جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۳ ، پاییز ۱۳۸۵
صفحات: ۲۵۱ - ۲۵۹

استخراج و تخلیص بتاگلوکان از دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویسیه و تاثیر آن بر فعالیت فاگوسیتوز و ترشح TNF_α در موشهای BALB/c

حجت ا... شکری* Ph.D. ، فرزاد اسدی** Ph.D. ، علیرضا خسروی? Ph.D.

چکیـده

هدف: استخراج و تخلیص بتاگلوکان از دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه بـا روش شـیمیایی انتخـابی و تاثیر آن بر روی فعالیت فاگوسیتوز و ترشح TNF_α در موشهای نژاد BALB/c.

روش بررسی: در ابتدا بتاگلوکان محلول ($glucan-S_1$) به روش استخراج قلیایی-اسیدی از دیواره سـلولی مخمر تهیه شد. پروتئین این فرآورده با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی حاوی ژل دی اتیل آمینو اتیل سفاسل حذف شد ($glucan-S_2$) و سـپس مانـان موجـود در نمونـه حاصـل از مرحلـه قبـل، بـه وسـیله کروماتوگرافی تمایلی با ستونهای حاوی ژل کانکاناوالین-A سفارز زدوده و در نهایت بتاگلوکانهـای خـالص و عاری از کمپلکسهای مانوپروتئینی تهیه شـد ($glucan-S_3$). جهـت ارزیـابی قابلیـت ایمنـی‌زایـی بتاگلوکـان تخلیصی ($glucan-S_3$)، نمونه فوق به صورت داخل صفاقی به موشهای BALB/c تزریق شد. خون موشهای ایمن در روزهای چهارم و هفتم پس از تزریق، به روش پونکسیون قلبی جمـع‌آوری شـده، تحـت آزمایـشات کمی لومینسانس (فاگوسیتوز) و الایزا (سنجش سایتوکین TNF_α) قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس یافته‌های به دست آمده از آزمایش کمی لومینسانس، تجویز داخل صفاقی $glucan-S_3$ به موشـها، باعـث افـزایش معنـی‌دار فعالیـت فاگوسـیتیک نوتروفیلهـا در روز چهـارم (P=۰/۰۰۲) و روز هفـتم (P=۰/۰۰۰۵) در مقایسه با گروه شاهد گردیده است. به عـلاوه، در آزمـایش الایـزا، میـانگین میـزان ترشـح TNFα در موشهای تیمار شده با بتاگلوکان تخلیصی نسبت به موشهای شـاهد، در روزهـای چهـارم و هفـتم افزایش معنی داری را نشان داده است (P=۰/۰۰۰۵).

نتیجه‌گیری: از مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که بتاگلوکان خالص را مـی‌تـوان بـه عنـوان یـک مـاده محرک ایمنی به تنهایی یا به صورت کونژوگه با سایر عوامل تعدیل کننده ایمنـی در پیـشگیری و یـا درمـان بیماران مبتلا به نقصان ایمنی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ساکارومیسس سرویسیه، تخلیص، بتاگلوکان، کروماتوگرافی، فاگوسیتوز، TNF_α .

دریافت مقاله: ۸۵/۲/۵، اصلاح مقاله: ۸۵/۹/۹، پذیرش مقاله: ۸۵/۹/۲۰

? استاد مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران ـ ایران
* گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
** گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
آدرس پست الکترونیکی: Khosravi@ut.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

ساکارومیسس سرویسیه یک قارچ مخمری یوکاریوت و تک سلولی بوده که به عنوان یک الگوی تحقیقاتی در زمینه‌های مختلف علوم، پزشکی و بیوتکنولوژی به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). در ساکارومیسس سرویسیه، دیواره سلولی حدود ۳۰-۱۵ درصد وزن خشک و ۵۰-۲۵ درصد حجم سلولی را شامل می‌شود که باعث حفاظت سلول در برابر فشارهای اسمزی و استرسهای محیطی می‌گردد (۲). دیواره سلولی مخمر از سه لایه اصلی و چهار ماکرومولکول عمده شامل مانوپروتئین، ß (۳-۱) گلوکان، ß (۶-۱) گلوکان و کیتین ساخته شده است که توسط پیوندهای کووالان به هم متصل شده اند (۴،۳). مانوپروتئینهای دیواره سلولی تقریباً ۴۰-۳۵ درصد وزن خشک سلول را تشکیل می‌دهند (۵).

در طی سالهای اخیر توجه زیادی به بتاگلوکانهای مشتق از دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه به عنوان یک ماده محرک ایمنی شده است. با توجه به شیوع بالای عفونتهای خطرناک در بین بیماران مبتلا به نقصان ایمنی در جوامع انسانی مثل ایدز و سرطان، تلاشهای فراوانی جهت شناسایی عوامل تعدیل کننده ایمنی انجام گرفته است که در این میان، بتاگلوکانهای مخمری می‌توانند به صورت محلول و یا ذره، به عنوان ترکیبات محرک ایمنی در انسان و حیوانات مبتلا به نقصان ایمنی مورد استفاده قرار گیرند (۶). از طرف دیگر، مطالعات بالینی نشان می‌دهند که بتاگلوکانها قادرند انفجار تنفسی و دگرانولاسیون نوتروفیلی و سایتوکینهای مترشحه از سلولهای فاگوسیتی همچون IL_1، IL_6 و TNF_α را تحریک نمایند (۷). تاکنون از روشهای مختلفی جهت تخلیص بتاگلوکان مخمری استفاده شده است. در این راستا Nguyen و همکاران (۱۹۹۸) از روش هیدرولیز قلیایی (۸)، Ha و همکاران (۲۰۰۱) از روش هیدرولیز قلیایی- اسیدی (۹) و Magnelli و همکاران (۲۰۰۱) از روش قلیایی و آنزیمی (۱۰) استفاده کردند. با توجه به این که روشهای مختلف ذکر شده توسط محققین فوق باعث استحصال بتاگلوکانهایی با درجه خلوص، طول زنجیره‌های جانبی و قابلیت ایمنی‌زایی متفاوتی گردیده است، به کارگیری روشی مناسب که با بازدهی حداکثر طول زنجیره‌های جانبی و خلوص بالاتری همراه باشد، می‌تواند بتاگلوکانهای با کیفیت بالاتری را حاصل نماید. لذا در مطالعه حاضر از روش مناسبی جهت تخلیص بتاگلوکانهای محلول و عاری از مانوپروتئین و کیتین از دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه استفاده گردیده است. از این رو در مطالعه فعلی، تاثیر بتاگلوکانهای تخلیص شده بر ایمنی ذاتی در مدل حیوانی ارزیابی شده است.

روش بررسی

کشت انبوه مخمر ساکارومیسس سرویسیه . سوش استاندارد مخمر ساکارومیسس سرویسیه (PTCC 5052) از سازمان پژوهشهای علمی- صنعتی (تهران، ایران) تهیه گردید. مخمرها بر روی محیطهای سابوروگلوکز آگار حاوی کلرامفنیکل در حرارت ۳۰°C به مدت سه روز کشت شدند. پس از تهیه کشتهای تازه و خالص مخمری، جهت انبوه‌سازی آن، از محیط کشت مایع YPG (Yeast, Peptone, Glucose) (گلوکز:۲۰ گرم، پپتون:۲۰ گرم، عصاره مخمری:۱۰ گرم در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد. محیطهای کشت به مدت ۴۸ ساعت در یک انکوباتور چرخان (۱۵۰ rpm) در دمای ۳۰ °C نگهداری شدند. سپس سلولهای مخمری با سانتریفوژ یخچال‌دار با g × ۴۵۰۰ به مدت پنج دقیقه جمع‌آوری شده و سه بار با آب مقطر استریل به روش سانتریفوژ با g × ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه شستشو گردیدند و در نهایت مخمرهای رسوب یافته توزین شده، با دستگاه لیوفیلیزاتور (Labconco, USA) خشک و در حرارت ۲۰ °C- نگهداری شدند (۱۰). در این مطالعه، تمام مواد شیمیایی که به صورت متداول استفاده شده اند، از شرکت مرک (تهران، ایران) خریداری شده است.

شکستن سلولهای مخمری و تهیه دیواره سلولی . برای شکستن مخمر از روش سونیکاسیون استفاده گردید. بدین منظور، سوسپانسیونی از سلولهای مخمری در بافر فسفات سدیم سرد (۰/۱ مولار، pH=۷/۲) تهیه شد و سپس پروب دستگاه سونیکاتور (UP200s, dr. hielscher sonicator, Germany) در داخل لوله حاوی نمونه قرار داده شد. عمل خرد کردن سلولها با دامنه ۶۰ درصد به مدت دو دقیقه انجام شد و سپس جهت جلوگیری از بالا

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

رفتن دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به مدت چهار دقیقه خاموش گردید. این عمل چندین بار تکرار شد و هر دفعه، شکسته شدن سلولهای مخمری توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۱). در نهایت دیواره‌های سلولی با سانتریفوژ در g × ۵۰۰ و به مدت یک دقیقه از سلولهای سالم باقیمانده جدا شدند. سپس رسوب حاصله (حاوی دیواره های سلولی) را با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون در آورده، مجددا به مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C و با g × ۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید. شستشوی دیواره سلولی سه بار دیگر نیز تکرار شد. در نهایت، رسوب حاصله به عنوان نمونه‌های دیواره سلولی به وسیله لیوفیلیزاتور خشک شده، در منهای ۲۰°C نگهداری گردید (۱۰).

استخراج قلیایی-اسیدی . استخراج طبق روش Lee و همکاران (۲۰۰۱) انجام گردید (۱). برای این منظور، یک گرم از دیواره سلولی مرطوب با ۱۰ میلی لیتر هیدروکسید سدیم دو درصد مخلوط در حرارت ۹۰°C به مدت پنج ساعت عصاره‌گیری شد. بعد از خنک شدن، سوسپانسیون مربوطه با g × ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی جدا و با اسید استیک دو مولار خنثی گردید (pH=۷). متعاقباً به اندازه سه برابر حجم مایع رویی، الکل اتانول مطلق سرد اضافه شد (مایع رویی: اتانول، ۳:۱) و به مدت ۲۵ ساعت در یخچال به صورت ساکن و ایستاده نگهداری گردید و سپس جهت به دست آوردن رسوب کاملی از عصاره فوق، نمونه به مدت یک ساعت در g × ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. جهت حذف بیشتر پروتئینها، ۰/۱ گرم از نمونه رسوب یافته در یک میلی‌لیتر از اسید استیک سه درصد حل شده، به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی حاصل با هیدروکسید سدیم دو مولار خنثی شد و نمونه بتاگلوکان محلول در قلیا ($glucan\text{-}S_1$) جهت آزمایشات بعدی، لیوفیلیزه گردید.

کروماتوگرافی تعویض یونی . جهت حذف پروتئینهای باقیمانده، میزان ۱۷۵ میکرولیتر از نمونه $glucan\text{-}S_1$ (حاوی ۴۰ میلی‌گرم نمونه خشک) به داخل ستون (Bio-Rad , Laboratories, USA ۱/۵×۱۲ سانتیمتر) حاوی ژل دی اتیل آمینو اتیل سفاسل (DEAE Sephacel) قرار داده شد. فراکسیونهای حاوی بتاگلوکان ($glucan\text{-}S_2$) که به بستر باند نشده بودند، با شستشوی ستون توسط سه حجم بستر (با حجم تقریبی ۶۴ میلی لیتر) از بافر ۰/۰۵ مولار Tris-HCl (pH=۸) به صورت قطره قطره و با حجم مساوی در هشت ویال جمع‌آوری شدند. سپس محتویات این ویالها جهت آزمایشات بعدی لیوفیلیزه گردیدند. جهت استخراج پروتئینهای متصل به بستر ژل، از شیب غلظتی کلرید سدیم (۰/۴-۰/۱ مولار) استفاده شد. بدین منظور، غلظتهای کلرید سدیم ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲ و ۰/۱ مولار به ترتیب هر کدام با حجم مساوی ۲۵ میلی‌لیتر جهت شستشوی ستون مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام کار، ستون با ۱۲۰ میلی‌لیتر از بافر Tris-HCl شستشو داده شد (۱).

کروماتوگرافی تمایلی . چهل میکرولیتر نمونه $glucan\text{-}S_2$ حاوی ۳۰ میلی گرم ماده خشک در ستون (Bio-Rad Laboratories, USA, ۷×۰/۷ سانتیمتر) حاوی ژل کانکاناوالین-A سفارز (Con-A Sepharose) قرار داده شد. در ادامه ستون با دو حجم بستر (هفت میلی لیتر) از بافر ۲۰ میلی مولار Tris-HCl (pH=۷/۵) حاوی ۰/۵ مول کلرید سدیم، یک میلی مول کلرید منگنز، یک میلی مول کلرید منیزیوم و یک میلی مول کلرید کلسیم شستشو و بتاگلوکان باند نشده از ستون ($glucan\text{-}S_3$)، به صورت قطره قطره جمع‌آوری شد. بتاگلوکان حاصله در برابر آب مقطر دیونیزه دیالیز (Cut off=12 KDa, Sigma) و سپس لیوفیلیزه گردید. جهت جداسازی مانوپروتئینها از بستر ژل، ستون با بافر ۲۰ میلی مولار Tris-HCl (pH=۷/۵) حاوی ۰/۵ مول متیل مانوزید (سیگما) و ۰/۲۵ مول کلرید سدیم شستشو داده شد (به میزان ۱۰ میلی‌لیتر). در ادامه، ستون با ۱۵ میلی‌لیتر بافر بورات (۰/۱ مولار، pH=۶/۵) و سپس با ۳۰ میلی لیتر بافر ۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH=۷/۵) حاوی نیم مول کلرید سدیم در دو وضعیت pH بالا (۸/۵) و pH پایین (۴/۵) شسته شد. این عمل چندین بار به تناوب (پنج میلی لیتر با pH بالا و سپس پنج میلی لیتر با pH پایین) انجام گردید. در نهایت ستون با ۱۵ میلی‌لیتر بافر شستشوی اولیه کالیبره شد (۱، ۱۲).

تعیین غلظت گلوکز و مانوز . برای اندازه‌گیری قند در هر مرحله از آزمایش، میزان ۴۰ میلی‌گرم از نمونه خشک در یک میلی‌لیتر اسید تری فلورواستیک چهار مولار حل شده، در حرارت

۱۲۱°C به مدت شش ساعت قرار داده شد. بعد از خنک شدن، نمونه محلول در g × ۲۰۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شده، حدود ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی جمع‌آوری و سپس خشک گردید. نمونه خشک شده مجدداً در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده، میزان قند آن اندازه‌گیری شد. برای این منظور قند تام (گلوکز و مانوز) با روش ارتوتولوئیدین و گلوکز با روش گلوکز اکسیداز اندازه‌گیری شدند (۱۴،۱۳). غلظت پروتئین موجود در نمونه پس از حل کردن هر نمونه لیوفیلیزه شده (گلوکانهای S_1، S_2، S_3) در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر، به روش برادفورد میکرو اسی (Microassay Bradford) اندازه گیری شد (۱۵).

حیوان . شانزده سر موش BALB/c (سن شش هفتگی) از موسسه رازی (کرج، ایران) خریداری شدند. حیوانات به دو گروه هشت‌تایی (تیمار و شاهد) در قفسهای نگهداری و تحت شرایط کنترل شده تغذیه شدند. به گروه تیمار بتاگلوکان تخلیصی (۱۵۰ mg/kg) و به گروه شاهد آب مقطر با دوز منفرد به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در ادامه چهار موش از هر گروه در روز چهارم و مابقی در روز هفتم با کلروفرم بیهوش شده، به روش پونکسیون قلبی خونگیری شدند که بخشی از آن جهت آزمایش فاگوسیتوز در میکروتیوبهای حاوی پنج واحد هپارین ریخته شد و مابقی خون برای جداسازی سرم و انجام آزمایش الایزا جهت سنجش میزان ترشح TNF_α درون میکروتیوبهای غیرهپارینه ریخته، سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جداسازی سرم، خونها به مدت ۲۰ دقیقه به صورت ثابت در حرارت آزمایشگاه نگهداری و اجازه داده شد تا لخته شوند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در g × ۲۵۰۰ سانتریفوژ شدند. سرمهای جدا شده تا زمان آزمایش در فریزر ۸۰°C- نگهداری گردیدند.

آزمایش فاگوسیتوز . برای ارزیابی فعالیت فاگوسیتوز نوتروفیلهای موشهای ایمن و شاهد، از روش کمی لومینسانس مطابق روش Prendrgast و همکاران (۱۹۸۱) استفاده شد (۱۶). به طور خلاصه، در ابتدا خون با دکستران (فارماسیا) به نسبت یک به دو رقیق گردید و در ادامه به مدت ۴۵ دقیقه به طور ثابت در حرارت آزمایشگاه نگهداری شد تا گلبولهای قرمز رسوب نمایند. به مایع رویی حاوی نوتروفیل، مقدار یک میلی لیتر از فیکول-هیپاک (Ficoll-Hypaque, 1083, Sigma) اضافه شد و در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات سالین (pH=۷/۲) سوسپانسیون گردید و به دنبال آن با g ×۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی برداشت و نوتروفیلها شمارش شد. در نهایت محلولهای بافر (۵۰۰ میکرولیتر)، لومینول (۲۰۰ میکرولیتر، سیگما) و فوربول میریستات استات (۲۰۰ میکرولیتر، سیگما) و نوتروفیل (۲۰۰ میکرولیتر) به لوله‌های نمونه و کنترل افزوده شده، نتایج توسط لومینومتر قرائت شد.

آزمایش الایزا جهت سنجش میزان TNF_α . میزان سایتوکین TNF_α در سرم خون موشهای تیمار شده با بتاگلوکان به وسیله کیتهای الایزا مطابق پروتکل Cytoscreen ™ اندازه‌گیری شد.

آزمون آماری . یافته‌های حاصل از فعالیت فاگوسیتوز نوتروفیلها و میزان ترشح TNF_α به صورت میانگین±انحراف معیار (Mean ± Standard deviation) در گروه‌های شاهد و تیمار با استفاده از Descriptive analysis و نرم افزار $SPSS_{12}$ تعیین گردید. در ادامه، اختلاف بین گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد با آزمون t-student مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و حدود معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) تعیین گردید.

یافته‌ها

استحصال بتاگلوکان در مرحله استخراج قلیایی (glucan-S_1) . همانطور که در جدول یک نشان داده شده است، دیواره سلولی تقریباً ۲۱/۴ درصد از وزن خشک سلولهای مخمری و بتاگلوکان-S_1 تقریبا ۲۷/۵ درصد وزن خشک دیواره سلولی را شامل می شوند (جدول ۱). مطابق جدول دو، میزان پروتئین این فرآورده تقریبا ۲/۴ درصد از وزن خشک نمونه می‌باشد. به علاوه، محاسبه مقادیر قند تام، گلوکز و مانوز در glucan-S_1 نشان می‌دهد که نسبت مانان به گلوکان حدود ۷۰/۳ به ۲۹/۷ می‌باشد.

استحصال بتاگلوکان از کروماتوگرافی تعویض یونی (glucan-S_2) . نمونه glucan-S_2 حاوی بتاگلوکان، مانان و میزان کمی پروتئین به صورت کمپلکسهای مانوپروتئینی می‌باشد. مقدار پروتئین این نمونه تقریبا ۰/۰۰۴ درصد از وزن خشک نمونه

محاسبه شد (جدول ۲). به علاوه، فراکسیون دو حاوی بیشترین میزان قند تام، گلوکز و مانوز بوده است (شکل ۱). نسبت مانان به گلوکان تقریبا ۷۱/۹ به ۲۸/۱ محاسبه گردید (جدول ۲).

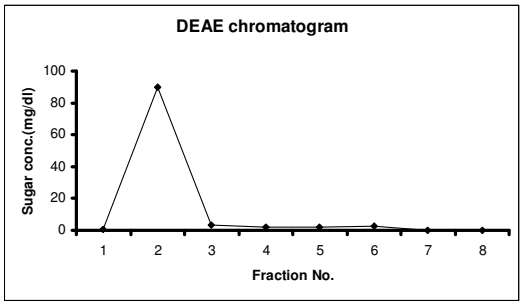
جدول ۱. پارامترهای مختلف آنالیزشده در استخراج و تخلیص ساکارومیسس سرویسیه

پارامتر	فرآورده	وزن
انبوه سازی مخمر	سلول مخمری	۱۹/۳ گرم
شکستن مخمر	دیواره سلولی	۴/۱۴ گرم
استخراج قلیایی	glucan-S_1	۱/۱۴ گرم
کروماتوگرافی تعویض یونی	glucan-S_2	۲ گرم
کروماتوگرافی تمایلی	glucan-S_3	۶۲/۴ میلی گرم

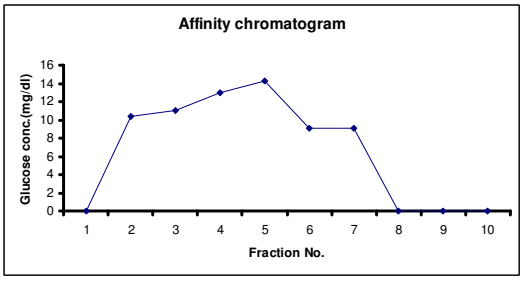
جدول ۲. استحصال ترکیبات شیمیایی مختلف از دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه

مرحله تخلیص	پروتئین (% w/w)	قند تام (mg/dl)	گلوکز (mg/dl)	مانوز (mg/dl)	نسبت گلوکان/ مانان
استخراج قلیایی (glucan-S_1)	۲/۴۱	۱۱۰/۶	۳۱/۶	۷۰	۷۰/۳ / ۲۹/۷
کروماتوگرافی تعویض یونی (glucan-S_2)	۰/۰۰۴	۹۰	۲۱/۵	۶۸/۵	۷۱/۹ / ۲۸/۱
کروماتوگرافی تمایلی (glucan-S_3)	غیر قابل سنجش	غیر قابل سنجش	۱۴/۳	۰	۰ / ۱۰۰

استحصال بتاگلوکان خالص از کروماتوگرافی تمایلی (glucan-S_3) . مقادیر بتاگلوکان محلول و خالص (glucan-S_3) که به وسیله کروماتوگرافی تمایلی حاوی ژل کانکاناوالین-A سفارز تهیه شده در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار پروتئین glucan-S_3 غیر قابل سنجش بوده است (جدول ۲). همان طوری که انتظار می‌رفت، آنالیز مونوساکاریدهای نمونه نشان داد که تنها قند قابل اندازه‌گیری از نوع گلوکز می‌باشد. در این زمینه، بیشترین مقدار گلوکز به دست آمده در فراکسیون پنج می‌باشد در حالی که مقدار مانوز، غیر قابل سنجش بوده است (شکل ۲). با توجه به



شکل ۱. مقادیر قند تام موجود در فراکسیونهای مختلف به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی



شکل ۲. مقادیر گلوکز در فراکسیونهای مختلف به دست آمده از کروماتوگرافی تمایلی

حذف کامل مانان از glucan-S_3، نسبت مانان به گلوکان حدود صفر به ۱۰۰ محاسبه گردید (جدول ۲).

نتایج آزمایشات فاگوسیتوز و الایزا . تاثیر تجویز داخل صفاقی بتاگلوکان تخلیصی (glucan-S_3) بر روی فعالیت فاگوسیتوز و ترشح TNF_α موشهای BALB/c در جدول سه ارائه شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که شاخص تحریکی فاگوسیتوز در گروه تیمار در روز چهارم ۲۴۶ درصد، (p=۰/۰۰۲) و روز هفتم ۲۴۲ درصد، (p=۰/۰۰۰۵) می‌باشد که افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد. به علاوه، نتایج حاصل از تاثیر بتاگلوکان تخلیصی روی ترشح TNF_α حاکی از افزایش ۶۲۰ درصدی ترشح این ماده در روز چهارم (p=۰/۰۰۰۵) و ۵۱۷ درصدی آن در روز هفتم (p=۰/۰۰۰۵) می‌باشد.

جدول ۳. نتایج شاخص فاگوسیتوز و ترشح TNF_α در موشهای تیمار شده با بتاگلوکان تخلیصی

گروههای مطالعه موش	روز خونگیری	شاخص فاگوسیتوز (میانگین ± انحراف معیار)	ترشح TNF_α (pg/ml) (میانگین ± انحراف معیار)
گروه تیمار	روز چهارم	۶۴/۱۷ ±۱۸۱/۶۳	۰/۹۵ ±۳/۰۴
	روز هفتم	۵۰/۵۶ ±۱۷۵/۳۸	۰/۷۱ ±۲/۶۹
گروه شاهد	روز چهارم	۱۸/۷۹ ±۷۳/۷۵	۰/۲۸ ±۰/۴۹
	روز هفتم	۱۷/۷۴ ±۷۲/۳۸	۰/۲۹ ±۰/۵۱

بحـــث

ساکارومیسس سرویسیه مخمری است که در طی دهه های اخیر به عنوان یک الگوی تحقیقاتی در زمینه ژنتیک سلولی و بررسی ترکیبات مختلف دیواره سلولی مخمرها مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه توجه زیادی به استفاده از روشهای مختلف تخلیص ترکیبات مهم دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه و تعیین ساختار شیمیایی آنها شده است. دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه حدود ۳۰-۱۵ درصد وزن خشک سلول را تشکیل می‌دهد و از سه لایه اصلی شامل لایه خارجی گلیکوپروتئینی متشکل از کربوهیدرات‌های نوع مانان فسفوریله (۴۰-۳۵ درصد)، لایه میانی متشکل از بتاگلوکان محلول در قلیا (۲۰-۱۵ درصد) و لایه داخلی متشکل از بتاگلوکان نامحلول در قلیا (۳۵ درصد) است (۱۷،۷). در این مطالعه از روش مناسبی برای تخلیص بتاگلوکان از دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه استفاده شده که بر مبنای استخراج ملایم قلیایی و سپس استفاده از مراحل مختلف و متوالی کروماتوگرافی می‌باشد (۱).

در مطالعه حاضر، میزان استحصال دیواره سلولی از سوش مخمری PTCC 5052 حدود ۲۱/۴ درصد وزن خشک سلول بود (جدول ۱). در مطالعه فعلی، برای اولین بار روش سونیکاسیون برای شکستن سلولهای ساکارومیسس سرویسیه استفاده شده است. در این زمینه، هرچند استحصال دیواره سلولی در این مطالعه کمتر از مقادیر گزارش شده توسط Aguilar-Uscanga و همکاران (۲۷ درصد) (۱۷)، Nguyen و همکاران (۲۹ درصد) (۸) و Suphantharika و همکاران (۳۴ درصد) (۱۸) می‌باشد ولی این مقادیر بیشتر از مقدار گزارش شده توسط Supamattaya و همکاران (۱۳ درصد) (۱۹) است. این کاهش میزان استحصال دیواره سلولی ناشی از نوع روش به کار گرفته برای شکستن مخمرها (سونیکاسیون) جهت تهیه دیواره سلولی و همچنین نوع سوش مخمری است. در این زمینه، هر چند Supamattaya و همکاران (۱۹) و Nguyen و همکاران (۸) روش یکسانی را برای شکستن مخمرها (استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای) استفاده کردند، با این حال میزان استحصال دیواره سلولی Nguyen و همکاران بیشتر از Supamattaya و همکاران است. این حالت می‌تواند مربوط به سوشهای استفاده شده در مطالعات Supamattaya و همکاران (سوش TISTR 5088) (۱۹)، Aguilar-Uscanga و همکاران (سوش GEN.PK133-7D) (۱۷) و Nguyen و همکاران (سوش 1117) (۸) باشد. به علاوه، علت تفاوت در استحصال دیواره سلولی بین مطالعات فوق می‌تواند مربوط به تفاوت در روشهای خرد کردن سلولی (به ترتیب استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای در برابر اتولیز با آب داغ) باشد (۱۹،۸-۱۷). بتاگلوکان محلول در قلیا ($glucan\text{-}S_1$) که به روش استخراج قلیایی با هیدروکسید سدیم دو درصد به دست آمده است، وزنی حدود ۲۷/۵ درصد وزن خشک سلول را تشکیل می‌دهد (جدول ۱). این میزان با یافته‌های سایر محققین مثل Suphantharika و همکاران (۲۷/۳ درصد) (۱۸) و Nguyen و همکاران (۲۹/۴ درصد) (۸) موافقت دارد در حالی که یک اختلاف معنی‌داری را با مقادیر گزارش شده توسط Yiannikouris و همکاران (۴۲ درصد) نشان می‌دهد (۲۰). در مطالعه Yiannikouris و همکاران دیواره سلولی مخمرها در مجاورت سود یک مولار به مدت شش ساعت در حرارت 75^oC قرار داده شد. به احتمال فراوان دلایل مربوط به

استحصال این مقادیر متفاوت می‌تواند مربوط به سوش مخمری (دیواره‌های سلولی با ساختار متفاوت)، شرایط رشد مخمر مثل نوع کشت سلولی، میزان pH محیط کشت، میزان حرارت و اکسیژن و شرایط استخراج قلیایی شامل نوع قلیا و غلظت آن (هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم)، مدت زمان استخراج قلیایی، درجه حرارت استخراج قلیایی و مدت زمان آن و همچنین روشهای آنزیمی و شیمیایی به کار رفته شده باشد (۸). در این راستا در مطالعه فعلی، استخراج قلیایی با هیدروکسید سدیم دو درصد در درجه حرارت ۹۰°C به مدت پنج ساعت انجام شده است. در این مرحله از مطالعه، میزان پروتئین glucan-S_1 تقریباً ۲/۴ درصد وزن خشک نمونه می‌باشد که با مقادیر گزارش شده توسط Suphantharika و همکاران (۱/۸ درصد) (۱۸)، Nguyen و همکاران (۲/۱ درصد) (۸) و Lee و همکاران (۲/۸ درصد) (۱) همخوانی دارد. نسبت مانان به بتاگلوکان در مطالعه حاضر تقریباً ۷۰/۳ به ۲۹/۷ بوده (جدول ۲) که همخوانی زیادی را با نتیجه گزارش شده توسط Lee و همکاران (۷۰ به ۳۰) نشان می‌دهد (۱). جهت حذف پروتئینهای باقیمانده در glucan-S_1، از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفاسل استفاده شده است. جدول ۲ نشان می‌دهد که میزان پروتئین glucan-S_2 حدود ۷/۱ میکروگرم در میلی لیتر (۰/۰۰۴ درصد وزن خشک نمونه) می‌باشد که این میزان کمتر از مقدار گزارش شده توسط Lee و همکاران (۰/۳ درصد) است (۱). به علاوه، نسبت مانان به بتاگلوکان در فراکسیون glucan-S_2 تقریبا ۷۱/۹ به ۲۸/۱ محاسبه شده است (جدول ۲) که این نسبت با یافته Lee و همکارانش (۷۰ به ۳۰) همخوانی دارد (۱). در مطالعه حاضر، میزان پروتئین نمونه glucan-S_3 غیر قابل سنجش بود. به علاوه، نسبت مانان به بتاگلوکان در این نمونه حدود صفر به ۱۰۰ محاسبه گردید (جدول ۲). این نتایج با یافته‌های Lee و همکاران (۱) و Ha و همکاران (۹) همخوانی دارد. این یافته نشان می‌دهد که مقادیر اندک پروتئینهای باقیمانده به عنوان کمپلکسهای مانوپروتئینی به واسطه اتصال به لکتینهای Con-A از نمونه جدا و حذف می‌شوند. بتاگلوکان ترکیبی است که فعالیت سیستم ایمنی را افزایش داده، با تحریک فعالیت ماکروفاژها، نوتروفیلها و سلولهای کشنده طبیعی منجر به فاگوسیتوز، انفجار تنفسی و ترشح سایتوکینهایی از قبیل TNF_α می‌شود. نتایج حاصل از مطالعه فعلی نشان می‌دهد که نوتروفیلهای موشهای تیمار شده با بتاگلوکان تخلیصی پاسخ فاگوسیتوز شدیدی در روز چهارم (تقریبا ۲/۵ برابر) و روز هفتم (تقریبا ۲/۴ برابر) از خود نشان داده که این پاسخها در تمام موارد در مقایسه با موشهای شاهد اختلاف آماری معنی‌داری داشتند ($p=۰/۰۰۲$ در روز چهارم و $p=۰/۰۰۰۵$ در روز هفتم) (جدول ۳). گرچه در روز هفتم پاسخ فاگوسیتی کمتر از روز چهارم بوده است ولی اختلاف معنی‌داری بین این دو روز مشاهده نشده است. به طور کلی، سلولهای فاگوسیتی بیشترین میزان فعالیت خود را حدود سه روز (۷۲ ساعت) پس از تجویز بتاگلوکان نشان می‌دهند و به تدریج این فعالیت بعد از شش روز (۱۴۴ ساعت) کاهش می‌یابد (۲۱). نتایج تحریک پاسخهای فاگوسیتی در موشهای تیمار شده با بتاگلوکان تخلیصی نشان داد که میزان این فعالیت در روز چهارم بیشتر از روز هفتم می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط Mucksova و همکاران (۲۰۰۱) بر روی فعالیت ایمنی موشهای تیمار شده با بتاگلوکان، نشان داده شد که تجویز دوز منفرد بتاگلوکان به میزان ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به صورت داخل صفاقی باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت پراکسیدازی و تولید اکسید نیتریک ماکروفاژهای صفاقی گردیده است (۲۲). در مطالعه حاضر و مطالعات سایر محققین (۲۴،۲۳) برانگیخته شدن پاسخ فاگوسیتوز توسط بتاگلوکان در شرایط in vivo به خوبی محرز شده است. TNF_α مترشحه از سلولهای فاگوسیتی تحریک شده با بتاگلوکان تخلیصی (جدول ۳)، افزایشی حدود ۶/۲ برابر را در روز چهارم و ۵/۲ برابر را در روز هفتم نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد. گرچه میزان ترشح این سایتوکین در روز هفتم نسبت به روز چهارم در موشهای تیمار شده با بتاگلوکان تخلیصی کاهشی را نشان می‌دهد ولی این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. Vetvicka و همکاران (۲۰۰۲) سه روز پس از ایمن کردن موشها توسط بتاگلوکان (۲۰ mg/kg–۲)، میزان سایتوکین TNF_α را در خون آنها اندازه‌گیری کردند. نتیجه این مطالعه نشان دهنده افزایش ۲/۲ برابری ($p<۰/۰۵$) ترشح TNF_α نسبت به گروه شاهد می‌باشد (۲۴). نتایج مشابهی توسط سایر محققین نیز گزارش شده است

(۲۶،۲۵). در مطالعه دیگری که توسط Olson و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد، ۱۲ ساعت پس از انکوباسیون سلولهای ماکروفاژ آلوئولی خرگوش در مجاورت مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بتاگلوکان، افزایش در ترشح TNF_{α} (به میزان ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با ماکروفاژهای تحریک نشده را نشان داد (۲۷،۲۶).

نتیجه‌گیری . از مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که مولکولهای بتاگلوکان خالص را می‌توان در آینده در کارآزماییهای بالینی به عنوان یک ماده محرک ایمنی به تنهایی و یا همراه با سایر عوامل تعدیل کننده ایمنی و آنتی بیوتیکها برای پیشگیری یا درمان بیماران مبتلا به نقصان ایمنی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر . این مطالعه توسط مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از همیاری آقای دکتر وجگانی و همکارانش در بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی تهران و سرکار خانم دکتر زهرا طوطیان در بخش علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Lee JN, Lee DY, Ji IH. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. Biosci Biotechnol Biochem 2001; 65: 837-841.

2. Klis FM, Mol P, Helingwerf K. Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol 2002; 26: 239-256.

3. Lipke PN, Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. J Bacteriol 1998;15: 3735-40.

4. Osumi M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. Micron 1997; 29: 207-233.

5. Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. Biochemica et Biophysica Acta 1998; 1426: 373-383.

6. Toklu HZ, Sener G. Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. Int Immunopharmacol 2006; 6(2):156-69.

7. Sener G, Eksioglu-Demiraop E, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC. beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. Europ J Pharmacol 2006; 542:170-178.

8. Nguyen TH, Fleet GH, Rogers PL. Composition of the cell walls of several yeast species. Appl Microbiol Biotechnol 1998; 50: 206-212.

9. Ha CH, Lim KH, Kim YT. Analysis of alkali-soluble glucan produced by Saccharomyces cerevisiae wild type and mutants. Appl Microbiol Biotechnol 2001; DoI 10. 1007/s 00250/00824.

10. Magnelli P, Cipollo JF, Abeijon C. A refined method for the determination of Saccharomyces cerevisiae cell wall composition and beta-(1,6)-D-glucan fine structure. Analytic Biochem 2001; 301: 136-150.

11. Agrawal PB, Pandi, AB. Isolation of alpha-glucosidase from Saccharomyces cerevisiae: Cell disruption and adsorption. Biochem Engine J 2003; 15: 37-45.

12. Kollar R, Reinhold BB, Gilbert A. Architecture of the yeast cell wall. J Biol Chem 1997; 272: 17762-75.

13. Annino JS, Giese RW. Clinical chemistry, principles and procedures, 4th ed. Little, Brown and Company Boston, USA 1976; 148-149.

14. Trinder P. Determination of Blood Glucose Using

4- Aminophenazone. J Clin Path 1959; 22: 246.

15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analyt Biochem 1976; 72: 248-254.

16. Prendergast E, Proctor RA. Simple procedure for measuring neutrophil chemiluminescence. J Clin Microbiol 1981; 390-392.

17. Aguilar-Uscanga B, Francois JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Appl Microbiol 2003; 37: 268-274.

18. Suphantharika M, Khunrae P, Thanardkit P. Preparation of spent brewers yeast beta-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, Penaeus monodon. Bioresource Technology 2002; 88: 55-60.

19. Supamattaya K, Kittikun AH, Sitthipun M. Immunostimulant and vaccination in black tiger shrimp, Penaeus monodon Frabricius. J Sci Technol 2000; 22: 653-662.

20. Yiannikouris A, Francois J, Poughon L. Alkaline extraction of beta-glucan from Saccharomyces cerevisiae cell wall and study of their adsorptive properties toward Zearalenone. J Aric Food Chem 2004; 52: 3666-3673.

21. Carrow D. Beta-(1,3)-D-glucan as a primary immune activator. Townsend Letter 1996; 11: 700-710.

22. Mucksova J, Babicek K, Pospisil M. Particulate beta-1, 3-D-glucan, carboxymethylglucan and sulfoethylglucan-influence of their oral or intraperitoneal administration on immunological respondance of mice. Folia Microbiol 2001; 46: 559-63.

23. Ohno N, Egawa Y, Hashimoto T, Adachi Y, Yadomae T. Effect of beta-glucan on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. Biol Pharm Bull 1996; 19: 608-12.

24. Vetvicka V, Terayama K, Mandeville R, Brousseau P, Kournikakis B, Ostroff G. Orally-administered yeast beta-(1,3)-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. The Journal of The American Nutraceutical Association 2002; 5(2).

25. Hoffman OA, Olson EJ, Limper AH. Fungal beta-glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in response to bacterial liposaccharide. Immunol Lett 1993; 37: 19-25.

26. Olson EJ, Standing JE, Harper NG, Hoffman OA, Limper AH. Fungal beta-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophage. American Society for Microbiology 1996; 3548-54.

27. Li B, Allendorf D, Hansen R, Marroquin J, Ding C, Cramer DE, Yan J. Yeast beta-Glucan Amplifies Phagocyte Killing of iC3b-Opsonized Tumor Cells via Complement Receptor 3-Syk- Phosphatidylino-sitol 3-Kinase Pathway. J Immunolo 2006; 177(3):1661-9.