایتون وروکوزوم، فعالیت آنزیمی

چکیده

چون اغلب مطالعات انجام شده روی ترکیبات درماتوفیتها نشان دهنده ارتباط پاتوژنیسیتی آنها با آنزیمهای پروتئولیتیک است لذا فعالیت ۱۹ آنزیم مختلف در میسلیومهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی ت- روبروم، ت - منتاگروفایتیس ت - ورکوزوم به روش API-Zym مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که میسلیومهای زنده ت -روبروم و ت - منتاگروفایتیس دارای فعالیت آنزیمی والین‌آریلامیداز و سیستین‌آریلامیداز بوده، در حالیکه در عصاره سیتوپلاسمی آنها و نیز میسلیومهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی ت- ورکوزوم چنین فعالیتی مشاهده نگردید.

همچنین در عصاره سیتوپلاسمی ت- روبروم هیچگونه فعالیتی از α- مانوزیداز دیده نشد در حالیکه میسلیومهای زنده ت- روبروم ت- ورکوزوم و ت- منتاگروفایتیس از خود فعالیت این آنزیم را نشان دادند. بالاخره فقط میسلیومهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی ت- وروکوزوم وت - منتاگروفایتیس فعالیت آنزیم لیپاز (C14) را نشان دادند.

علاوه بر آن میسلیومهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی هیچیک از سه گونه فوق فعالیتی برای ترپسین، کیموترپسین، α-گالاکتوزیداز، β-گالاکتوزیداز، α- فوکوزیداز و β-گلوکورونید از خود نشان ندادند.

---

* گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی - دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵- تهران.

سرآغاز

درماتوفیتها، قارچهای رشته‌ای کراتین دوست بوده و بصورت ساپرفیت در خاک و یا بصورت انگل روی پوست مهره‌داران، پروتئین را بعنوان یک منبع اصلی مصرف کرده و حتی قادرند در ترکیبات اسکلروپروتئینی مقاومی چون کراتین تغییراتی ایجاد نمایند. در ضمن رشد، روی سوبستراهای پروتئینی آنزیمهای پروتئولیتیک فوق العاده قوی و فعالی را در محیط ترشح می‌کنند. فعالیت کراتولیتیک و پروتئازهای درماتوفیتها از مدتها قبل مورد توجه مایکولوژیستها، بیوشیمیستها، پزشکان بوده و مورد مطالعه قرار گرفته و درد دو دهه اخیر تعدادی از آنها خالص گشته و بطور اجمالی شرح داده شده‌اند (۱،۲،۷،۱۰،۱۲،۱۴،۱۶،۱۷) و نیز نقش آنها در ویرولانس و پاتوژنز بیماریهای قارچی جلدی (کچلی‌ها) مورد بحث قرار گرفته است (۶،۸،۹،۱۳). درماتوفیتها در پوست و ضائم آن ضایعاتی به صورت حاد یا مزمن ایجاد میکنند. بعضی از آنها قادر به تهاجم به مو نبوده و فقط در پوست و ناخن ایجاد ضایعه می‌کنند و بعضی دیگر در پوست و مو ضایعه میدهند. عفونتهای حاد توام با واکنشهای التهابی شدید معمولا توسط درماتوفیتهای با منشاء حیوانی یا خاکی و عفونتهای مزمن با علائم خفیف التهابی توسط درماتوفیتهای با منشاء انسانی ایجاد می‌شوند. علائم بالینی و نحوه پیشرفت آن بر حسب واکنش میزبان نسبت به ارگانیسم عامل بیماری متفاوت است. در گوناگونی چنین واکنشها و یا علائم بالینی از یک ضایعه ساده و پوسته دار تا یک ضایعه التهابی و شدید، مواد یا آنزیمهای اختصاصی درماتوفیتها را موثر میدانند چراکه وجود آنها در قارچهای پاتوژن ثابت شده است (۱۱). و از آنجائیکه در حال حاضر درماتوفیتهای ت- روبروم ت- منتاگروفایتیس وت - وروکوزوم از عوامل شایع جدا شده از بیماران مبتلا به درماتوفیتوز در نقاط مختلف ایران هستند لذا سه گونه فوق در این مطالعه انتخاب و اختلاف آنزیمی آنها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.

ت - روبروم با منشاء انسانی وت - منتاگروفایتیس وت - وروکوزوم با منشاء حیوانی هستند. اولی ضایعات مزمن و دوتای دیگر ضایعات حاد و شدید التهابی ایجاد می‌کنند. محققین دیگری نیز در مورد سیستم آنزیمی آنها به روشهای گوناگون مطالعه نموده‌اند ولی تاکنون فقط تعداد محدودی از آنها را شناسائی کرده‌اند در حالیکه با روشی که در این بررسی بکار گرفته شده فعالیت ۱۹ آنزیم مختلف بطور همزمان بطریق نیمه کمی اندازه گیری شده است.

روش کار

I- نمونه‌های قارچی مورد استفاده؛ ۱۶ نوع[1] از گونه‌های ت- روبروم، ۹نوع ت- منتاگروفایتیس و ۹ نوع ت- وروکوزوم که بطور تازه از بیماران جدا شده بودند برای بررسی فعالیت آنزیمی استفاده گردید.

II- برای بررسی فعالیت آنزیمی در میسلیومهای زنده انواع هر یک از گونه‌های فوق بر روی پلیتهای حاوی محیط سابورودکستروزآگار کشت داده شده و در حرارت ۳۰ بمدت ۱۵ روز نگهداری شدند. از هر یک از کلنی‌ها انواع گونه‌های مورد آزمایش بطور جداگانه دایره‌ای بقطر ۶/. میلیمتر تهیه و توسط آنس استریل از آگار جدا نموده و در دستگاه خردکننده بافت[2] محتوی یک میلی لیتر آب مقطر استریل بقطعات کوچکتری شکسته و به لوله‌های در پیچدار ۲۰ میلی لیتری مربوط به هر یک از گونه‌ها منتقل و برای آزمایش نگهداری می‌شدند.

III- برای تهیه عصاره سیتوپلاسمی (CE)، قارچها را در محیط سابورودکستروز مایع کشت داده و ۳ هفته در ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری کرده و سپس لایه میسلیال رشد کرده را بکمک گلوله‌های شیشه‌ای و هموژنایزربران، هموژنیزه نموده و بمدت نیمساعت با سرعت ۵۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ کرده و آنگاه مایع بالایی جدا و پس از دیالیز کردن، لیوفیلیزه و نگهداری می‌شدند. هنگام آزمایش محلولی به غلظت یک $mg.ml^{-1}$ از آنها در آب مقطر استریل تهیه می‌گردید.

IV- برای تعیین فعالیت آنزیمی از روش API استفاده شد که کیت آن دارای گالرهائی است که هر یک گالری حاوی ۱۹ سوبسترای مختلف در حفرات جداگانه است. بهریک از آنها مقدار ۶۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میسلیومهای زنده و یا محلول عصاره سیتوپلاسمی قارچی، اضافه شده و بمدت ۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند. پس از پایان مدت مزبور با اضافه کردن معرف ویژه درجه تغییر رنگ مورد مطالعه قرار می‌گرفت.

1- Strain

2 - Tissue grinder

یافته‌ها

همانطورکه در شترنگه شماره ۱ نشان داده شده، میسلیومهای زنده و خرد شده ت- روبروم وت - منتاگروفایتیس دارای فعالیت آنزیمی والین آریلامیدازوسیستین آریلامیداز بوده در حالیکه در عصاره سیتوپلاسمی آنها و نیز میسلویمهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی ت- وروکوزوم چنین فعالیتی مشاهده نگردید. همچنین در عصاره سیتوپلاسمی ت- روبروم هیچگونه فعالیتی از α- مانوزیداز دیده نشد در حالیکه میسلیومهای زنده‌ت - روبروم ت- وروکوزم وت - منتاگروفایتیس و نیز عصاره سیتوپلاسمی دو گونه ت- ورکوزوم و ت- منتاگروفایتیس از خود فعالیت این آنزیم را نشان دادند و علاوه بر آن فقط میسلیومهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی ت- وروکوزوم وت - منتاگروفایتیس فعالیت آنزیم لیپاز (C14) را نشان دادند. بالاخره میسلیومهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی هیچیک از سه گونه فوق فعالیتی برای ترپسین، کیموترپسین، α- گالاکتوزیداز، β- گالاکتوزیداز ، α- فوکوزایداز، β- گلوکوزونیداز از خود نشان ندادند. فعالیت فسفاتازآلکالن در میسلیومهای زنده یکسان و حداکثر بوده در حالیکه در عصاره سیتوپلاسمی ت- وروکوزوم کمتر از سایر گونه‌ها بود. استرازلیپاز C4 در عصاره‌های سیتوپلاسمی ت- روبروم وت - منتاگرفایتیس ۳۰٪ در حالیکه در میسلیومهای زنده آنها و نیز میسلیومهای زنده و عصاره سیتوپلاسمی ت- وروکوزوم فقط ۱۰٪ فعالیت داشت. بالاخره نفتول B1-AS فسفوهیدرولاز فقط عصاره‌های سیتوپلاسمی هر سه گونه فعالیت فوق‌العاده نشان داد.

گفتگو

عفونتهای مزمن درماتوفیتی برعکس عفونتهای حاد دارای دوره طولانی‌تر و بدون واکنش مشخص بافت میزبان می‌باشند و چنین عفونتهائی معمولا توسط درماتوفیتهای با منشاء انسانی مانند ت- روبروم ایجاد می‌شوند. عفونتهای حاد، التهابی، کریون دار توام با خارش واریتم اغلب توسط ارگانیسمهای با منشاء حیوانی یا خاکی چون ت- منتاگروفایتیس وت - وروکوزوم و معمولا در عرض مدت ۱۰ روز پس از تماس ایجاد می‌شوند. درگوناگونی چنین واکنشها و یا

شترنگه شماره ۱ - فعالیت آنزیمی میسلیومهای زنده و عصاره‌های سیتوپلاسمی (CE) ت- روبروم، (۱۶ نوع) ت- منتاگروفایتیس (۹ نوع) وت - وروکوزوم (۹نوع).

شماره	آنزیمها	ت-روبروم	CETr	ت-منتاگرفایتیس	CETm	ت- وروکوزوم	CETv
۱	فسفاتازآلکالن	++++	+++	++++	++++	++++	+
۲	استراز(C4)	+	+++	+	+++	+	+
۳	استرازلیپاز(C8)	+	++	++	+++	++++	++++
۴	لیپاز(C14)	۰	۰	±	±	+	±
۵	لوسین آریلامیداز	++	+	+++	+	+	++++
۶	والین آریلامیداز	++	۰	±	۰	۰	۰
۷	سیستین آریلامیداز	±	۰	±	۰	۰	۰
۸	تریپسین	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۹	کیموترپسین	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰	فسفاتازاسید	+++	++++	++++	+++	++	+++
۱۱	نفتول BI,AS فسفوهیدرولاز	۰	+++	۰	++++	۰	++++
۱۲	αگالاکتوزیداز	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۳	βگالاکتوزیداز	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۴	βگلوکورونیداز	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۵	αگلوکوزیداز	±	۰	+	+	±	۰
۱۶	βگلوکوزیداز	++++	++++	++++	+++	+++	++
۱۷	N-استیل گلوکوزآمینیداز	++++	++++	+++	++	+	+
۱۸	αمانوزیداز	+	۰	++++	+++	+++	+
۱۹	αفوکوزیداز	۰	۰	۰	۰	۰	۰

مقدار تقریبی سوبستراهای[1] هیدرولیز شده در مدت ۴ ساعت در حرارت $^{\circ}C$ ۳۷ با این علائم نشان داده شده است: ۴۰٪=++++، ۳۰٪=+++، ۲۰٪=++، ۱۰٪=+، ۵٪=± یا فعالیت قابل‌اندازه‌گیری

1- Substrate

علائم بالینی از یک ضایعه ساده، پوسته‌دار تا یک ضایعه التهابی شدید و کریون دار و دردناک نقش مواد و یا آنزیمهای اختصاصی در قارچهای پاتوژن ثابت شده (۱۱) و از این اختلافات آنزیمی بمنظور تشخیص گونه‌های بسیار نزدیک بهم و حتی انواع یک گونه استفاده شده است (۱۵). یو و همکاران (۱۹،۲۰) پس از مطالعاتی خاطر نشان می‌کنند که رشد انگلی درماتوفیتها روی لایه شاخی پوست، ناخن، موونیز رشدشان روی کراتین در آزمایشگاه و استفاده از آن بعنوان تنها منبع نیتروژنی بعلت آنزیمهای موجود در آنها است که درماتوفیتها را قادر به تولید آن از مواد آلی و مقاومی چون کراتین می‌سازد. تاریخچه موجود نشان دهنده مطالعه محققین بسیاری در مورد سیستم آنزیمی درماتوفیتها به روشهای گوناگون می‌باشد ولی بررسی اخیر بر روی فعالیت آنزیمی در سه گونه ت- روبروم، ت- منتاگروفایتیس و وت - وروکوزوم بروش API برای اولین بار انجام گرفته و نتایج بررسی نکات حائز اهمیتی را نشان داده است.

مشاهده فعالیت اسید فسفاتازوآلکالن فسفاتاز در هر سه گونه درماتوفیت مورد بررسی نتایج هولوبارومیل (۱۱) را تائید می‌کند با این تفاوت که آنها فعالیت آلکالن فسفاتازت - وروکوزوم را دو برابر بیشتر ازت - روبروم وت - منتگروفایتیس گزارش کردند در حالی که در این بررسی فعالیت یکسان این آنزیم در سوسپانسیون‌های میسلیومی و فعالیت سه و چهار برابر بیشتر به ترتیب در عصاره‌های سیتوپلاسمی ت- روبروم وت - منتاگروفایتیس نسبت به عصاره سیتوپلاسمی ت- وروکوزوم مشاهده گردید. آلکالن فسفاتازدرماتوفیتها شاید از این نظر مهم باشد که این آنزیم فعالیت سرین استرازی داشته و می‌تواند بعنوان استراز فعال شده کیموتاکسیس باشد که توسط بیکروواردو نیز ویلکینسون (۱۸،۴،۳) اهمیت آن شرح داده شده است.

از آنزیمهای لیزوزومی، فسفاتازاسید در عصاره‌های هر سه گونه فعالیت قابل ملاحظه‌ای نشان داد و فقط سوسپانسیون میسلیومی ت- منتاگروفایتیس فعالیت بیش از عصاره سیتوپلاسمی‌اش را دارا بود.

وجود فعالیت آنزیمهای لیزوزمی چون فسفاتاز اسید، β- گلوکزیداز، α- مانوزیداز قابل توجه است زیرا توسط آنها قابلیت نفوذ جدار سلولهای عروق تغییر یافته و این مسئله در مهاجرت لوکوسیتها نقش بسزائی دارد و شاید مکانیسم آن همانی باشد که اسپکتور (۱۵) شرح داده است یعنی هضم آنزیمی تشکیلات سلولی و بافتی که اغلب متشکل از پروتئینهای طبیعی، لیپیدها، کربوئیدرات‌ها و گلیکوزآمینوگلیکانها هستند در بدن منجر به ایجاد پپتیدها، قندها،

اسیدهای چربی می‌شود که باعث تشدید مهاجرت سلولهای آماسی می‌گردند و در این عمل پپتیدهای حاصل نقش حائز اهمیتی دارند چون بجای آنکه فاکتور کیموتاکتیک[1] باشند بعنوان یک و ازواکتیو[2] عمل می‌کنند. علاوه بر آن وجود N استیل β-گلوکزآمینیداز با فعالیت ۴۰٪ درت - روبروم و به میزان کمتر در دو گونه حیوان دوست دیگر بخصوص ت- وروکوزوم قابل تعمق است. چراکه این ترکیب باعث فعال کردن کمپلمان از طریق آلترناتیو شده[3] و منجر به ایجاد واکنشهای آماسی مزمن می‌گردد و احتمالا یکی از دلایل ایجاد ضایعات مزمن توسط ت- روبروم فعالیت زیاد این آنزیم باشد.

چه ته وی و همکاران (۵) در مطالعات خود برروی فعالیت پروتئولیتیکی عصاره‌های سیتوپلاسمی ت- روبروم، ت- منتاگروفایتیس وت - وروکوزوم هیدرولیزا سترها و پپتیدها را گزارش کردند. بررسی اخیر نیز فعالیت ۳۰٪ استراز (C4) را در عصاره‌های سیتوپلاسمی ت- روبروم و ت- منتاگروفایتیس و ۱۰٪ در ت - وروکوزوم نشان داد. مضافاً بـه اینکه در سوسپانسیون میسلیومی آنها فعالیت آنزیم مزبور فقط ۱۰٪ بود.

از طرف دیگر استرازلیپاز (C8) ۲۰٪ در عصاره ت- روبروم و ۳۰٪ در عصاره ت- منتاگروفایتیس و ۴۰٪ در عصاره ت- وروکوزوم فعالیت داشته در حالیکه فعالیت همین آنزیم در سوسپانسیون میسلیومی ت- روبروم و ت - منتاگروفایتیس کمتر از عصاره‌های آنها بوده و درت - وروکوزوم برابر عصاره سیتوپلاسمی‌اش فعالیت نشان داده است.

1 - Chemotactic

2 - Vasoactive

3 - Alternative pathway

کتابنامه

۱- زینی، فریده. زرچی، مهران (۱۳۶۷): فعالیت آنزیمی استرینهای پیگمان دار و فاقد پیگمان ترایکوفایتون ویولاسئوم. مجله بهداشت ایران سال هفدم، شماره ۱تا۴، صفحات ۲۲-۱۱.

2. Asahi, M., Lindquist, R., Fukuyama, K.; Aposaca, G., Epstein, W.L. & Mckerrow, J.H. (1985). Purification and characterization of major extracellular proteinases from T. rubrum. Biochem. J. 232:139-144.
3. Becker, E.L. (1971): Biochemical aspects of the polymorphonuclear response to chemotactic factors. Biochemistry of the acute allergic reaction. P.234, Edited by K.F.Austen and E.L.Becker. Blackwell, Oxford and Edinburgh.
4. Becker, E.L. (1969): Enzymatic mechanisms in complement-dependent chemotaxis. Federation Proceedings, 28,1704-1709.
5. Chattaway, F.W.; Ellis, D.A. and Barlow, A.J.E. (1962): Peptidases of Dermatophytes. J.Invest. Dermatol., 38:31-37.
6. Collins, J.P.; Grappel, S.F.& Blank, F.F. (1973): Role of Keratinases in dermatophytosis. II. Fluorescent antibody studies with keratinase II of T. mentagrophytes. Dermatologica, 146, 95-100.
7. Des, S.K. and Banerjee, A.B.1978: Lipolytic enzmes of Trichophyton rubrum. Subouraudia, 15:313-323.
8. Davies, R.R.& Zaini, F. (1984): Enzymatic activities of Trichophyton rubrum and the chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes. Sabouraudia, 22,235-241.
9. Eleuterio, M.K.; Grappel, S.F.; Caustic, C.A. &Bland, F. (1973): Role of keratinases in dermatophytosis. III. Demonstration of delyed hyper sensitivity to keratinases by the capillary tube migration test. Dermatologica, 147, 255-260.
10. Grzywnowicz, G.; Loborzewski, J.; Wawrzkiwicz, K.&Wolski, T. (1989): Comparative characterization of proteolytic enzymes from T. galinae and T. verrucosum. J.Med veterin. Mycol. 27:319-328.
11. Holubar, V.K&Male, 0.(1967): Zur verwertbarkeit enzymhistochemischer mothodea fur die systematisierung houtpathologene pilze. Acta Histochem. Bd., 27(5):303-308.

12. Kunert, J.Kasafirek, E. (1988): Preliminary characterization of extracellular proteolytic enzymes of dermatophytes by chromogenic substrates. J.Med.Veterin. Mycol. 26:187-194.

13. Minocha, Y.;Parsicha, J.S.;Mohapatra, L.N. & Kanahari, K.C. (1972): proteolytic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. Sabouraudia, 10:79-58.

14. Sanyal, A.K.; Das, S.K.& Banerjee, A.B. (1985): Purification and partial characterization of an extracellular proteinase from T. rubrum. Sabouraudia, 23:165-178.

15. Spector, W.G. (1951): The role of some peptides in inflammation. J. pathol. Bacteriol. 63:93.

16. Takatori, K., Udagawa, S.; Kurata, H. & Hasagawa, A. (1983): Microscopic observation of human hairs infected with Microsporum ferrugineum. Mycopathologia, 81:129-133.

17. Takiuchi, I.; Higuchi, D.; Sei, Y. & Koga, M. (1982): Isolation of an extracellular proteinase (Keratinase) from Microsporum canis. Sabouraudia, 20:281-288.

18. Wilkinson, P.C. (1974): Chemotaxis and inflamation. 214 PP. Churchill Livingston, Edinburgh and London.

19. Yu.R.J.; Harmon, S.R. and Blank, F. (1969 a): Hair digestion by a keratinase of T.mentagrophytes. J. Invest. Dermatol. 53:166-171.

20. Yu.R.J.; Harmon,S.R.; Wachter, P.E. and Blank, F. (1969 b): Amino acid composition and specificity of a keratinase of T. mentagrophytes. Arch. Biochem. Biophys., 135:363-370.