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

بهزاد صالحی[۱]، منصور بیات[۱*]، مهروز دزفولیان [۲]، آذر سبکبار[۲]، بهمن تبرایی[۳]

چکیده

امروزه سرطان بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸ دومین عامل مرگ و میر درجهان می‌باشد. استفاده از پلی ساکارید های قارچی یکی از راه های ارزانتر، کم خطرترو 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 وتعیین ویژگی های شیمیایی آن باروش هایFT-IR و HPLC و نقش ضد سرطانی آن برروی سل لاین های لنفوییدی (LCL) و هلا (Hela) می باشد. دراین مطالعه نمونه قارچ فوزاریوم از خاک منطقه کرج جداسازی گردید وبه روش میکروسکوپی وماکروسکوپی و ژنتیکی درحد جنس شناسایی شد . وسپس 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 قرارگرفت .مقادیر مختلفی ازگلوکان استخراج شده را به کشتهای سلولی LCLوHela اضافه شد واثرات سایتوتوکسیسیته آن بررسی شد.نتایج کشت نشان داد پلی ساکارید گلوکان نقش ضد سرطانی بر روی سلول های لنفوییدی داشت اما بر روی سلول های هلا اثر ضدسرطانی نداشت. اثرات سایتوتوکسیسیته پلی ساکارید گلوکان با روش کالریمتری (MTT) نشان داده شد.

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۱

مقدمه

سرطان بیماری است که درآ ن سلولها بطور غیر عادی و بدون کنترل تقسیم می شوند رشد می کنند و توده سلولی ایجاد میکنندکه می تواندخوش خیم (Benign) و محدود به یک بافت باشدو نیز میتواند مهاجرت(Metastasis) کند و بافتهای دیگر را سرطانی نماید که در این حالت به آن بدخیم (Malignant) می گویند (۱). بروز سرطان علتهای زیادی دارد که ازآن میان می توانیم به: ژنهای سرطان زا (oncogenes)، اختلال در ژنهای مهارکننده تومور، اختلال در ژن p53 ، مایتوژنها، پیری سلولها(Aging)، موتاسیون درژنها، نقص درکنترل مرگ برنامه ریزی شده(Apoptosis)، کوتاه شدن تلومر، عوامل شیمیایی، عوامل فیزیکی،ویروسها وباکتریها، رژیم غذایی وعوامل داخلی اشاره کرد. (۱, ۲)شیوع وفراوانی مرگ ومیر دراثر سرطان درجهان در سال ۲۰۱۸ به ۹/٦ میلیون نفر رسید(۳).ودر ایران درسال۱۳۹٦ -۱۳۹۷ یکصدوده هزارمبتلا به سرطان شناسایی گردید که ازاین میان پنجاه و شش هزار نفر فوت کردند. (٤) پیشگیری مهمتر از درمان است، تقریبا۵۰-۳۰ درصد سرطان های رایج رامیتوان با پرهیز ازعوامل خطر مهار نمود: عدم استفاده از سیگار و تنباکو و حتی تنباکوی بدون دود، عدم استفاده ازالکل، رژیم غذایی سالم مثل: استفاده زیاد از میوه و سبزیجات، جلوگیری از افزایش وزن وچاقی،انجام فعالیت های فیزیکی، جلوگیری از پرتو های ماورای بنفش و یونیزان، کاهش آلودگی هوای شهری، پرهیز ازسوخت های فسیلی در خانه، عدم آمیزش جنسی با افراد مبتلا به ویروس پاپیلومای انسانی(HPV)، هپاتیتB، هپاتیت C، واکسیناسیون در برابر ویروس پاپیلومای 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: ادنوویروس ها و پاپیلوما ویروس ها می توان اشاره کرد.(۲, ٦). هزینه درمانی بالا، عوارض جانبی زیاد ، از بین رفتن سلولهای سالم بدن ، طولانی بودن درمان از جمله معایب این روشها است.یافتن راههای جدید

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

۲-گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم پایه ،دانشگاه ازاداسلامی واحد کرج،کرج،ایران

۳-انستیتو پاستورایران،تهران، ایران

کم خطرتر، ارزانتر ، با عوارض جانبی کمتر و موثرتر از ضروریات این تحقیق است. گلوکان یک پلی ساکارید است که ازواحد های منومری گلوکز تشکیل شده است که بیشترین پلی ساکارید تشکیل دهنده قسمت بیرونی دیواره سلولی در اکثر قارچها می باشد ومعمولا از طریق پیوندهای گلیکوزیدی بین کربن شماره۱ باکربن شماره٤و۳ و٦ گلوکز بعدی ارتباط برقرار می کند.استفاده از گلوگان قارچهای خوراکی درتقویت سیستم ایمنی ذاتی و حذف سلوهای سرطانی در برخی مقالات اشاره شده است.(٦, ٧). نقش تحریک کنندگی گلوکان قارچی بر روی سلولهای NKcells، Bcells وTcells نیز مشاهده گردید.(۸). برخی فعالیتهای 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 گیرند هایی نظیر:TLRS,Dectin,Mannose,CR3,CD4 می توانند سیستم ایمنی را با تکثیروتمایز 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 اغاز پاسخهای ایمنی سلولار وهومورال میگردند.(۸و۹). قارچ فوزاریوم یک جنس بزرگ ازقارچهای شاخه آسکومایکوتا وزیرشاخه پزیزومایکوتینا ورده سورداریومیست ها وراسته هیپو سرال ها وخانواده نتریاسه می باشد. قارچ فوزاریوم یک قارچ ساپروفیت و بیماریزای فرصت طلب است درخاک 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 میکند. اما بیماری در افرادیکه نقص سیستم ایمنی دارند ویا به طریقی سیستم ایمنی ضعیف شده دارند مثل :نوتروپنی ، عفونتهای فوزاریومی مهاجم بدن وگردش خون را ابتلا می نماید که مربوط است به این گونه ها : فوزاریوم سولانی،فوزاریوم اکسیسپوروم ،فوزاریوم ورتیلوِییدز و فوزاریوم پرولیفراتوم. در اروپاوآمریکای شمالی ازفوزاریوم وناتوم 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 ولرز ، ضعف عضلانی، کاهش مغز استخوان ، کاهش گرانولوسیتها، عفونت ثانویه، زخم لارنژیت، خونریزی زیرپوستی، 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 ازخاک 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 لنفوییدیLCL و کارسینومای Hela بود.

مواد و روش‌کار

جداسازی و شناسایی قارچ فوزاریوم

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

بدست امد و به مدت ۳-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرارداده شد وکلونیهای تک قارچی از طریق میکروسکوپی مورد مشاهده قرار گرفتند وکلونیهای مربوط به قارچ فوزاریوم به روش کشت روی لام وکشت درپلیت بطور میکروسکوپی وماکروسکوپی موردشناسایی قرارگرفت.

شناسایی مولکلی قارچ

استخراجDNA قارچ: ابتد ا نمونه ایزوله شده قارچ را در محیط کشت شیبدار سابورودکستروز اگار 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 در۲۰۰۰ g سانتریفوژگردید، وبا 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 ٤۰۰ میکرومول لایزیس بافر اضافه شد و بمدت ۵ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. بلافاصله به ان ٦۰۰ 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.دراین بین محلول پرسیپیتاسیون تهیه شد و فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید و به ان ۸۰۰ میکرولیتر از محلول تازه تهیه شده پرسیپیتاسیون اضافه شد وکاملا سروته شد وپنج دقیقه درداخل اتاق **گذاشته شد و میکروتیوب رابه مدت** دودقیقه دردور۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ گردید.رویه را دور ریخته و رسوب DNA را در۱۰۰ میکرومول کلرید سدیم حل گردید، چند بار ورتکس کرده تا رسوب کاملا حل گردید، بعد۳۰۰ میکرومول اتانل سرد و ده دقیقه دردمای ۲۰- درجه سلسسیوس قرار داده شد وسپس در دور۱۰۰۰۰g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ گردید، اتانل راتخلیه کرده واجازه داده شد تا باقیمانده اتانل خشک شود و پس از خشک شدن ۱۰۰ میکرومول اب مقطر دی یونیزه اضافه گردید و سپس DNA حاصل درفریزر نگهداری گردید(۱۲).

PCR برای ناحیه ژن18SrRNA وتعیین توالی آن

تکثیرژن 18SrRNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز وآنزیم Taq DNA پلیمراز و با استفاده از پرایمر های جهانی قارچی فورورد و ریورس انجام شد.(http://aftol.org/resources.php)

0817F(5-TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA-3).

1196R(5-TCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3)

این روش با استفاده ازترمو سایکلر (اپندورف المان) درحجم کلی ۲۵ میکرولیتر و ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA و۱۰ میکرو مول ازهر پرایمر،۱۰ میکرومول dNTPs و۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR و۰/۲۵ واحد از Taq DNA polymerase از کیت فرمنتاز انجام گردید.شرایط واکنش PCR ، دناتوراسیون اولیه در۹۵ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ دقیقه و٤۰ سیکل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر در ۵۲ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ دقیقه ودمای گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه وگسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل اگارز ۱ درصد(v/w) حاوی ۱۵ میکرولیتر رنگ DNAsafe (stain) وبا استفاده سیستم فلویورسانس uv مشاهده گردید. و سپس جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن اوران ارسال گردید.

کشت قارچ فوزاریوم واستخراج پلی ساکارید گلوکان:ابتداقارچ فوزاریوم در پلیت محیط کشت

سابارودکستروز اگار کشت شد بمدت ۵-۳ روز در دمای ۲۵درجه سلسیوس قرار گرفت. از کلنی های رشد کرده در این پلیت به اندازه یک دیسک شش میلیمتری به عنوان یکدانه تلقیح به محیط کشت سابورودکستروز براث به حجم ۲۵۰ میلی لیتری درارلن به حجم ۱۰۰۰میلی لیتر با مقدار ۲۰ درصد گلوکز کشت گردید و به مدت ۱۰-۵ روز در دمای۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار(۱۵۰ rpm) قرار داده شدت و بیشترین توده قارچی بدست امد. بعد از طی دوره انکوباسیون توده میسلیوم قارچی از محیط کشت مایع با استفاده ازفیلتر 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 درپلی ساکارید استخراج شدهمیزان خلوص پلی ساکارید استخراج شده به وسیله اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۳۰نانومتر و۲۸۰ نانومتر به ترتیب برای وجود پروتئین وDNA ارزیابی شد.

آنالیز پلی ساکارید گلوکان استخراج شده بوسیله طیف سنجی مادون قرمز روش فوریه(FT-IR):برای بررسی ساختار این پلی ساکارید وتعیین گروههای جانبی موجود در ان ابتدا پلی ساکارید آبگیری شدباقراردادن نمونه دراتاقک خلا حاوی پنتوکسید وانادیوم وسپس بانمک KBr کوبیده شده و دردستگاه قرارداده شد و در فرکانس محدوده بین cm^{-1} ۴۰۰۰-۵۰۰ طیف آن بدست آمد.

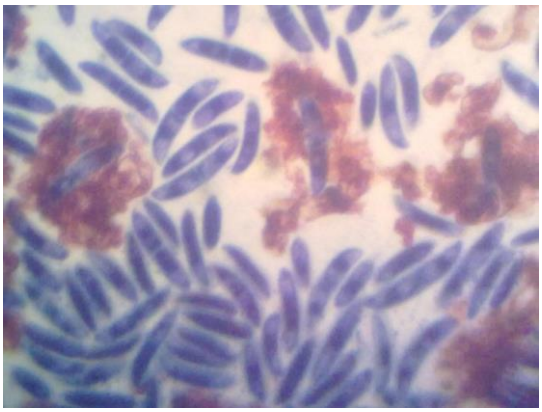
آنالیز پلی ساکارید استخراج شده بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC): بااستفاده از دستگاه HPLC (مارک Perkin Elmer سری ۲۰۰) وبا استفاده از ستون C18 ودتکتور (UV visible)۰/۳ گرم پلی ساکارید استخراج شده با استونیتریل مخلوط گردید وفاز تحرک A بدست آمد و سپس بافر نمکی فسفات۰/۱ درصد با PH3 بعنوان فاز B تهیه شد و به نسبت حجمی ۱۵:۸۵ یا A:B در دمای آزمایشگاه وبا جریان۰/۵ میکرولیتر بردقیقه وبا حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر ودر طول موج ۲۰۰ نانومتر و زمان حرکت ۵ دقیقه انجام گرفت.(۱۴).

کشت سلولهای Hela وLCL وتست سایتوتوکسیسیتی:برای بررسی میزان سایتوتوکسیسیتی از سل لاین های دودمان لنفوئیدی (LCL)و Hela استفاده گردید.این سلولها درداخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای کشت شدند.

شرایط کشت: محیط کشت RPMI و FBS ده درصد دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دی اکسید کربن۵ درصد به تعداد صد هزارسلول 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 ۲۰میلی گرم گلوکان در۱۰ میلی لیترآب مقطر استریل حل شدو۳ قطره هیدروکسید سدیوم ۱۰درصد اضافه شد سپس غلظت های ۱و۲و۳و۴ میلی گرم برمیلی لیتر گلوکان به سلولها اثر داده شد وبمدت۲۴ ساعت در۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از آن به سلول ها ۵۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده شد و به مدت سه ساعت درداخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد.(۱۵, ۱۶).

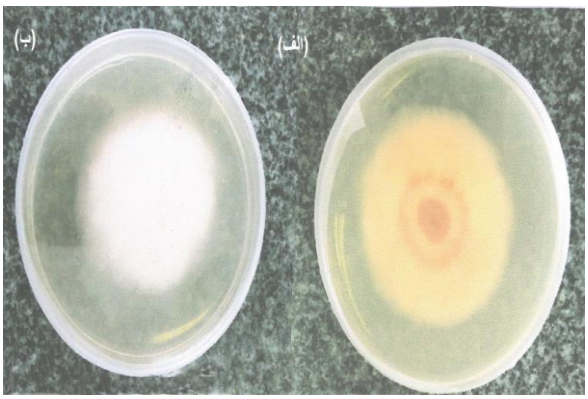
نتایج

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



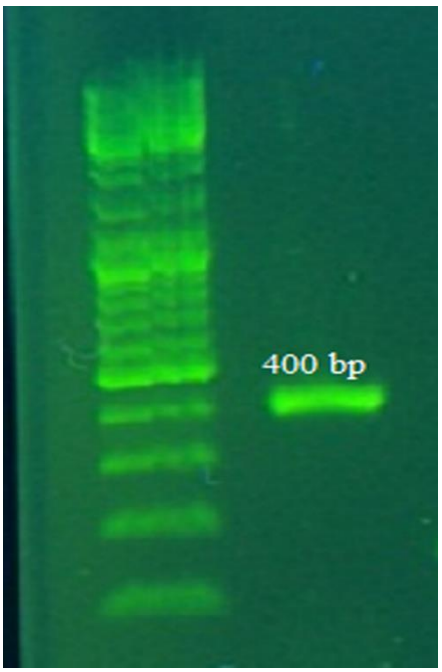
نگاره ۱- ساختمان میکروسکوپی قارچ فوزاریوم

ساختار ماکروسکپی قارچ بعد از کشت قارچ در مرکز پلیت سابورو دکستروز آگار وقراردادن در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس به مدت۳-۲ روزبه دست آمد. ویژگیهای سطح پلیت شامل کلنی های کرکی وپنبه ای سفید بارشد سریع بود و پشت پلیت به رنگ زرد ونارنجی بدست آمدکه ازاختصاصات قارچ فوزاریوم است.



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

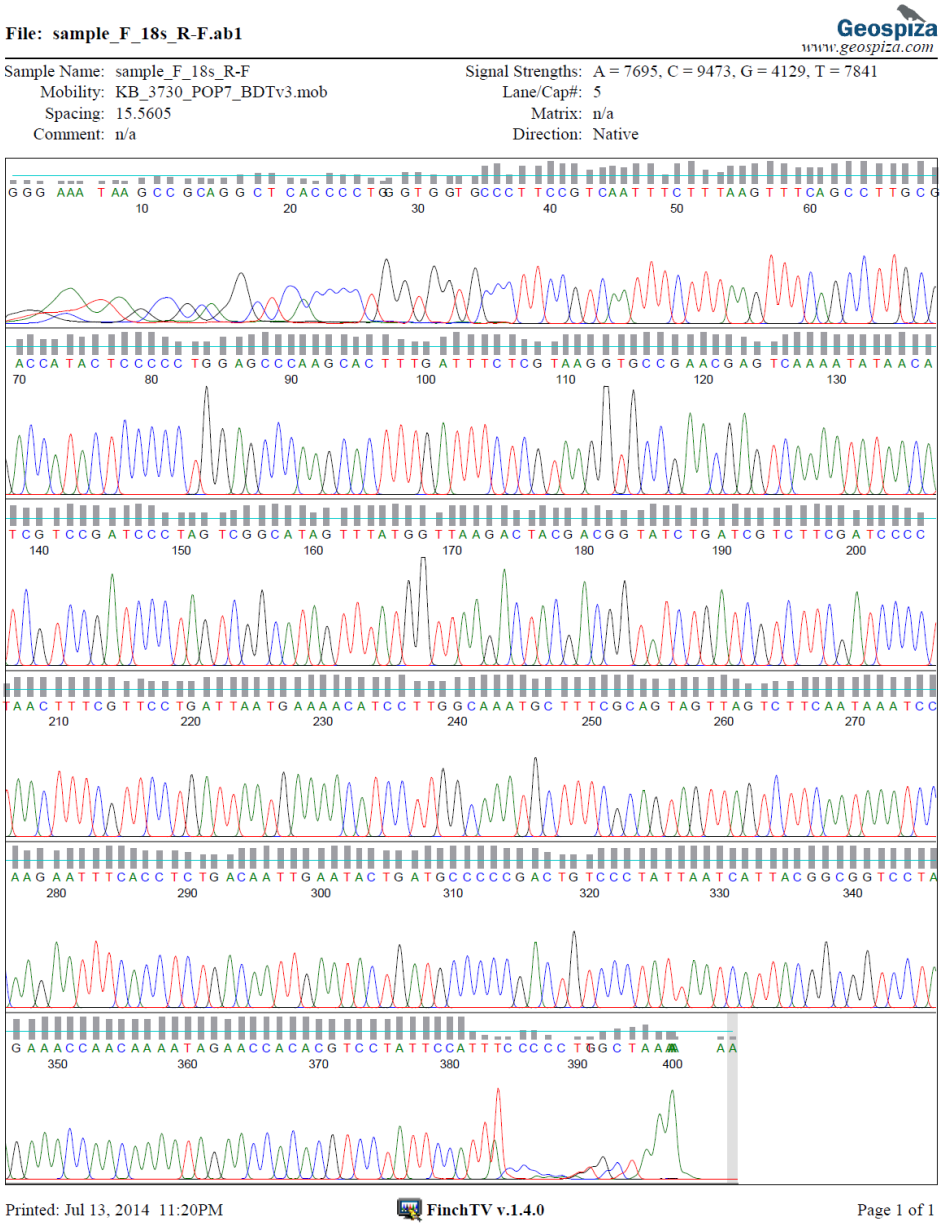
شناسایی ژنتیکی قارچ: پس از استخراج DNA قارچ و PCR برای ژن 18srRNA باندی به طول bp٤٠٠ درژل الکتروفورز بدست آمد (نگاره۳) سپس بعد از ارسال نمونه برای توالی یابی و دریافت کروماتوگرام های فوروارد وریورس توالی ها با نرم افزار Bioedit مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس با توالی های موجود در پایگاه Blast مرکز NCBI مورد مقایسه قرارگرفت و جنس فوزاریوم تایید گردید و با رسم درخت فیلوژنتیکی جایگاه آن در ژن 18SrRNA :۲- P 6 -S۳- X۱- P.۸۸ Fusarium S بدست آمد(۱۲).



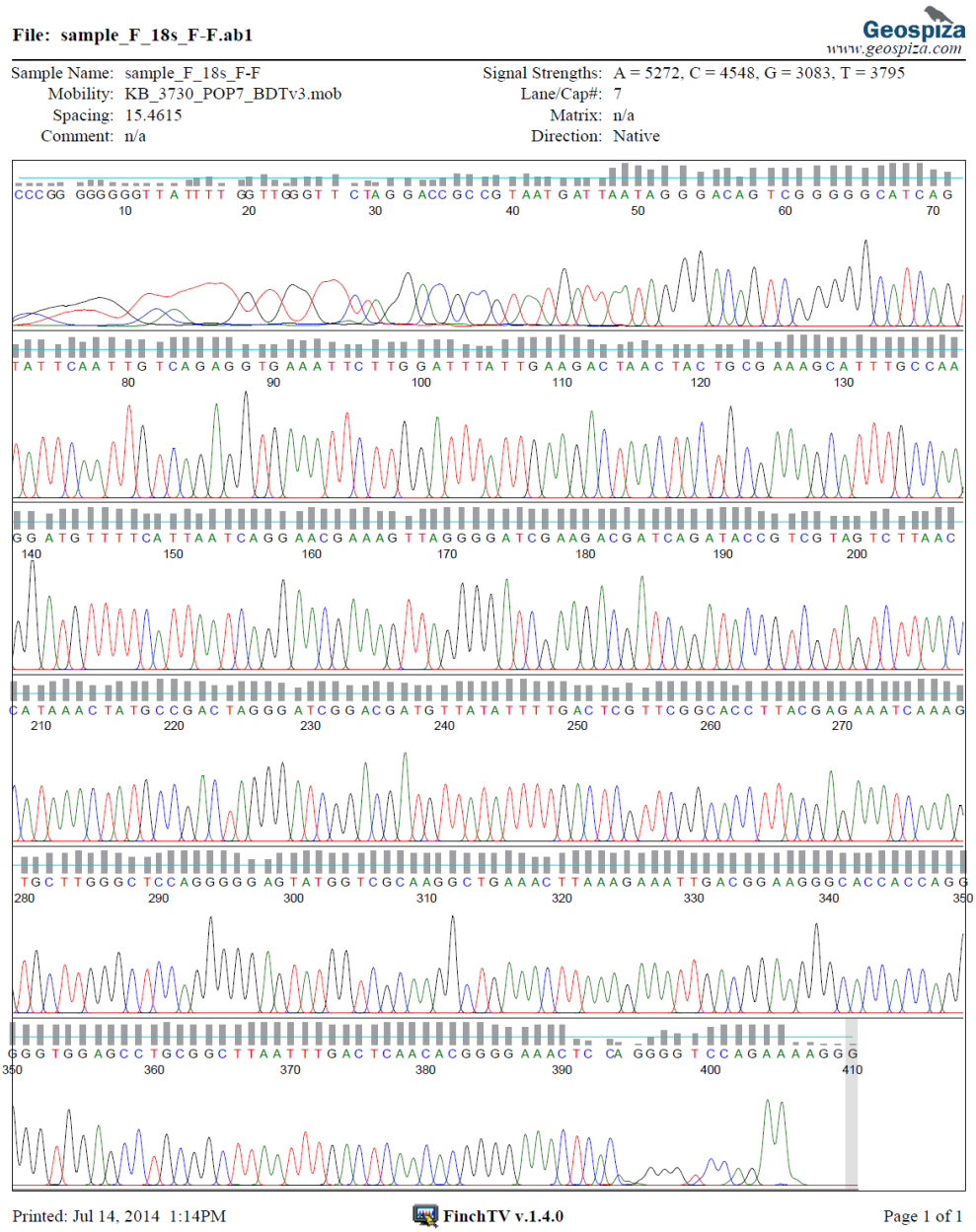
نگاره ۳- ژل الکتروفورز ژن 18srRNA

نتایج حاصل از کروماتو گرام FT-IR پلی ساکارید گلوکان استخراج شده: همانطور که کروماتوگرام نشان میدهد انواع گروههای جانبی موجود در مولکول عبارتنند از :نوار جذبی در ناحیه۳٤۲۳/۷۹ مربوط است به ارتعاش لرزشی گروه هیدروکسیل انتهایی ونوار جذبی در۲۹۲۳/۰۷ مربوط است به گروهای متیلن جانبی ونوارجذبی در ناحیه۱٦۲۹/٦٤ مربوط است بهH-O-H ونوار جذبی درناحیه۱٤۳۷/٦۱مربوط است C-C ونوار جذبی در ناحیه۱۳۸۰ مربوط است به چرخش H-C متیل متقارن ونوار جذبی در ناحیه ۱۰۲۰/٦۱ مربوط است به گروههای C-H داخلی ونوار جذبی در ناحیه۸۷۵/۲۲ مربوط است به گروهای C-H خارجی است(۱۷).که تایید کننده مولکول گلوکان است.(نمودار۳)

ب



نمودار ۱ –کروماتو گرام ریورس ژن SrRNA ۱۸

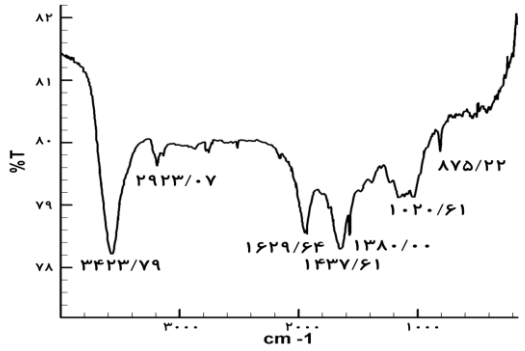


نمودار ۲ –کروماتوگرام فوروارد ژنSrRNA ۱۸

نتایج حاصل از کروماتو گرام FT-IR پلی ساکارید گلوکان استخراج شده

همانطور که کروماتوگرام نشان میدهد انواع گروههای جانبی موجود در مولکول عبارتنند از :نوار جذبی در ناحیه۳٤۲۳/۷۹ مربوط است به ارتعاش لرزشی گروه هیدروکسیل انتهایی ونوار جذبی در۲۹۲۳/۰۷ مربوط است به گروهای متیلن جانبی ونوارجذبی در ناحیه۱٦۲۹/٦٤ مربوط است بهH-O-H ونوار جذبی درناحیه۱٤۳۷/٦۱مربوط است C-C ونوار جذبی در ناحیه۱۳۸۰ مربوط است به

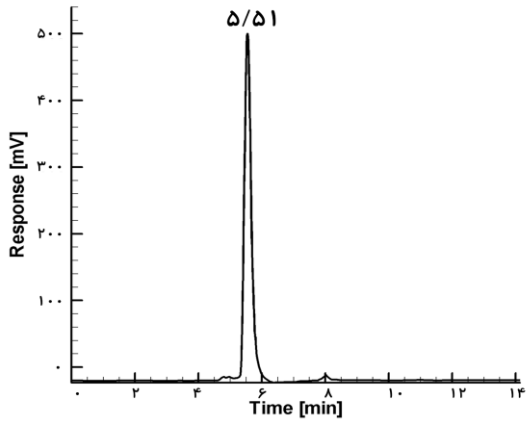
چرخش H-C متیل متقارن ونوار جذبی در ناحیه ۱۰۲۰/٦۱ مربوط است به گروههای C-H داخلی ونوار جذبی در ناحیه۸۷۵/۲۲ مربوط است به گروهای C-H خارجی است(۱۷).که تایید کننده مولکول گلوکان است.(نمودار۳)



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

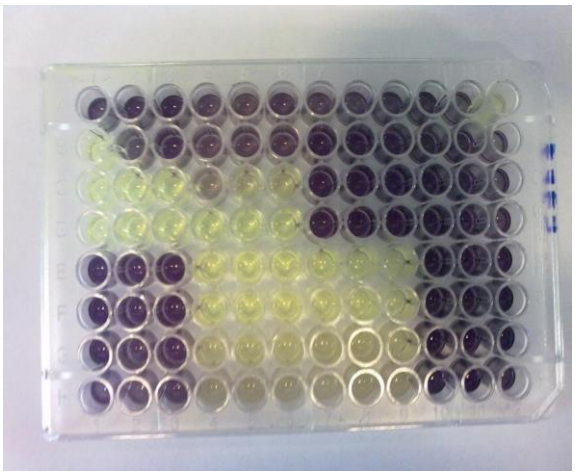
نتایج بدست امده ازکروماتوگرام HPLC

پس از انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ازنمونه پلی ساکارید بالا ترین peak بدست امده در محدوده بین ۵و٦دقیقه به دست آمد که تاییدی بر گلوکان است.(۱۸)(نمودار٤).



نمودار٤ – کروماتوگرام HPLC پلی ساکارید گلوکان قارچ فوزاریوم

نتایج حاصل از تست سایتوتوکسیسیتی:MTT ،نمک تترازولیوم زردرنگ می باشد که تنها در صورت سلامت میتوکندریها به فورمازون ارغوانی رنگ تبدیل میشود.بنابر این تولید فرمازون ارغوانی با تعداد سلولهای زنده ومیتوکندریهای سالم موجود متناسب است.مقدار رنگ ایجاد شده بوسیله الایزا ریدر درطول موج ۵۵۳ نانومتر خوانده شد.نتایج حاصل نشان داد گلوکان استخراج شده دارای تاثیرات سایتو توکسیک بر روی رده سلولی Hela نمی باشد، ولی بر روی رده سلولی LCL تاثیرات سایتوتوکسیک مشخصی را نشان داد.(نگاره٤)(۱۸).



نگاره ٤- تست MTT برای سل لاین های LCL وHela رنگ ارغوانی سلولهای سرطانی سالم ورنگ زرد سلولهای سرطانی ازبین رفته در واکنش با معرف تترازولیوم

بحث

در این تحقیق جداسازی قارچ از نمونه خاک به روش غربالگری اولیه وبدست آوردن کلونیهای تک وشناسایی میکروسکپی وماکروسگپی قارچ انجام گرفت .به منظور جلوگیری از رشد باکتریها در پلیت از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل استفاده شد. شناسایی ژنتیکی قارچ با استفاده از ژنهای ۱۸SrRNA انجام شد.که توالی های حفاظت شده ای

هستنند به طول ٤٠٠bpکه بین توالی هایITS1,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 امد وباتوالی های موجود در بانک ژنی مورد مقایسه قرار گرفتند وجایگاه فیلوژنتیک قارچ در جنس فوزاریوم شناسایی گردید. برای کشت قارچ فوزاریوم به منظور تولید بیشرین مقدار پلی ساکارید گلوکان در محیط مایع سابورودکستروز براث با تغییر مقدار گلوکز بهینه سازی برای افزایش میزان گلوکان انجام شد.دراین تحقیق چون هدف تولید بیشتر گلوکان است و منومر آن گلوکز است از این رو مقدارگلوکزدو برابر درنظر گرفته شد. برای حذف پلی ساکاریدهای محیط کشت مایع چندین بار توده قارچی با آب مقطر استریل وبافرنمکی فسفات شستشو شد سپس باروش Mizuno (١٣).برای استخراج گلوکان استفاده شد.

فوزاریوم یک قارچ رشته ای وساپروفیت است که دررده آسکومیست ها طبقه بندی می گردد ودراین تحقیق استفاده شده است اما در برخی مطالعات انجام شده مانندHsu ju وهمکاران در سال ٢٠١١ وElain وهمکاران در سال ٢٠١٣ و Meng وهمکاران درسال٢٠١٦ از قارچهای خوراکی مختلفی استفاده کردند.(٦, ٧, ١٩). تمایز این تحقیق با سایر تحقیقات میباشد. در این تحقیق برای آنالیز پلی ساکارید قارچی از تکنیک های HPLC , FT-IR استفاده شد. اما درتحقیقی که توسط Elain وهمکاران در سال٢٠١٣ انجام شد از تکنیک های C-NMR وH –NMR و GC –MS استفاده گردید.(٢٠) .در تکنیکHPLC بالاترین غلظت بدست آمده گلوکان درمحدوده ٥-٦ دقیقه به دست آمد که همانند نتیجه بدست آمده توسط Limin Gao در سال ٢٠١٤ میباشد. مزیت استفاده از روش FT-IR تعیین گروههای جانبی در ساختمان ملکول گلو کان است که با گروههای جانبی موجود درمنومر گلوکز مشابه است و بیانگرخواص فیزیکوشیمیایی آن مثل ویسکوزیته وگروههای عامل آن که دراتصال به سلول نقش دارند.(١٧). دراین تحقیق از سل لاین های لنفوئیدی LCL وHela استفاده گردید.سل لاین هایLCL همان سلول هایی هستنند که در سرطان سیستم لنفاوی (Lymphoma) نقش دارند وبه دو گروه لنفومای هوچکینی وغیر هوچکینی طبقه بندی میشوند.علت سرطانی شدن این سلولها ویروس EBV (Epstein Barr Virus) می باشد .سل لاین های Hela از سلولهای سرطانی گردن رحم خانم هنریتا لک(Henrieta Lack)درسال ١٩٤١ بدست آمد وقدیمی 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.درتحقیقات دیگر ازسل لاین های مختلفی استفاده شده است.مثلا Chan etal درسال ٢٠٠٨و Hsu etal در سال٢٠١١ از سل لاین های THP-1 برای مشاهد آپوپتوزیس سلولهای سرطانی روده استفاده کردند.و Yang etal درسال ٢٠١٦ ازسل لاین 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 اینورت میکروسکوپ سل لاین های LCL مشاهده شد کاهش بسیار زیادی درسلولهای سرطانی دیده شد. **سنجش توکسیسیته با استفاده ازتست MTT انجام گرفت که با سایر تحقیقات همخوانی دارد**.علت این تفاوت در عملکرد ونتیجه گیری می تواند مختلف باشد.مثلا یکی تفاوت در نوع ویروسی که درسرطانی شدن این سلولها دخالت داشته

است.واینکه سلولهای LCL به گلوکان پاسخ داده اند وگیرنده 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 وهمکاران درسال ۲۰۱۱ انجام گردید معلوم شد که فعال شدن ماکروفاژها از طریق گیرنده های Dectin-1 , TLR2 انجام می گیرد.ودر مطالعه ای که توسط Weis وهمکا ران درسال ۲۰۰۸ انجام شد معلوم شد که مکانیسم های ضد توموری شامل تحریک Tcells و Nkcells (۲۱) بیان سایتوکاین ها وتولید اکسید نیتریک می باشد.(۹) . ودرمطالعه ای که توسط Elaine وهمکاران درسال ۲۰۱۳ انجام گرفت نشان داد که سایتو کاین هایی مانند IL-1B وTNF-a در اثر بتا گلوکان قارچ pleuroteus sajo-caju مشاهده گردید.((۲۱). در مطالعه ای که توسط Huang وهمکاران 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 واگر انها را با اینتر لوکین ٤ وGMCSF اضافه کنند باعث ترشح سایتو کاین ومرگ 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). درتحقیق 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 مورداستفاده قرارداد .علت این خواص را می توان به ویژگی های فیزیکو شیمیایی ملکول گلوکان مثل ویسکوزیته ،وزن مولکولی آن ربط داد. وDertli در سال ۲۰۱۸ پی برد که کنفورماسیون مارپیچ سه گانه وحضور گروههای هیدروفیلی درسطح خارجی این مارپیچ درنقش بیولوزیک گلوکان اهمییت دارد.(١٤).ونقش ضد سرطانی این گلوکان با تحقیقات Cheickna درسال۲۰۱۲ و Demir درسال۲۰۰۷ و Liu درسال ۲۰۰۹ وChen درسال 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:Newyork. 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.

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 AlternativeMedicine. 2009;2011:33.
9- Wei S, Helsper JP, Van Griensven LJLD. 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.