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

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال دهم ● شماره ۲ ● صفحات ۱۰۳ تا ۱۱۰ ● تابستان ۱۳۹۱

بررسی اثرات ضد توموری ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس بر مهار تولید آنزیم‌های متالوپروتئینازها در رده سلولی فیبروسارکومای انسانی

*شهلا رودبار محمدی[۱]، مریم رودباری[۲]، محمود وحیدی[۳]، زهیر محمد حسن[۴]، ناهید دارابی[۵]

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۹۰/۹/۶ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۹۱/۱/۲۳

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم‌های متالوپروتئیناز نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک ایفا می‌کنند. شواهد زیادی مبنی بر نقش آنزیم‌های متالوپروتئینازها در تهاجم تومورها و بیماری‌های التهابی وجود دارد. در این مطالعه اثر ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا بر روی تولید آنزیم‌های متالوپروتئینازها با استفاده از سنجش سایتوتوکسیسیتی و همچنین زایموگرافی ژلاتین انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی به‌مدت یک‌سال در دانشکده پزشکی تربیت مدرس انجام شد. ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا با بافر لیز کننده جدا سازی شد و غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۰ (µg/ml) آن به سلول‌های فیبروسارکومای انسانی موجود در چاهک میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و اثرات مهاری آن روی سلول‌های توموری با تست سایتوتوکسیسیتی MTT (۳-(۴,۵-dimethylthiazol-۲yl) -۲,۵- diphenyltetrazolium bromide) ، و همچنین تست زایموگرافی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس دارای اثرات مهاری بر روی سلول‌های توموری بوده است، زیرا میزان حیات و زنده بودن سلول‌های توموری را در تست MTT در مقایسه با گروه کنترل که هیچ تیماری نداشتند، کاهش داده است و همچنین تولید آنزیم‌های متالو پروتئینازها در حضور این فراکشن کاهش معنا داری داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری: از آنجایی که مهار فعالیت آنزیم می‌تواند در درمان بیماری‌هایی از قبیل سرطان مفید باشد و با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس را به عنوان یک خط درمان جهت مهار فعالیت آنزیم‌های متالوپروتئیناز به کار برد.

کلمات کلیدی: ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس، آنزیم‌های متالوپروتئیناز، MTT، زایموگرافی

مقدمه

با توجه به افزایش بیماری‌های مرتبط با نقص ایمنی و سرطان در سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی در جهت استفاده از عوامل ایمونومدولاتوری با منشا طبیعی به‌عنوان ترکیبات دارویی، شکل گرفته است (۱، ۲). متاستاز خصوصیتی است که تومور بدخیم را از نئوپلازی خوش‌خیم مجزا می‌کند (۳)، لذا جلوگیری از متاستاز یکی از اصلی‌ترین مراحل در درمان سرطان است (۳)، ماتریکس متالوپروتئینازها Matrix Metalloproteinases (MMPs) یک خانواده آنزیمی همولوگوس بوده که از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی Extra cellular Matrix (ECM) به‌عنوان سوبسترا جهت فعالیت

۱ـ استادیار، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی (*نویسنده مسئول)
تلفن: ۸۲۸۸۳۵۷۲ – ۰۲۱ آدرس الکترونیک: Sh.mohammadi@modares.ac.ir
۲ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی
۳ـ مربی، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی
۴ـ استاد، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی
۵ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی

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

پروتئولتیک خود استفاده می‌کنند(۴). تخریب ماتریکس خارج سلولی منجر به تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری می‌شود. براساس سوبستراهای اختصاصی و ساختار دومن متالوپروتئینازها آنها را به ۴ گروه تقسیم می‌کنند که یکی از این زیر گروه‌ها از ژلاتین و کلاژن به عنوان سوبسترا استفاده می‌نمایند این زیر گروه MMP ژلاتیناز شامل دو عنصر MMP-۲ (ژلاتیناز A) و MMP-۹ (ژلاتیناز B) می‌باشد که در ابتدای رشد و متاستاز سلول‌های توموری، دخیل هستند (۴، ۵).

بنابراین هر عاملی که نقش ممانعت کنندگی در فعالیت و بیان متالوپروتئینازها داشته باشد توانایی مهار رشد سرطان را خواهد داشت (۴) و می‌تواند به‌عنوان یک خط درمانی جهت بیمارهای التهابی و بدخیمی‌ها باشد. در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای بر روی ممانعت کننده‌های اثر MMPs به‌عنوان یک کلاس جدید داروهای ضد سرطان معطوف شده است(۵)، این نوع ترکیبات در قارچها در بخش‌های حاوی گلوکان و پلی‌ساکاریدهای آن وجود دارد (۱) که از آنها به‌عنوان ایمنومدولاتور با خاصیت ضد توموری یاد شده است از جمله D-glucan (۱-۳) β lentinan از قارچ Lentinus edoder و Schizaphyllan از قارچ شیزوفیلیوم کامیونه از ترکیبات اصلی دیواره سلولی این قارچ هابوده که خاصیت ضد توموری و ایمنواستیمولاتوری دارند (۶، ۷). بتاگلوکان مشتق شده از قارچ گانودرما توانایی مهار رشد سلول‌های توموری را در Carcinoma و سلول‌های ملانومای B۱۶ داشته (۷) و این خاصیت ایمنوفارماکولوژیک β-glucan به اثرات ضدتوموری و مهار کارسینوژنز آن برمی‌گردد. β – گلوکان‌ها و مانان از اصلی‌ترین اجزا دیواره سلولی قارچ‌ها از جمله کاندیدا آلبیکنس می‌باشند (۸). در تحقیق حاضر اثر فراکشن‌های دیواره سلولی کاندیدا بر روی فعالیت آنزیم‌های متالوپروتئینازها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۸۹ در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.در این تحقیق ازترکیبات‌های دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس استفاده شد. سویه استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکنس (ATCC ۱۰۳۲۱) از انستیتو پاستور ایران تهیه و بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت.

تهیه ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس

به منظور تولید کشت انبوه از محیط GYEP شامل گلوکز ۲٪، پپتون ۱٪، و عصاره مخمر ۰/۳٪ استفاده شده و آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل (۵۰ mg/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) به محیط اضافه گردید. سوسپانسیونی از کاندیدا آلبیکنس به میزان $۱۰^۶$ سلول در هر میلی لیتر تهیه و به ارلن‌ها اضافه گردید. سپس ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ دور در دقیقه منتقل و در درجه حرارت ۳۰–۲۸ °C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند، بعد از ۴۸ ساعت ارلن‌ها در شرایط استریل به زیر هود منتقل شده و پس از مخلوط نمودن محتویات ارلن، محیط حاوی مخمر را درون فالکون‌های ۵۰ ml ریخته و با بافر فسفات ۱۰ میلی مولار و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار (۴°C و دور ۸۰۰ g) به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و جمع‌آوری شدند. بعد از سانتریفیوژ، مایع روئی را خالی کرده و با استفاده از یک سمپلر مخمرهای رسوب شده ته فالکون را جمع‌آوری نموده و همه نمونه‌ها به درون یک فالکون منتقل شده و سپس ۳ مرتبه با بافر فسفات استریل شستشو داده شد و در دور ۸۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، رسوب باقیمانده جمع‌آوری شد. به منظور تهیه عصاره دیواره سلولی از روش Casanova همراه با برخی تغییرات استفاده شد (۲۰).

شکستن دیواره سلولی مخمر

زیر هود و تحت شرایط استریل سلول‌های مخمری شسته شده کاندیدا آلبیکنس درون لوله درپیچ دار استریل با حجم مشخصی از بافر مخلوط و به میزان نصف حجم بافر پرل شیشه‌ای استریل به آن افزوده گردید. سپس آنتی پروتئاز PMSF (۰/۰۰۱ مولار) که درون اپندورف ۰/۵ ml با الکل ۷۰ در صد حل شده است به منظور جلوگیری از تخریب پروتئین‌های آزاد شده ضمن شکسته شدن دیواره سلولی به مخلوط حاصل اضافه گردید. سپس محتویات لوله ورتکس شده، عمل ورتکس تا آنجایی ادامه می‌یابد که حدود ۹۰٪ سول‌های مخمری شکسته شوند.شکسته شدن سلول‌های مخمری با مشاهده زیر میکروسکوپ نوری تایید گردید. پس از هر ۲ دقیقه

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

ورتکس، حدود ۳۰ ثانیه لوله محتوی مخمر درون بشر حاوی یخ قرار می‌گرفت. پس از شکسته شدن دیواره سلولی، سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شدند. بعد از این مرحله و جداسازی پرل شیشه‌ای، عصاره مخمری به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش (۹۶°C) قرار گرفته و سپس در یک ظرف حاوی یخ قرار داده شد. لوله‌های حاوی سوسپانسیون سلولی دوباره به مدت ۵ دقیقه به کمک ورتکس، مخلوط شده و سپس سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۴۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. در انتها مایع روئی را به کمک سمپلر برداشت نموده و وارد اپندورف استریل نموده به منظور جداسازی نمک و مواد اضافی از پروتئین‌ها، نمونه‌ها مورد دیالیز قرار گرفتند.

تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد

به منظور سنجش غلظت پروتئین‌های تخلیص شده از رنگ کوماسی برلیانت بلو استفاده شده است. الگوی الکتروفورزی عصاره مخمری دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش از ژل ۱۰٪ برای تهیه ژل جدا کننده و متراکم استفاده شده است ژل پلی اکریل آمید با کوماس بلو R-۲۵۰ رنگ آمیزی شدند.

انجام اولترا فیلتراسیون

اولترا فیلتر به صورت آماده از شرکت Millipore خریداری گردید. عصاره پروتئینی دیواره سلولی در لوله‌های فالکول ۱۵ میلی لیتری که محتوی فیلتر خاص با KD Cutoff ۵۰ بوده است قرار گرفت، پس از ریختن عصاره پروتئینی توسط سمپلر درون فیلتر، لوله مربوطه، در دمای ۴°C و دور RPM۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، در حد فاصل فیلتر، دو فاز تشکیل گردید. فاز بالایی محتوی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بیش از KD ۵۰ بوده است که مد نظر ما بوده است و فاز پایینی محتوی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کمتر از KD ۵۰ بوده است که دور ریخته شد.سپس دوباره عصاره پروتیئنی الکتروفورز شدند.

آزمون L.A.L (Limulus Amebocyte Lysate)

به منظور اثبات عدم وجود لیپو پلی ساکارید LPS موجود در عصاره پروتئینی تخلیص شده از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس تست L.A.L انجام شده است. این تست در موسسه رازی کرج در بخش مرکزی تحقیقات میکروب شناسی انجام شد. اساس تست بر مبنای انعقاد ژل می‌باشد. بدین صورت که در صورت وجود گلوکان در عصاره پروتئینی مورد نظر ژل منعقد شده و رنگ آبی ایجاد می‌شود و در صورت عدم وجود گلوکان ژل منعقد نشده و تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. قبل از انجام این تست عصاره پروتئینی مورد نظر زیر هود در شرایط استریل از فیلتر µ۰/۲۲ عبور داده شد.

کشت رده سلولی مناسب

در این تحقیق از سلول فیبروسارکومای انسانی (HT ۱۰۸۰) استفاده شد. ابتدا این سلول‌ها در فلاسک کشت سلولی حاوی RPMI همراه با ۵٪ FBS (Fetal Bovine Serum)، پنی‌سیلین ۱۰۰ Iu/ml و استرپتومایسین ۱۰۰/ml کشت داده شدند.پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و جداسازی آنها از کف پلیت، شمارش آنها با لام نئوبار انجام شد و مقدار ۲×۱۰^{۳} سلول به میزان ۱۰۰µl در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $CO_۲$ دار در دمای ۳۷°C انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت مایع رویی چاهک‌ها خالی شده وتعویض محیط انجام شد و دوباره به میزان۲۴ ساعت انکوبه شدند.سپس مقادیر مختلف از فراکشن‌های دیواره سلولی (µg/ml ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۰) به هر چاهک اضافه شد. دوباره پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C با ۵٪ $CO_۲$ انکوبه شد (برای هر غلظت به‌صورت تریپلیکیت آزمون انجام شد). یک سری از چاهک‌ها به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد که فقط حاوی سلول‌های فیبروسارکوما بدون ترکیبات دیواره سلولی بوده است. پس از آن مایع رویی هر چاهک به‌طور مجزا با سر سمپلر جمع‌آوری شده و از آن برای انجام تست زایموگرافی استفاده گردید.

آزمون زایموگرافی

به منظور بررسی میزان ممانعت کنندگی فعالیت آنزیم MMP۲,۹ (متالوپروتئینازهای) تولید شده از رده سلولی فیبروسارکومای انسانی، ترکیبات‌های دیواره سلولی به عنوان یک ترکیب موثر به‌کار گرفته شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی چاهک‌های سلولی حاوی فراکشن‌های دیواره سلولی در غلظت‌های مختلف

جهت بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل ۰/۱٪ ژلاتین استفاده شد. الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمید محتوی ژلاتین در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS) انجام شد. که مقایر اضافی آن با ششتشوهای مکرر با محلول تریتون X-۱۰۰ حذف گردید و سپس ژل به مدت یک شبانه روز در بافر فعال کننده ژلاتیناز قرار گرفته و سپس با کوماسی بلو رنگ آمیزی شد. پس از رنگ زدایی، مناطق پروتئولیز شده به عنوان باندهای روشن در زمینه آبی قابل رویت بوده است و سپس ارزیابی کمی باندهای لیز شده در مقایسه با چاهک‌های سلول‌های که کنترل منفی بودند (سلول‌هایی که با فراکشن تیمار نشدند) توسط سیستم ژل داکیومنتیشن صورت گرفت و آنالیزهای مربوطه انجام شد.

آزمون سایتوتوکسیسیتی MTT

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با مقادیر مشخصی از ترکیبات دیواره سلولی که در روش کار ذکر شد مایع رویی هر چاهک به‌طور مجزا با سر سمپلر جمع‌آوری شده و از آن برای انجام تست MTT استفاده شد. بدین ترتیب که، مایع رویی هر چاهک با سر سمپلر جداگانه جمع‌آوری شده و دور ریخته می‌شود سپس ۱۰میکرولیتر از نمک تترازولیوم (MTT) به هر چاهک اضافه گردید دوباره پلیت به مدت ۴ ساعت انکوباسیون شد. پس از این مدت زمان، حدود ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (دی متیل سولفوکساید) به آن اضافه گردید و جذب نوری (OD) چاهک‌ها در طول موج ۵۸۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت شد. این تست جهت بررسی میزان زنده بودن سلول‌هایی که با یک ماده تأثیرگذار تیمار شده‌اند به کار گرفته می‌شود در این تست از ماده احیا کننده تترازولیم بلو استفاده می‌شود به عنوان مثال هر چه میزان زنده بودن سلولها پس از تیمار بیشتر باشد میزان جذب نوری که با دستگاه قرائت می‌شود بیشتر می‌باشد زیرا میزان رنگ ایجاد شده توسط سلول‌های زنده بیشتر خواهد بود.

آنالیز آماری: تمامی داده‌ها بر اساس mean±SD محاسبه شده است. و برای تایید اختلاف بین گروه‌های کنترل و گروه تست (سلول‌های تیمار شده با ترکیبات دیواره سلولی) از تست one-way analysis of variance (ANOVA) استفاده شده است ود ر تمامی تست‌های انجام شده فقط P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

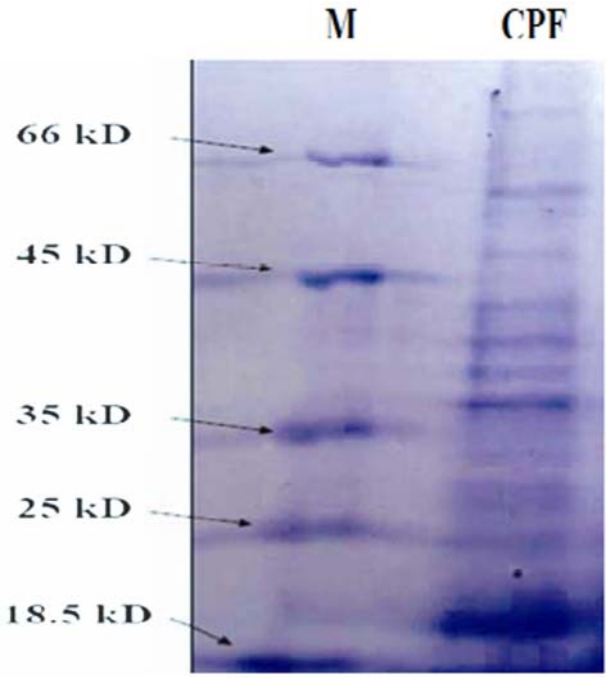
یافته‌ها

نتایج حاصل از تهیه ترکیبات پس از تخریب دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس

پس از کشت سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس در محیط کشت GYEP وجمع‌آوری کردن آنها، به منظور دستیابی به پروتئین‌های دیواره سلولی عمل شکستن دیواره سلولی کاندیدا در بافر لیز کننده انجام شد. نتایج شکستن دیواره سلولی نشان داد که حدود ۹۵-۹۰٪ مخمرهای کاندیدا آلبیکنس دچار تخریب شدند.

نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE

نتایج حاصل از شکستن دیواره سولی و الگوی پروتئینی به‌دست آمده از آن با روش SDS-PAGE در شکل ۳-۱ نشان داده شده است. در این مطالعه از مارکرهای پروتئینی الکتروفورز با وزن مولکولی wide استفاده شده است تا تمامی وزن‌های مولکولی ممکن را داشته باشد وزن‌های مولکولی مارکر از ۱۴/۴ کیلو دالتون تا ۱۱۶ کیلو دالتون بوده است که در رنگ آمیزی به روش کوماسی برلینت بلو



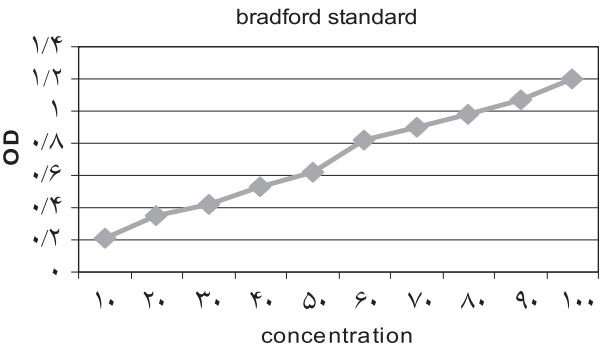
شکل ۱- الکتروفورز حاصل از عصاره پروتئینی دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس

M: مارکر پروتئینی با وزن مولکولی استاندارد
CPF: ترکیبات جدا شده از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس که دارای وزن‌های مولکولی مختلفی میباشد و در کنار مارکر اوزان باندها قابل تشخیص میباشد زیرا مارکر دارای وزن مولکولی مشخص است که پس از الکتروفورز باندهای آن از هم جدا شده و شاخصی جهت تعیین وزن مولکولی ترکیبی است که اوزان آن برایمان مجهول میباشد.

G۲۵۰ باندهای پروتئینی به ترتیب وزن مولکولی ظهور می‌یابند. الگوی الکتروفورزی حاصل از عصاره پروتئینی استخراج شده از دیواره سلولی در شکل ۱ طیف وسیعی از باندهای پروتئینی با وزن مولکولی متفاوت را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از تعیین غلظت پروتئینی به روش برادفورد

در این مطالعه از روش براد فورد برای سنجش میزان پروتئین‌های نمونه استفاده شده است. منحنی استاندارد برادفورد در شکل ۲ نشان داده شده است. پس از قرائت دانسیته‌های مربوطه با دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۵۹۰ nm غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. غلظت پروتئین نمونه با این روش ۲ mg/ml بوده است.



شکل ۲ – منحنی استاندارد BSA به روش برا دفورد

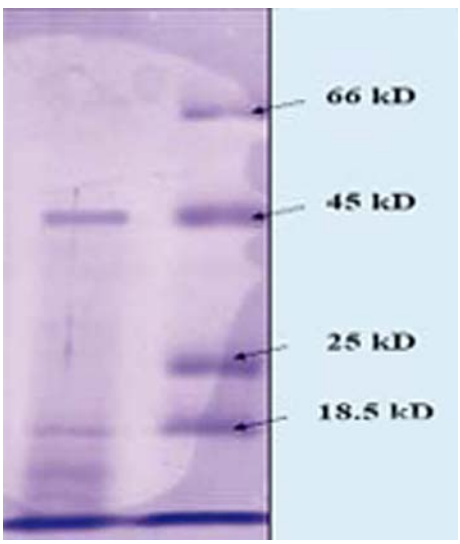
BSA یک آلبومین سرم گاوی می‌باشد و به عنوان یک پروتئین استاندارد جهت سنجش غلظت ترکیبی که حاوی پروتئین می‌باشد بکار گرفته می‌شود همان‌طور که در شکل مشخص می‌باشد از غلظت‌های مختلف این پروتئین استاندارد استفاده شده و هر یک از این غلظت‌ها دارای جذب نوری خاصی می‌باشند و بدین ترتیب منحنی استاندارد ترسیم می‌شود و جذب نوری ترکیب مجهول قرائت شده ودر منحنی استاندارد قرار می‌گیرد و بدین ترتیب غلظت مجهول تعیین می‌شود.

نتایج حاصل از اولترافیلتراسیون ترکیب حاوی پروتئین دیواره سلولی

پس از مشاهده الگوی پروتئینی با وزن‌های مولکولی مختلف در SDS-PAGE به منظور حذف باندهای غیرضروری اولترافیلتراسیون بر روی نمونه انجام شد. در این مطالعه با توجه به نتایج SDS-PAGE از ۵۰Cut off KD استفاده نمودیم. پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بیشتر از ۵۰ KD در فاز بالایی لوله اولترافیلتر قرار گرفته و فاز پایینی که محتوی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کمتر از ۵۰ KD بودند دور ریخته شدند.

نتایج حاصل از الکتروفورز مجدد پس از انجام اولترافیلتراسیون

به منظور تایید حذف باندهای اضافی و خالص سازی بیشتر نمونه پروتئینی دوباره الکتروفورز SDS-PAGE با همان شرایط قبل بر روی ژل ۱۰٪ آگاروز انجام گرفت. نتایج الکتروفورز نمونه بعد از اولترافیلتر در شکل ۳ نشان داده شده است. الگوی پروتئینی نمونه بعد از اولترافیلتراسیون نشان می‌دهد که تعدادی از باندهای اضافی حذف شدند و میزان خلوص نمونه افزایش پیدا کرده است. در اینجا بیشتر باندها دارای وزن مولکولی حدود ۵۵-۴۰ کیلودالتون می‌باشند.



شکل ۳- الکتروفورز حاصل از عصاره پروتئینی دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس پس اولترافیلتراسیون

نمونه سمت راست: مارکر پروتئینی با وزن مولکولی استاندارد میباشد.
نمونه سمت چپ: ترکیب پروتئینی دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس که پس از اولترا فیلتر و حذف باندهای اضافی میزان خلوص افزایش یافته و دارای وزنی در حدود ۴۵ کیلو دالتون است

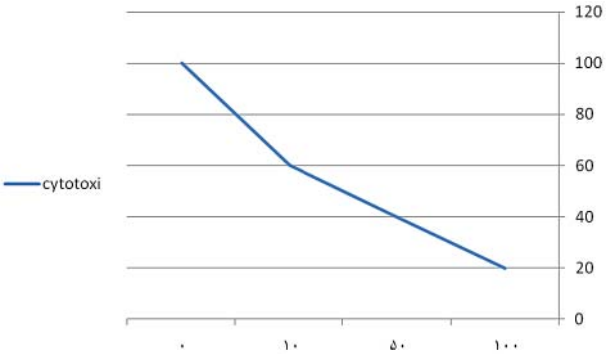
نتایج حاصل از آزمون L.A.L

پس از انجام تست L.A.L در لوله‌های تست محتوی ترکیب پروتئینی استخراج شده از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس هیچ گونه انعقاد ژل و تغییر رنگی که نشان دهنده وجود لیپو پلی ساکارید باشد

دیده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره پروتئینی تخلیص شده، فاقد لیپو پلی ساکاریدبوده است. انجام این تست سریع بوده و حساسیت آن نیز مطلوب است.

نتایج آزمون زایموگرافی

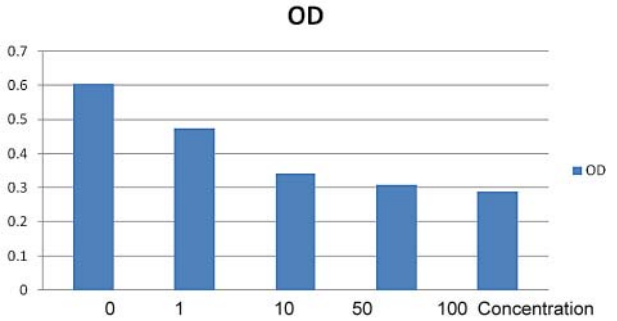
زایموگرافی جهت تأیید اثر مهاری ترکیبات دیواره سلولی روی فعالیت آنزیم‌های MMP۲ و MMP۹ در رده سلولی HT۱۰۸ انجام شد. در نمودار ۱ نشان داده شده که فعالیت MMP۲ به‌طور قابل ملاحظه‌ای در حضور سلول‌های تیمار شده با ترکیبات دیواره سلولی و به مدت ۲۴ ساعت کاهش یافته و با افزایش غلظت فراکشن‌های دیواره سلولی میزان آنزیم‌های متالو پروتئیناز کاهش یافته است که این امر کاملا وابسته به دوز بوده است. بیشترین کاهش میزان آنزیم مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بوده است.



نمودار ۱- اثر فراکشن‌های دیواره سلولی کاندیدا بر مهار تولید آنزیم‌های متالوپروتئیناز در زایموگرافی. با افزایش غلظت فراکشن‌ها میزان تولید متالوپروتئینازها کاهش یافته است.

نتایج حاصل از آزمون سایتوتوکسیسیتی MTT

نتایج حاصل از این تست در نمودار ۲ برای هر کدام از غلظت‌های فراکشن‌های دیواره سلولی نشان داده شده است.با افزایش غلظت‌ها میزان جذب نوری چاهک‌ها کاهش یافته است که نشان دهنده کاهش فعالیت آنزیم MMP می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که (P<۰/۰۵) بوده است و کاهش تولید آنزیم‌های متالوپروتئیناز توسط سلول‌های فیبروسارکوما معنی‌دار بوده است در غلظت ۱۰۰μg/ml از ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس P =۰/۰۰۳ بوده است.



نمودار ۲- اثر فراکشن‌های دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس در غلظت‌های ۰ μg/ml و ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰) نشان داده شده است.با افزایش غلظت فراکشن‌ها میزان زنده بودن سلولهای توموری کاهش یافته است که نشان دهنده کاهش میزان آنزیم متالوپروتئیناز بوده است.

بحث

دلیل اصلی مرگ و میر مربوط به سرطان‌ها متاستاز آنها می‌باشد که متاستاز در ارگان‌های مختلف یا در مناطق مختلف از همان ارگان رخ می‌دهد. سلول‌های متاستاز دهنده از نظر بیولوژیکی هتروژن می‌باشند و شامل: جمعیت‌های سلولی مختلف با عملکردهای متنوع، سرعت رشد متفاوت، گیرنده‌های سطحی مختلف، خواص آنتی‌ژنتیکی و ایمونوژنیسیتی و پرو فایل آنزیمی متفاوت از یکدیگر می‌باشند (۹، ۱۰).

متالوپروتئینازهای ماتریکس (زمینه‌ای) جزء گروه اصلی آنزیم‌ها می‌باشند که ترکیبات ماتریکس سلولی را با استفاده از روی (به‌عنوان کوآنزیم) جهت فعالیت‌های پروتئولیتکی تجزیه می‌کنند.این آنزیم‌ها برای فرآیندهای بیولوژیکی مختلف طبیعی از قبیل توسعه جنینی، شکل‌زایی (مورفوژنز) و تولید بافت‌های جدید ضروری می‌باشند. متالوپروتئینازها نقش مهمی در فرآیندهای پاتولوژیکی، شامل: التهاب، آرتریت، بیماری‌های قلبی – عروقی، بیماری‌های ریوی و سرطان ایفا می‌کنند. بسته اختصاصیت سوبسترا و ساختار دومینی آنها، متالوپروتئینازها به ۴ زیرگروه عمده تقسیم‌بندی می‌شوند. یکی از زیرگروه‌ها شامل ژلاتیناز نوع IV و کلاژناژمی باشد که سبب تخریب ژلاتین می‌گردند. این زیرگروه‌ها MMP (متالوپروتئینازها) شامل اعضای مجزا به‌عنوان ژلاتیناز A(MMP۲) و ژلاتیناز B (MMP۹) می‌باشد. MMP۲ و MMP۹ در تومورزایی و متاستاز تومور نقش اصلی دارند. (در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای در شناسایی مهارکننده‌های MMP صورت گرفته است. در تحقیقات مختلفی ذکر شده که تعدادی از MMP دارای فعالیت‌های ضدنئوپلازی می‌باشند (۱۱). ترکیبات

ضدسرطانی موجود در کاندیدا آلبیکنس مربوط به بخش حاوی پلی ساکاریدها از جمله گلوکان، می‌باشد.از آنجایی که ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا در این مطالعه حاوی گلوکان بوده است می‌توان خاصیت ضد توموری آن را به گلوکان موجود در دیواره نسبت داد. بتا گلوکان‌ها ترکیبات پلی ساکاریدی طبیعی می‌باشند. این پلیمرهای گلوکزی در دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد (از جمله در کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فومیگاتوس و هم چنین ساکارومایسس سرویسیه). ترکیبات اصلی دیواره سلولی قارچ‌ها پلی ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد که ۷۰ در صد وزن خشک آنها را شامل می‌شود. برای مثال در کاندیدا آلبیکنس دیواره سلولی شامل سه تا هشت لایه است (لایه داخلی حاوی بتاگلوکان نامحلول ۳۰ تا ۳۵٪، لایه میانی حاوی بتاگلوکان محلول ۲۰ تا ۲۲٪ و لایه خارجی حاوی گلیکوپروتئینی حدود ۳۰٪ را شامل می‌شود (۱۲ ، ۱۳).

بتاگلوکان‌ها دارای خواص تعدیل کننده سیستم ایمنی می‌باشند. بیمارانی که مبتلا به عفونت‌های قارچی از قبیل کاندیدیازیس، آسپرژیلوزیس و غیره می‌باشند، در سرم خود دارای مقادیر بالایی از بتاگلوکان می‌باشند. به همین دلیل فعال‌سازی ماکروفاژها و عمل فاگوسیتوزیس پاتوژنها و میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی در این دسته از بیماران بالاتر می‌باشد. بتاگلوکان‌ها نقش اصلی خود را از طریق فعال‌سازی ماکروفاژها ایفا می‌کنند. ماکروفاژ در دفاع سیستم ایمنی اختصاصی و ذاتی نقش مهمی را ایفا می‌کند. ماکروفاژ قادر به تولید و ترشح سایتوکاین التهابی از قبیل IL-۱, IL-۶, IL-۸, IL-۲ و INF-α و همچنین عوامل ضد میکروبی ا زقبیل نیتریک اکساید NO، پر اکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌با شند. بنابراین فعال‌سازی ماکروفاژها توسط بتاگلوکان سبب افزایش عملکرد سیستم ایمنی میزبان می گردد (۱۴، ۱۵). مطالعات متعددی (در حال حاضر بیش از ۶۰۰۰ مقاله) نشان دادند که بتا ۱ و ۳ گلوکان هم فرم محلول و هم فرم ذره‌ای (نامحلول) آن دارای خصوصیت تعدیل کننده سیستم ایمنی شامل خواص ضد باکتریال، ضد توموری می‌باشد (۱۶). بتاگلوکان‌ها همچنین دارای خواص ضد کارسینوژنیک می‌باشد. سلول‌های کشنده طبیعی در دفاع علیه تومورها نقش مهمی را ایفا می‌کنند. از آنجایی که بتاگلوکان‌ها می توانند سبب فعال سازی سلول‌های کشنده طبیعی شوند قادر به مهار رشد تومور در مراحل مختلف می‌باشند. بتاگلوکان را می‌توان به عنوان ادجوانت در رادیوتراپی بیمارانی که تحت شیمی درمانی، بیماری‌های خونی و سایر بدخیمی‌ها هستند بکار برد. در سرطان‌ها گلوگان به‌عنوان مکمل به منظور کاهش اثرات جانبی در طول شیمی درمانی یا رادیوتراپی جهت به حداقل رسانیدن متاستازو جلوگیری از عود بیماری می‌تواند کاربرد داشته باشد.گلوکان با مهار سنتز DNA در سلول‌های سرطانی، تخریب آنزیم‌های مؤثر در فعالیت سلول‌های توموری، افزایش عملکرد ماکروفاژها و تنظیم فعالیت لنفوسیت B و T قادر است سرعت انتشار و متاستاز سلول‌های سرطانی را کاهش دهد (۱۸، ۱۷). همچنین گلوکان قادر به فعال سازی سلول‌های NK (کشنده طبیعی) در موش‌های مبتلا به سرطان نیز می‌باشد (۱۹). امروزه بر پایه اثرات ایمونومدیلاتورها، این ترکیبات به‌عنوان چهارمین روش در درمان سرطان مطرح هستند. در این تحقیق نتایج تاثیر ترکیبات دیواره سلولی با غلظت‌های μg/ml (۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱، ۰) بر روی سلول‌های فیبرو سارکوما نشان داد که این فراکشن در تمامی غلظت‌های گلوکان قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی فیبروسارکوما بوده است که در غلظت ۱۰۰μg/ml در تست MTT بیشترین مهار رشد سلول‌های سرطانی را موجب شد, ($P<۰/۰۵$) از آنجایی‌که میزان ($P<۰/۰۵$) بوده است بنا بر این مها رشد سلول‌ها که با روش تعیین میزان سایتوتوکسیسیته سلول‌ها سنجیده شد معنا دار بوده است و با نتایج زایموگرافی همخوانی داشته است. کاهش در آنزیم‌های مؤثر در فعالیت سلولهای توموری، نوید کاهش سرعت در انتشار و گسترش متاستاز سلول‌های سرطانی و کاهش و یا متوقف ساختن رشد آنها می‌باشد.

با توجه به یافته‌های این تحقیق که مشخص گردید این ترکیبات جدا شده از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس قادر به مهار رشد سلول‌های فیبرو سارکوما و همچنین مهار تولید آنزیم‌های متالوپروتئیناز می‌باشند و همچنین سایر مطالعات انجام شده در رابطه با خواص ایمنوایستمولاتوری این ترکیبات پلی‌ساکاریدی، می‌توان این پلی‌ساکارید را به‌عنوان یک مکمل غذایی و یا دارو جهت درمان و یا کنترل کننده سلول‌های سرطان معرفی نمود.

References

1- Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude GA. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). Int Immunopharmacol 2007; 7(6): 701-24.
2- Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. Anti-tumor and immunomodulating effects of Pleurotus ostreatus mycelia-derived proteoglycans. Int Immunopharmacol 2006; 6(8): 1287-97.
3- Yoon TJ, Kim TJ, Lee H, Shin KS, Yun YP, Moon WK, et al. Anti-tumor metastatic activity of [beta]-glucan purified from mutated Saccharomyces cerevisiae. Int Immunopharmacol 2008; 8(1): 36-42.
4- Shahverdi AR, Saadat F, Khorramizadeh MR, Iranshahi M, Khoshayand MR. Two matrix metalloproteinases inhibitors from Ferula persica var. persica. Phytomedicine 2006; 13(9-10): 712-7.
5- Van Doren SR, Kurochkin AV, Hu W, Ye QZ, Johnson LL, Hupe DJ, et al. Solution structure of the catalytic domain of human stromelysin complexed with a hydrophobic inhibitor. Protein Sci 1995; 4(12): 2487-98. eng
6- Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal [beta]-(1--> 3),(1--> 6)-glucans. Mycol Res 2007; 111(6): 635-52.
7- Mantovani MS, Bellini MF, Angeli JP, Oliveira RJ, Silva AF, Ribeiro LR. beta-Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. Mutat Res 2008; 658(3): 154-61.
8- Slamenova D, Labaj J, Krizkova L, Kogan G, Sandula J, Bresgen N, et al. Protective effects of fungal (1-->3)-beta-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. Cancer lett 2003; 198(2): 153-60.
9- Wang T, Zhang Y, Wang Y, Pei YH. Anti-tumor effects of Rubratoxin B on cell toxicity, inhibition of cell proliferation, cytotoxic activity and matrix metalloproteinase-2,9. Toxicol In Vitro 2007; 21(4): 646-50. eng
10- Fidler IJ, Kim SJ, Langley RR. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. J Cell Biochem 2007; 101(4): 927-36. eng
11- Mannello F, Gazzanelli G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. Apoptosis : an international journal on programmed cell death 2001; 6(6): 479-82.
12- Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Miura NN, Yadomae T. Application of Candida solubilized cell wall beta-glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. Int Immunopharmacol 2002; 2(1): 59-67.
13- Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Tanaka S, Tamura H, Yadomae T. Immunopharmacological and immunotoxico-logical activities of a water-soluble (1-->3)-beta-D-glucan, CSBG from Candida spp. International journal of immunopharmacology 2000; 22(5): 383-94.
14- Lavigne LM, Albina JE, Reichner JS. Beta-glucan is a fungal determinant for adhesion-dependent human neutrophil functions. J Immunol 2006; 177(12): 8667-75.
15- Kim GY, Choi GS, Lee SH, Park YM. Acidic polysaccharide isolated from Phellinus linteus enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from peritoneal macrophages. J Ethnopharmacol 2004; 95(1): 69-76.
16- Novak M, Vetvicka V. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. J Immunotoxicol 2008; 5(1): 47-57.
17- Berdal M, Appelbom HI, Eikrem JH, Lund A, Zykova S, Busund LT, et al. Aminated beta-1,3-D-glucan improves wound healing in diabetic db/db mice. Wound Repair Regen 2007; 15(6): 825-32.
18- Smith JE, Rowan N, Sullivan R. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatmentsTrans]. Cancer Research UK; 2002.
19- Sliva D, Labarrere C, Slivova V, Sedlak M, Lloyd FP, Ho NWY. Ganoderma lucidum suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2002; 298(4): 603-12.
20- Casanova M, Chaffin WLJ. Cell wall glycoproteins of Candida albicans as released by different methods. J Gen Microbiol 1991; 137(5): 1045.