

اثرات ضد سرطانی پلی ساکارید گلوکان قارچ فوزاریوم SPP و آنالیز شیمیایی آن با روش های FT-IR و HPLC

بهزاد صالحی^۱، منصور بیات^{۱*}، مهروز دزفولیان^۲، آذر سبکبار^۲، بهمن تبرایی^۳

چکیده

ژن p53، مایتوزنها، پیری سلولها (Aging)، موتاسیون درژنها، نقص در کنترل مرگ برنامه ریزی شده (Apoptosis)، کوتاه شدن تلومر، عوامل شیمیایی، عوامل فیزیکی، ویروسها و باکتریها، رژیم غذایی و عوامل داخلی اشاره کرد. (۱، ۲) شیوع و فراوانی مرگ و میر در اثر سرطان در جهان در سال ۲۰۱۸ به ۹/۶ میلیون نفر رسید (۳). و در ایران در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۷ یکصد و هشتاد هزار به سرطان شناسایی گردید که از این میان پنجاه و شش هزار نفر فوت کردند. (۴) پیشگیری مهمتر از درمان است، تقریباً ۳۰-۵۰ درصد سرطان های رایج رامیتوان با پرهیز از عوامل خطر مهار نمود: عدم استفاده از سیگار و تنباکو و حتی تنباکوی بدون دود، عدم استفاده از الکل، رژیم غذایی سالم مثل: استفاده زیاد از میوه و سبزیجات، جلوگیری از افزایش وزن و چاقی، انجام فعالیت های فیزیکی، جلوگیری از پرتو های ماورای بنفش و یونیزان، کاهش آلودگی هوای شهری، پرهیز از سوخت های فسیلی در خانه، عدم آمیزش جنسی با افراد مبتلا به ویروس پاپیلوما ی انسانی (HPV)، هپاتیت B، هپاتیت C، واکسیناسیون در برابر ویروس پاپیلوما ی انسانی و هپاتیت B (۵). درمان سرطان ها به روش های مختلفی انجام می شود: جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی، هورمون درمانی، ژن درمانی، ایمونوتراپی، درمان هدف گیری شده، پیوند سلول های بنیادی، استفاده از برخی ویروس ها مانند: ادنو ویروس ها و پاپیلوما ویروس ها می توان اشاره کرد. (۲، ۶). هزینه درمانی بالا، عوارض جانبی زیاد، از بین رفتن سلولهای سالم بدن، طولانی بودن درمان از جمله معایب این روشها است. یافتن راههای جدید

امروزه سرطان بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸ دومین عامل مرگ و میر در جهان می باشد. استفاده از پلی ساکارید های قارچی یکی از راه های ارزاتر، کم خطر تر و با عوارض جانبی کمتر و جدیدتر در پیشگیری و درمان سرطان می باشد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی قارچ فوزاریوم بومی از خاک های کرج و استخراج پلی ساکارید گلوکان و تعیین ویژگی های شیمیایی آن با روش های FT-IR و HPLC و نقش ضد سرطانی آن بر روی سلول های لنفویدی (LCL) و هلا (Hela) می باشد. در این مطالعه نمونه قارچ فوزاریوم از خاک منطقه کرج جداسازی گردید و به روش میکروسکوپی و ماکروسکوپی و ژنتیکی در حد جنس شناسایی شد. و سپس قارچ در محیط کشت مایع انتخابی برای تولید بیشترین مقدار توده قارچی برای استخراج گلوکان کشت گردید. گلوکان قارچ به روش آب جوش مورد استخراج قرار گرفت. مقادیر مختلفی از گلوکان استخراج شده را به کشتهای سلولی LCL و Hela اضافه شد و اثرات سایتوتوکسیسته آن بررسی شد. نتایج کشت نشان داد پلی ساکارید گلوکان نقش ضد سرطانی بر روی سلول های لنفویدی داشت اما بر روی سلول های هلا اثر ضد سرطانی نداشت. اثرات سایتوتوکسیسته پلی ساکارید گلوکان با روش کالریتری (MTT) نشان داده شد.

واژگان کلیدی: فوزاریوم، استخراج گلوکان، کشت سلول، HPLC، FT-IR.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱

مقدمه

سرطان بیماری است که در آن سلولها بطور غیر عادی و بدون کنترل تقسیم می شوند رشد می کنند و توده سلولی ایجاد میکنند که می تواند خوش خیم (Benign) و محدود به یک بافت باشد و نیز میتواند مهاجرت (Metastasis) کند و بافتهای دیگر را سرطانی نماید که در این حالت به آن بدخیم (Malignant) می گویند (۱). بروز سرطان علت های زیادی دارد که از آن میان می توانیم به: ژنهای سرطان زا (oncogenes)، اختلال در ژنهای مهارکننده تومور، اختلال در

* ۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
dr_Mansour_bayat@yahoo.com

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، بایران
۳- دانشجوی پاستور ایران، تهران، ایران

میکنند. اما بیماری در افرادی که نقص سیستم ایمنی دارند و یا به طریقی سیستم ایمنی ضعیف شده دارند مثل: نوتروپنی، عفونتهای فوزاریومی مهاجم بدن و گردش خون را ابتلا می نماید که مربوط است به این گونه ها: فوزاریوم سولانی، فوزاریوم اکسیسپوروم، فوزاریوم ورتیلوییدز و فوزاریوم پرولیفراتوم. در اروپا و آمریکای شمالی از فوزاریوم و نانتوم به عنوان غذا تحت عنوان کورن (Quorn) عرضه میشود. از نظر میکروبیولوژی غذایی دارای اهمیت است زیرا برخی گونه های آن توکسین قارچ (Mycotoxin) تولید میکنند، نظیر: تریکوتسین (Trichotecen) و فومینسین (Fumonisin) که می تواند از طریق محصولات زراعی مانند: گندم، جو، ذرت، برنج، بادام زمینی، دانه های روغنی، پنبه دانه، وارد رژیم غذایی شده و موجب بیماری مایکوتوکسیکوزیس گردد، که دارای علامت های زیر است: دل درد، تهوع، استفراغ، اسهال، خستگی، تب و لرز، ضعف عضلانی، کاهش مغز استخوان، کاهش گرانولوسیتها، عفونت ثانویه، زخم لارنژیت، خونریزی زیر پوستی، مدفوع خونی و سیاه، اسهال خونی، هماتوری، استفراغ خون، خونریزی بینی و واژینال و زخم دستگاه گوارش (۱۱). هدف از انجام این تحقیق استخراج گلوکان از قارچ فوزاریوم بومی جدا شده از خاک کرج و تعیین ویژگی های شیمیایی آن با روش های FT-IR, HPLC و شناسایی ژنتیکی قارچ و تعیین خاصیت ضدتوموری آن بر دو رده سلول های سرطانی لنفوییدی LCL و کارسینوماى Hela بود.

مواد و روش کار

جداسازی و شناسایی قارچ فوزاریوم

نمونه خاک بطور تصادفی از خاک منطقه کرج نمونه برداری شد، و بوسیله سریال دایلویشن ده لوله ای تهیه رقت به عمل آمد و از رقتهای بدست آمده در پلیت های سا بورودکستروز اگر حاوی انتی بیوتیک کلرامفنیکل کشت ایزوله خطی

کم خطرتر، ارزاتر، با عوارض جانبی کمتر و موثرتر از ضروریات این تحقیق است. گلوکان یک پلی ساکارید است که از واحد های منومری گلوکز تشکیل شده است که بیشترین پلی ساکارید تشکیل دهنده قسمت بیرونی دیواره سلولی در اکثر قارچها می باشد و معمولا از طریق پیوندهای گلیکوزیدی بین کربن شماره ۱ با کربن شماره ۳ و ۶ گلوکز بعدی ارتباط برقرار می کند. استفاده از گلوکان قارچهای خوراکی در تقویت سیستم ایمنی ذاتی و حذف سلولهای سرطانی در برخی مقالات اشاره شده است. (۶، ۷). نقش تحریک کنندگی گلوکان قارچی بر روی سلولهای NK cells، B cells و T cells نیز مشاهده گردید. (۸). برخی فعالیتهاى ضد توموری گلوکان تولید سایتوکاین و نیتریک اکسید است. (۹). و نیز کاهش دهنده گلوکز و کلسترول خون می باشد. (۱۰). گلوکان و برخی دیگر از پلی ساکاریدهای قارچی از طریق اتصال به گیرنده هایی نظیر: TLRS, Dectin, Mannose, CR3, CD4 می توانند سیستم ایمنی را با تکثیر و تمایز ماکروفاژها و سلولهای دندریتیک تحریک نمایند. از این رو با فعال کردن مسیر های مختلف سیستم ایمنی نظیر: فاگوسیتوز، سیستم کمپلمان، انفجار تنفسی، بروز التهاب، آپوپتوزیس، فعال کردن سلولهای موثر ضد توموری، فعال کردن سلولهای عرضه کننده آنتی ژن منجر به آغاز پاسخهای ایمنی سلولار و هومورال میگردد. (۹ و ۸). قارچ فوزاریوم یک جنس بزرگ از قارچهای شاخه آسکومایکوتا و زیرشاخه پزیزومایکوتینا ورده سورداریومیست ها و راسته هیپو سرال ها و خانواده تتریاسه می باشد. قارچ فوزاریوم یک قارچ ساپروفیت و بیماریزای فرصت طلب است در خاک به فراوانی وجود دارد، درگندم و جو ایجاد بیماری میکند. که عامل ان فوزاریوم گرامینه روم نامیده میشود. عامل بیماری پاناما درموز فوزاریوم اکسیس پوروم نامیده میشود. در انسان عفونت ناخن (onychomycosis) و عفونت قرنیه (keratitis) ایجاد

اضافه گردید و سپس DNA حاصل در فریزر نگهداری گردید (۱۲).

PCR برای ناحیه ژن 18SrRNA و تعیین توالی آن

تکثیر ژن 18SrRNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز و آنزیم Taq DNA پلیمرز و با استفاده از پرایمر های جهانی قارچی فوروارد و ریورس انجام شد. (<http://aftol.org/resources.php>)

0817F(5-TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA-3).

1196R(5-TCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3)

این روش با استفاده از ترمو سایکلر (اپندورف المان) در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر و ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA و ۱۰ میکرومول از هر پرایمر، ۱۰ میکرومول dNTPs و ۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR و ۰/۲۵ واحد از Taq DNA polymerase از کیت فرمنتاز انجام گردید. شرایط واکنش PCR، دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ دقیقه و ۴۰ سیکل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر در ۵۲ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ دقیقه و دمای گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد (v/w) حاوی ۱۵ میکرولیتر رنگ DNAsafe (stain) و با استفاده سیستم فلوریورسانس uv مشاهده گردید. و سپس جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن اوران ارسال گردید.

کشت قارچ فوزاریوم و استخراج پلی ساکارید گلوکان: ابتدا قارچ فوزاریوم در پلیت محیط کشت

بدست آمد و به مدت ۳-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و کلونیهای تک قارچی از طریق میکروسکوپی مورد مشاهده قرار گرفتند و کلونیهای مربوط به قارچ فوزاریوم به روش کشت روی لام و کشت در پلیت بطور میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفت.

شناسایی مولکلی قارچ

استخراج DNA قارچ: ابتدا ۱ نمونه ایزوله شده قارچ را در محیط کشت شیبدار سابورودکستروز اگر کشت شد. سپس بوسیله پیپت پاستور کل محتویات لوله را به داخل لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل گردید و نمونه را به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰ g سانتریفوژ گردید، و با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز DNA قارچ به روش زیر استخراج گردید: بعد از سانتریفوژ نمونه رویه دور ریخته شد و سلولها با کمک پیپت پاستور به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. به نمونه ها ۴۰۰ میکرومول لایزین بافر اضافه شد و بمدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. بلافاصله به آن ۶۰۰ میکرومول کلروفرم اضافه شد و سه تا پنج بار سروته کردن کاملا مخلوط گردید و سپس در دور ۱۰۰۰۰ g بمدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد تا دو فاز ایجاد گردد. در این بین محلول پرسپیبتاسیون تهیه شد و فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید و به آن ۸۰۰ میکرولیتر از محلول تازه تهیه شده پرسپیبتاسیون اضافه شد و کاملا سروته شد و پنج دقیقه در داخل اتاق گذاشته شد و میکروتیوب رابه مدت دودقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. رویه را دور ریخته و رسوب DNA را در ۱۰۰ میکرومول کلرید سدیم حل گردید، چند بار ورتکس کرده تا رسوب کاملا حل گردید، بعد ۳۰۰ میکرومول اتانل سرد و ده دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ گردید، اتانل راتخلیه کرده و اجازه داده شد تا باقیمانده اتانل خشک شود و پس از خشک شدن ۱۰۰ میکرومول اب مقطر دی یونیزه

استخراج شده با استونیتریل مخلوط گردید و فاز تحرک A بدست آمد و سپس بافر نمکی فسفات ۰/۱ درصد با PH3 بعنوان فاز B تهیه شد و به نسبت حجمی ۱۵:۸۵ یا A:B در دمای آزمایشگاه و با جریان ۰/۵ میکرولیتر بر دقیقه و با حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و در طول موج ۲۰۰ نانومتر و زمان حرکت ۵ دقیقه انجام گرفت. (۱۴).

کشت سلولهای HeLa و LCL و تست سایتوتوکسیسیته: برای بررسی میزان سایتوتوکسیسیته از سل لاین های دودمان لنفوئیدی (LCL) و HeLa استفاده گردید. این سلولها در داخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای کشت شدند.

شرایط کشت: محیط کشت RPMI و FBS ده درصد دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دی اکسید کربن ۵ درصد به تعداد صد هزار سلول برای LCL که رده سلولی معلق هستند و سلول های HeLa به تعداد هشتاد هزار که یک رده سلولی چسبان هستند سپس محلول استوک با حل کردن ۲۰ میلی گرم گلوکان در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد و ۳ قطره هیدروکسید سدیم ۱۰ درصد اضافه شد سپس غلظت های ۱ و ۲ و ۳ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر گلوکان به سلولها اثر داده شد و بمدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از آن به سلول ها ۵۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده شد و به مدت سه ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. (۱۵، ۱۶).

نتایج

شناسایی قارچ: با مشاهده اسلاید کالچرهای بدست آمده با کاتن بلو با میکروسکوپ هیف هایی با دیواره عرضی و ماکروکنیدی های هلالی و دوکی شکل چهار و پنج قسمتی با انتهای کشیده که از ویژگی های قارچ فوزاریوم است بدست آمد. (نگاره ۱).

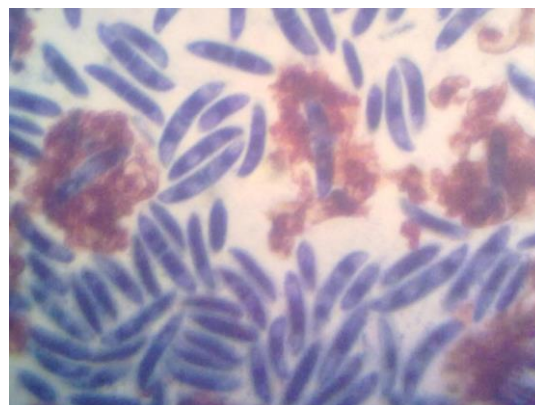
سابارودکستروز اگر کشت شد بمدت ۵-۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. از کلنی های رشد کرده در این پلیت به اندازه یک دیسک شش میلیمتری به عنوان یکدانه تلقیح به محیط کشت سابارودکستروز برات به حجم ۲۵۰ میلی لیتری درارلن به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر با مقدار ۲۰ درصد گلوکز کشت گردید و به مدت ۱۰-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار (۱۵۰ rpm) قرار داده شدت و بیشترین توده قارچی بدست آمد. بعد از طی دوره انکوباسیون توده میسلیموم قارچی از محیط کشت مایع با استفاده از فیلتر های واتمن شماره ۱ جدا گردید و چند بار با آب مقطر استریل و سه بار با بافر نمکی فسفات شستشو و سانتریفوژ گردید و سپس به روش آب جوش (Mizuno) استخراج گردید. (۱۳).

سنجش پروتئین و DNA در پلی ساکارید استخراج شده میزان خلوص پلی ساکارید استخراج شده به وسیله اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۳۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر به ترتیب برای وجود پروتئین و DNA ارزیابی شد.

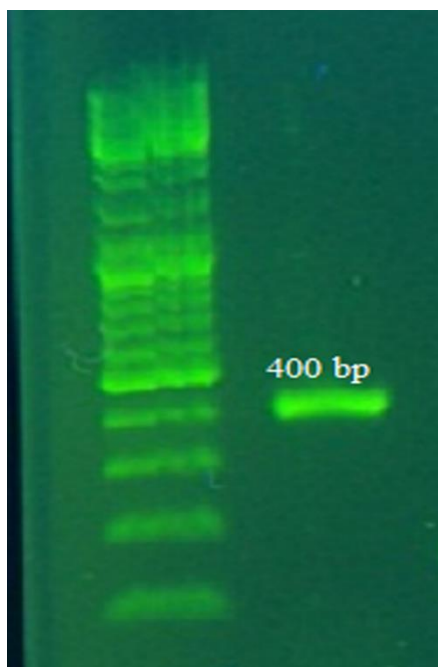
آنالیز پلی ساکارید گلوکان استخراج شده بوسیله طیف سنجی مادون قرمز روش فوریه (FT-IR): برای بررسی ساختار این پلی ساکارید و تعیین گروههای جانبی موجود در آن ابتدا پلی ساکارید آبیگری شد با قراردادن نمونه در اتاقک خلا حاوی پنتوکسید و انادیوم و سپس بانمک KBr کوبیده شده و در دستگاه قرارداد شده و در فرکانس محدوده بین ۴۰۰۰-۵۰۰ cm⁻¹ طیف آن بدست آمد.

آنالیز پلی ساکارید استخراج شده بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): با استفاده از دستگاه HPLC (مارک Perkin Elmer سری ۲۰۰) و با استفاده از ستون C18 و دتکتور (UV visible) ۰/۳ گرم پلی ساکارید

NCBI مورد مقایسه قرار گرفت و جنس فوزاریوم تایید گردید و با رسم درخت فیلوژنتیکی جایگاه آن در ژن 18SrRNA: ۲- P 6- S۳- X۱- Fusarium S P ۸۸ بدست آمد (۱۲).

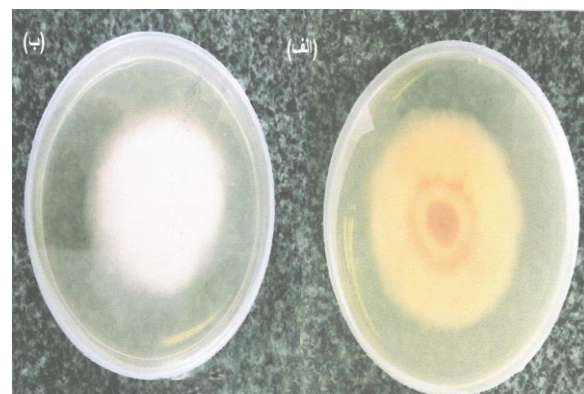


نگاره ۱- ساختمان میکروسکوپی قارچ فوزاریوم



نگاره ۳- ژل الکتروفورز ژن 18srRNA

نتایج حاصل از کروماتوگرام FT-IR پلی ساکارید گلوکان استخراج شده: همانطور که کروماتوگرام نشان میدهد انواع گروههای جانبی موجود در مولکول عبارتند از: نوار جذبی در ناحیه ۳۴۲۳/۷۹ مربوط است به ارتعاش لرزشی گروه هیدروکسیل انتهایی و نوار جذبی در ۲۹۲۳/۰۷ مربوط است به گروههای متیلن جانبی و نوار جذبی در ناحیه ۱۶۲۹/۶۴ مربوط است به H-O-H و نوار جذبی در ناحیه ۱۴۳۷/۶۱ مربوط است C-C و نوار جذبی در ناحیه ۱۳۸۰ مربوط است به چرخش H-C متیل متقارن و نوار جذبی در ناحیه ۱۰۲۰/۶۱ مربوط است به گروههای C-H داخلی و نوار جذبی در ناحیه ۸۷۵/۲۲ مربوط است به گروههای C-H خارجی است (۱۷). که تایید کننده مولکول گلوکان است. (نمودار ۳)



نگاره ۲ (الف) و (ب). ویژگی های میکروسکوپی قارچ فوزاریوم (الف) نمای پشت پلیت و (ب) نمای سطح پلیت

شناسایی ژنتیکی قارچ: پس از استخراج DNA قارچ و PCR برای ژن 18srRNA باندی به طول ۴۰۰ bp در ژل الکتروفورز بدست آمد (نگاره ۳) سپس بعد از ارسال نمونه برای توالی یابی و دریافت کروماتوگرام های فوروارد و ریورس توالی ها با نرم افزار Bioedit مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس با توالی های موجود در پایگاه Blast مرکز

File: sample_F_18s_R-F.ab1



Sample Name: sample_F_18s_R-F

Signal Strengths: A = 7695, C = 9473, G = 4129, T = 7841

Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob

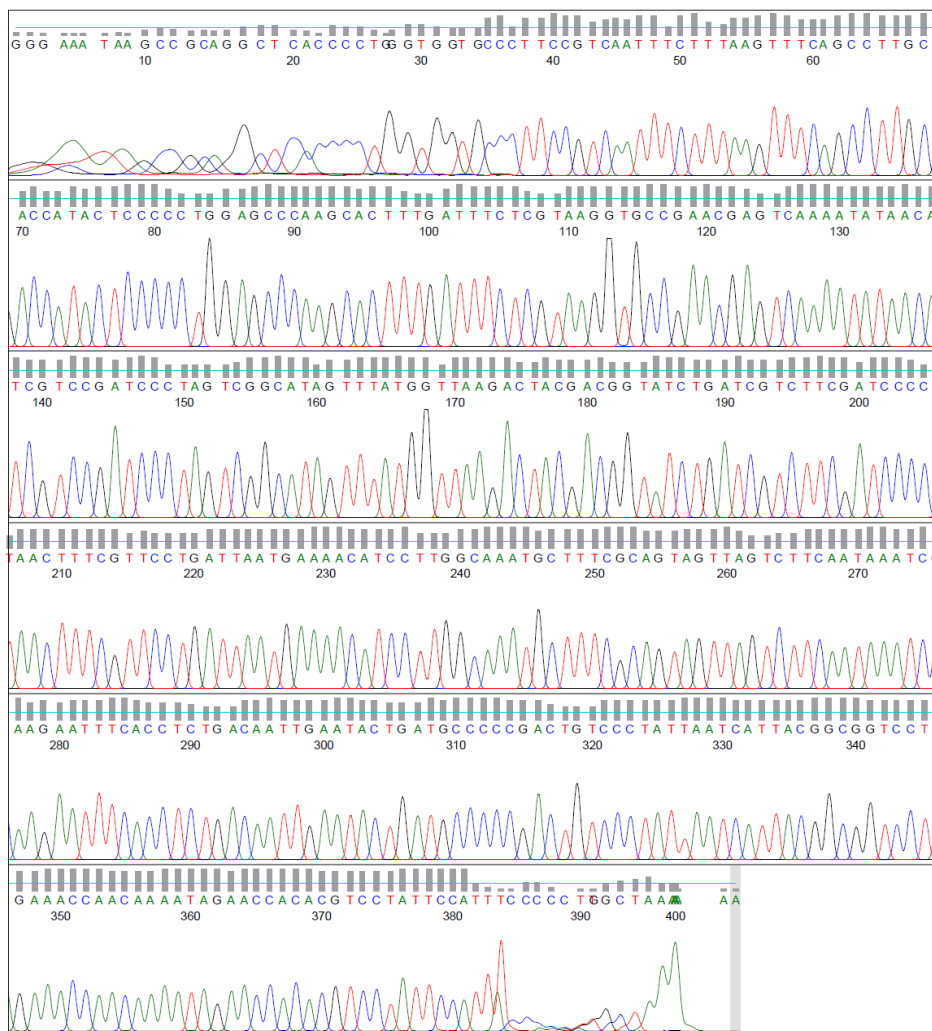
Lane/Cap#: 5

Spacing: 15.5605

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Jul 13, 2014 11:20PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

نمودار ۱ - کروماتو گرام ریورس ژن ۱۸ SrRNA

File: sample_F_18s_F-F.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: sample_F_18s_F-F

Signal Strengths: A = 5272, C = 4548, G = 3083, T = 3795

Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob

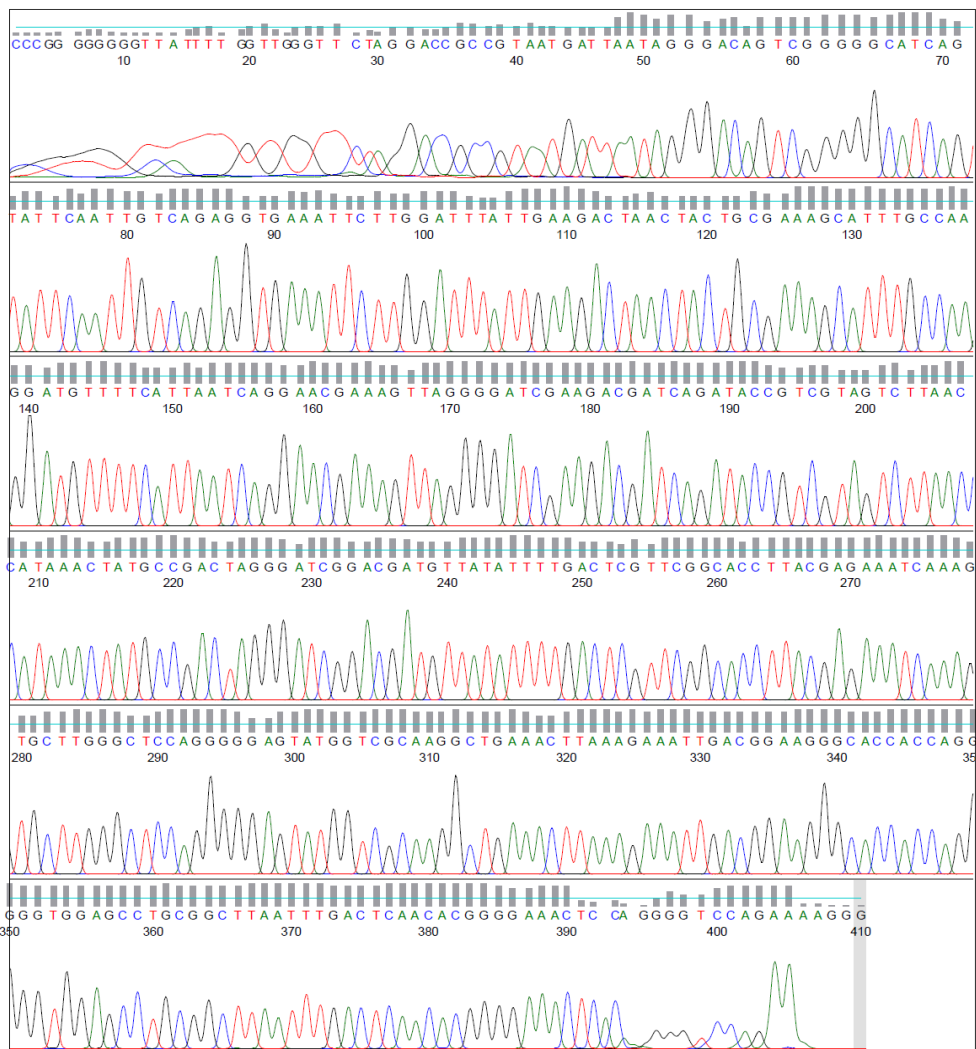
Lane/Cap#: 7

Spacing: 15.4615

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Jul 14, 2014 1:14PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

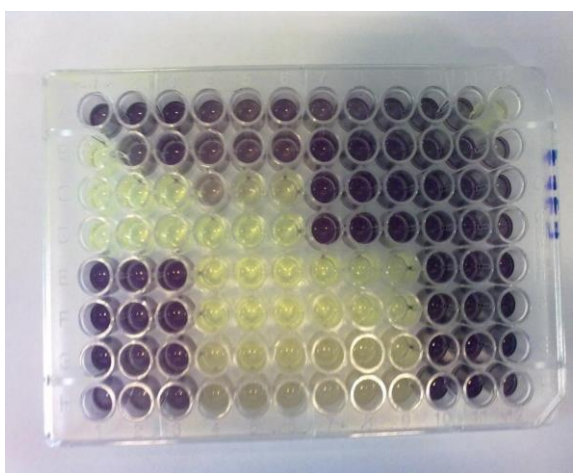
نمودار ۲ - کروماتوگرام فوروارد ژن SrRNA ۱۸

ناحیه ۳۴۲۳/۷۹ مربوط است به ارتعاش لرزشی گروه هیدروکسیل انتهایی و نوار جذبی در ۲۹۲۳/۰۷ مربوط است به گروه های متیلن جانبی و نوار جذبی در ناحیه ۱۶۲۹/۶۴ مربوط است به H-O-H و نوار جذبی در ناحیه ۱۴۳۷/۶۱ مربوط است C-C و نوار جذبی در ناحیه ۱۳۸۰ مربوط است به

نتایج حاصل از کروماتوگرام FT-IR پلی ساکارید گلوکان استخراج شده

همانطور که کروماتوگرام نشان میدهد انواع گروه های جانبی موجود در مولکول عبارتند از: نوار جذبی در

نتایج حاصل از تست سایتوتوکسیسیته MTT، نمک تترازولیوم زردرنگ می باشد که تنها در صورت سلامت میتوکندریها به فورمازون ارغوانی رنگ تبدیل میشود. بنابر این تولید فورمازون ارغوانی با تعداد سلولهای زنده و میتوکندریهای سالم موجود متناسب است. مقدار رنگ ایجاد شده بوسیله الیزا ریدر در طول موج ۵۵۳ نانومتر خوانده شد. نتایج حاصل نشان داد گلوکان استخراج شده دارای تاثیرات سایتوتوکسیک بر روی رده سلولی Hela نمی باشد، ولی بر روی رده سلولی LCL تاثیرات سایتوتوکسیک مشخصی را نشان داد. (نگاره ۴) (۱۸).

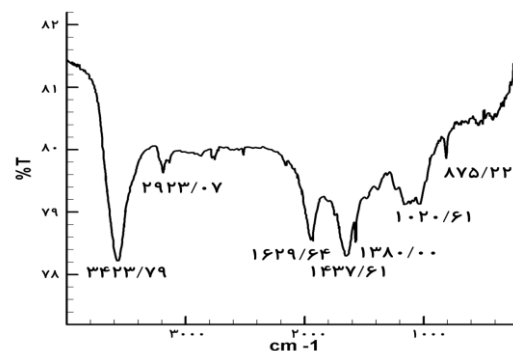


نگاره ۴- تست MTT برای سل لاین های LCL و Hela رنگ ارغوانی سلولهای سرطانی سالم و رنگ زرد سلولهای سرطانی از بین رفته در واکنش با معرف تترازولیوم

بحث

در این تحقیق جداسازی قارچ از نمونه خاک به روش غربالگری اولیه و بدست آوردن کلونهای تک و شناسایی میکروسکوپی و ماکروسکوپی قارچ انجام گرفت. به منظور جلوگیری از رشد باکتریها در پلیت از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل استفاده شد. شناسایی ژنتیکی قارچ با استفاده از ژنهای ۱۸S rRNA انجام شد. که توالی های حفاظت شده ای

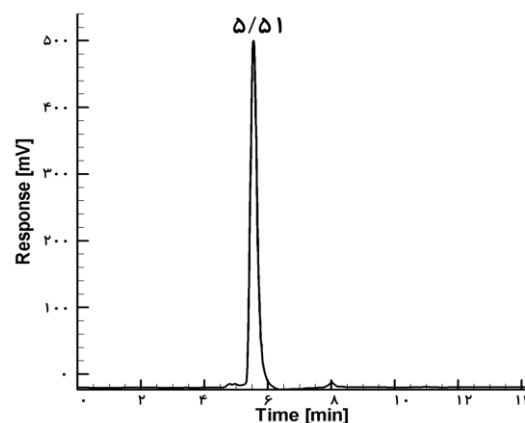
چرخش H-C متیل متقارن و نوار جذبی در ناحیه ۱۰۲۰/۶۱ مربوط است به گروههای C-H داخلی و نوار جذبی در ناحیه ۸۷۵/۲۲ مربوط است به گروههای C-H خارجی است (۱۷). که تایید کننده مولکول گلوکان است. (نمودار ۳)



نمودار ۳- کروماتوگرام FT-IR پلی ساکارید گلوکان قارچ فوزاریوم

نتایج بدست آمده از کروماتوگرام HPLC

پس از انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از نمونه پلی ساکارید بالا ترین peak بدست آمده در محدوده بین ۵ و ۶ دقیقه به دست آمد که تاییدی بر گلوکان است. (۱۸) (نمودار ۴).



نمودار ۴- کروماتوگرام HPLC پلی ساکارید گلوکان قارچ فوزاریوم

جانبی موجود در منومر گلوکز مشابه است و بیانگر خواص فیزیکی شیمیایی آن مثل ویسکوزیته و گروه های عامل آن که در اتصال به سلول نقش دارند. (۱۷). در این تحقیق از سلول های لنفوئیدی LCL و HeLa استفاده گردید. سلول های LCL همان سلول هایی هستند که در سرطان سیستم لنفوی (Lymphoma) نقش دارند و به دو گروه لنفومای هوچکینی و غیر هوچکینی طبقه بندی میشوند. علت سرطانی شدن این سلولها ویروس EBV (Epstein Barr Virus) می باشد. سلول های HeLa از سلولهای سرطانی گردن رحم خانم هنریتا لک (Henrieta Lack) در سال ۱۹۴۱ بدست آمد و قدیمی ترین سلول سرطانی است که در تحقیقات مختلف از آن استفاده شده است. علت سرطانی شدن این سلول ویروس پاپیلومای انسانی است. (Human papiloma = HPV virus) میباشد. در تحقیقات دیگر از سلول های مختلف استفاده شده است. مثلاً Chan et al در سال ۲۰۰۸ و Hsu et al در سال ۲۰۱۱ از سلول های THP-1 برای مشاهده آپوپتوزیس سلولهای سرطانی روده استفاده کردند. و Yang et al در سال ۲۰۱۶ از سلول های S180 برای مشاهده اثرات ضد سرطانی پلی ساکاریدی قارچی فلینوس پولوس استفاده کردند. با بررسی اثرات گلوکان قارچ فوزاریوم بر روی این دو رده سلولی مشخص گردید که این پلی ساکارید بر روی سلولهای LCL دارای اثر ضد سرطانی است ولی بر روی سلولهای HeLa فاقد اثر ضد سرطانی بود وقتی که با اینورتن میکروسکوپ سلول های LCL مشاهده شد کاهش بسیار زیادی در سلولهای سرطانی دیده شد. سنجش توکسیسیته با استفاده از تست MTT انجام گرفت که با سایر تحقیقات همخوانی دارد. علت این تفاوت در عملکرد و نتیجه گیری می تواند مختلف باشد. مثلاً یکی تفاوت در نوع ویروسی که در سرطانی شدن این سلولها دخالت داشته

هستند به طول ۴۰۰bp که بین توالی های ITS1, ITS2 قرار دارند برای شناسایی قارچ ها در حد جنس استفاده می شود. و با استفاده از پرایمرهای مذکور استفاده گردید. توالی های این ژن بدست آمد و باتوالی های موجود در بانک ژنی مورد مقایسه قرار گرفتند و جایگاه فیلوژنتیک قارچ در جنس فوزاریوم شناسایی گردید. برای کشت قارچ فوزاریوم به منظور تولید بیشترین مقدار پلی ساکارید گلوکان در محیط مایع سابورودکستروز برات با تغییر مقدار گلوکز بهینه سازی برای افزایش میزان گلوکان انجام شد. در این تحقیق چون هدف تولید بیشتر گلوکان است و منومر آن گلوکز است از این رو مقدار گلوکز دو برابر در نظر گرفته شد. برای حذف پلی ساکاریدهای محیط کشت مایع چندین بار توده قارچی با آب مقطر استریل و بافر نمکی فسفات شستشو شد سپس با روش Mizuno (۱۳). برای استخراج گلوکان استفاده شد.

فوزاریوم یک قارچ رشته ای و ساپروفیت است که در رده آسکومیست ها طبقه بندی می گردد و در این تحقیق استفاده شده است اما در برخی مطالعات انجام شده مانند Hsu et al و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Elain و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Meng و همکاران در سال ۲۰۱۶ از قارچهای خوراکی مختلفی استفاده کردند. (۶, ۷, ۱۹). تمایز این تحقیق با سایر تحقیقات میباشد. در این تحقیق برای آنالیز پلی ساکارید قارچی از تکنیک های HPLC, FT-IR استفاده شد. اما در تحقیقی که توسط Elain و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد از تکنیک های C-NMR و H-NMR و GC-MS استفاده گردید. (۲۰). در تکنیک HPLC بالاترین غلظت بدست آمده گلوکان در محدوده ۵-۶ دقیقه به دست آمد که همانند نتیجه بدست آمده توسط Limin Gao در سال ۲۰۱۴ میباشد. مزیت استفاده از روش FT-IR تعیین گروههای جانبی در ساختمان ملکول گلوکان است که با گروههای

ملکول گلوکان مثل ویسکوزیته، وزن مولکولی آن ربط داد. و Dertli در سال ۲۰۱۸ پی برد که کنفورماسیون مارپیچ سه گانه و حضور گروههای هیدروفیلی در سطح خارجی این مارپیچ در نقش بیولوژیک گلوکان اهمیت دارد. (۱۴). و نقش ضد سرطانی این گلوکان با تحقیقات Cheickna در سال ۲۰۱۲ و Demir در سال ۲۰۰۷ و Liu در سال ۲۰۰۹ و Chen در سال ۲۰۱۱ همسو است.

فهرست منابع

- 1- Engels EA, Biggar RJ, Hall HI, Cross H, Crutchfield A, Finch JL, et al. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *International journal of cancer*. 2008;123(1):187-94.
- 2- Albert B JA, Lewis J, Morgan D, Raff M, Robert K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science: New York. 2015:1091-145.
- 3- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
- 4- Norouzirad R, Khazaei Z, Mousavi M, Adineh HA, Hoghooghi M, Khabazkhoob M, et al. Epidemiology of common cancers in Dezful county, southwest of Iran. *Immunopathologia Persa*. 2018;4(1):7.
- 5- Vogel SM, Smith LV, Peterson EJ. First-Line Therapies for VTE Treatment and Secondary Prophylaxis in Patients With Cancer: A New Direction. *Journal of pharmacy practice*. 2018;0897190018775580.
- 6- Meng X, Liang H, Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate research*. 2016;424:30-41.

است. و اینکه سلولهای LCL به گلوکان پاسخ داده اند و گیرنده های آن را دارند ولی سلولهای Hela به گلوکان پاسخ نداده اند. امروزه مشخص شده است که پلی ساکارید های قارچی از گیرنده هایی که بر روی سلولهای سیستم ایمنی قرار دارند باعث پاسخهای ایمونولوژیکی می گردد. در مطالعه ای که توسط Huang و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام گردید معلوم شد که فعال شدن ماکروفاژها از طریق گیرنده های Dectin-1, TLR2 انجام می گیرد. و در مطالعه ای که توسط Weis و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد معلوم شد که مکانیسم های ضد توموری شامل تحریک Tcells و Nkcells (۲۱) بیان سایتوکاین ها و تولید اکسید نیتریک می باشد. (۹). و در مطالعه ای که توسط Elaine و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت نشان داد که سایتوکاین هایی مانند TNF- α و IL-1B در اثر بتا گلوکان قارچ pleuroteus sajo-caju مشاهده گردید. (۲۱). در مطالعه ای که توسط Huang و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت نشان داد که پلی ساکارید های قارچ گانودرما لوسیدوم توانستند سل لاین های منوسیتی THP-1 رابه سلولهای دندریتیک القا کنند و اگر آنها را با اینترلوکین ۴ و GM-CSF اضافه کنند باعث ترشح سایتوکاین و مرگ سلولی در همان دودمان سلولی میگردد (۸). در مطالعه ای که توسط Carbonero و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام گردید نقش بتا گلوکان قارچی بر روی افزایش مقاومت ایمنی ذاتی در برابر عوامل بیولوژیکی نشان داده شده است. (۲۱). در تحقیق حاضر مشخص گردید که پلی ساکارید گلوکان قارچ فوزاریوم دارای اثر ضد سرطانی بر روی سل لاین های لنفوئیدی هستند و چرایی این اثر مطالعه نشده است از این پلی ساکارید می توان در درمان سرطانهای خونی با منشا لنفوئیدی مورد استفاده قرارداد. علت این خواص را می توان به ویژگی های فیزیکی شیمیایی

- 7- Ren L, Perera C, Hemar Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & function*. 2012;3(11):1118-30.
- 8- Hsu J-W, Huang H-C, Chen S-T, Wong C-H, Juan H-F. Ganoderma lucidum polysaccharides induce macrophage-like differentiation in human leukemia THP-1 cells via caspase and p53 activation. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2009;2011:33.
- 9- Wei S, Helsper JP, Van Griensven LJD. Phenolic compounds present in medicinal mushroom extracts generate reactive oxygen species in human cells in vitro. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2008;10(1).
- 10- Yamac M, Kanbak G, Zeytinoglu M, Senturk H, Bayramoglu G, Dokumacioglu A, et al. Pancreas protective effect of antioxidative Agaricus bisporus extract on rats with streptozotocin induced diabetes. *Int J Med Mushr*. 2010;12(4):379-89.
- 11- Errol Reiss H, Shadomy H, Lyon M. *Mycoses of implantation: fundamental medical mycology*. Hoboken: Wiley-Blackwell. 2012.
- 12- Thomas B, Audonneau NC, Machouart M, Debourgogne A. Molecular identification of Fusarium species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice? *Journal de mycologie medicale*. 2019;29(1):56-8.
- 13- Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of medicinal mushrooms*. 1999;1(1).
- 14- Dertli E, Colquhoun IJ, Côté GL, Le Gall G, Narbad A. Structural analysis of the α -D-glucan produced by the sourdough isolate *Lactobacillus brevis* E25. *Food chemistry*. 2018;242:45-52.
- 15- Matsuda Y, Cho O, Sugita T, Ogishima D, Takeda S. Culture supernatants of *Lactobacillus gasseri* and *L. crispatus* inhibit *Candida albicans* biofilm formation and adhesion to HeLa cells. *Mycopathologia*. 2018;183(4):691-700.
- 16- Scheinfeldt LB, Hodges K, Pevsner J, Berlin D, Turan N, Gerry NP. Genetic and genomic stability across lymphoblastoid cell line expansions. *BMC research notes*. 2018;11(1):558.
- 17- Theis TV, Santos Q, Aparecida V, Appelt P, M Barbosa-Dekker A, Vetvicka V, et al. Fungal Exocellular (1-6)- β -d-glucan: Carboxymethylation, Characterization, and Antioxidant Activity. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(9):2337.
- 18- Salehi B, Bayat M, Dezfulian M, Sabokbar A, Tabaraie B. The assessment of anti-tumoral activity of polysaccharide extracted from terrestrial filamentous fungus. *Saudi journal of biological sciences*. 2018;25(6):1236-41.
- 19- Zhang M, Cui S, Cheung P, Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(1):4-19.
- 20- Carbonero ER, Ruthes AC, Freitas CS, Utrilla P, Gálvez J, da Silva EV, et al. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate polymers*. 2012;90(2):814-9.
- 21- Ferreira SS, Passos CP, Madureira P, Vilanova M, Coimbra MA. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate polymers*. 2015;132:378-96.