Original Article

A Rapid Method for Extraction of Water Soluble β(1,3) Glucan from the Cell Wall of *Candida albicans*

Zahra Nasrollahi[1], Shahla Roudbar Mohammadi[2*], Fatemeh Atyabi[3], Zuhair Sarraf(Hassan)[4], Mohammad Hossein Yadegari[5], Mehdi Esfandyari[6], Esmail Mollarazi[7]

1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Nanotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5- Associated Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
6- Assistant Researcher, Nanotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University, Tehran, Iran
7- Ph.D., Nanotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: Sh.mohammadi@modares.ac.ir

Received: 08/Apr/2013, Accepted: 08/Jun/2013

Abstract

Objective: In recent decades, β-glucans have been used as important complementary and alternative medicines for numerous immunocompromised individuals and those with advanced cancer. The most active form of β-glucans is β(1,3)D-glucan and its most common source is cell wall of *Candida albicans*. Recently it has been introduced as a nano particle design to be used as a carrier for drug delivery. The current study researches a rapid method for the extraction of β(1,3)D-glucans.

Methods: The present study was conducted at Tarbiat Modares Medical University in 2012. Candida solubilized β-glucans were obtained by oxidation of the cell wall with sodium hypochlorite and sodium hydroxide. The particle part could be solubilized by treatment with dimethylsulfoxide (DMSO) and zymolyase digestion to extract β(1,3)D-glucan. The soluble fractions were lyophilized. We performed the Callose test to verify the presence of β(1,3)D-glucans. Solubilized fractions were dissolved in D2O and 1H-NMR spectra were measured.

Results: The soluble β(1,3)D-glucan fraction which was derived from 1 g of dried *Candida albicans* germ tube weighed 190 mg. β(1,3)D-glucan was verified by the Callose test and ^{1}H-NMR test compared with Curdlan (standard). ^{1}H-NMR spectra verified the existence of β(1,3)D-glucan in the final product.

Conclusion: In the present study, extraction of β(1,3)D-glucan by oxidation of the cell wall using sodium hypochlorite yielded more pure β(1,3)D-glucans in comparison with other extraction methods. Thus it might represent a rapid method of extraction.

Keywords: β(1,3)D-glucans, Oxidation of cell wall of *Candida albicans*, Enzymatic extraction

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 1, Spring 2013, Pages: 89-97

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

مقاله اصیل

روشی سریع برای جداسازی بتا ۱ و ۳ گلوکان محلول در آب از دیواره کاندیدا آلبیکنس

زهرا نصرالهی[۱]، شهلا رودبار محمدی[۲*]، فاطمه اطیابی[۳]، محمد زهیرحسن صراف[٤]، محمدحسین یادگاری[٥]، مهدی اسفندیاری‌منش[٦]، اسماعیل ملارضی[۷]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۶- دستیار تحقیقاتی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۷- دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ، ایران تهران، کدپستی ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
Email: Sh.mohammadi@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۱/۱۹ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۳/۱۸

چکیده

هدف: مطالعات دهه‌های اخیر روی بتاگلوکان‌ها، نقش این پلی‌ساکاریدها را به عنوان مکمل‌های غذایی و دارویی در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و نیز مبتلایان به سرطان بسیار پر اهمیت نشان داده است. از میان پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی قارچ‌ها، بتا ۱ و ۳ گلوکان فعالیت بالاتری دارد که به دو فرم محلول و نامحلول در آب قابل دستیابی است. طبق تحقیقات انجام شده فرم محلول بتا ۱ و ۳ گلوکان به دلیل فعالیت زیستی بالا و عملکردهای درمانی، به عنوان یک عامل مناسب و ایمن معرفی شده است. بتا ۱ و ۳ گلوکان علاوه بر کاربرد در مصارف تزریقی، به عنوان حامل داروسان هم در پژوهش‌های مرتبط با ساخت سیستم‌های نوین دارورسانی مورد توجه قرار گرفته که برای درمان سرطان در شکل نانوذره آن استفاده شده است. هدف از این مطالعه معرفی روش آسان و سریع استخراج بهینه فرم محلول در آب بتا ۱ و ۳ گلوکان از دیواره کاندیدا آلبیکنس است.

مواد و روش‌ها: این روش در سال ۱۳۹۱ در گروه قارچ‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس برای اولین بار انجام شد. در روش حاضر، استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان محلول در آب از طریق روش سریع اکسیداسیون دیوارهٔ کاندیدا آلبیکنس در فرم لوله زایا توسط پراکسید سدیم و هیپوکلریت سدیم انجام شد که در ادامه با تأثیر دی‌متیل سولفوکسید و آنزیم زایمولاز، بتا ۱ و ۳ گلوکان خالص به‌دست آمد. محصول به‌دست آمده توسط دستگاه لیوفلیزاتور در خلأ خشک و مقادیر آن محاسبه شد. آزمون کالوز با استفاده از معرف آنیلین بلو و طیف حاصل از ^{1}H -NMR (^{1}H Nuclear Magnetic Resonance) برای تأیید بتا ۱ و ۳ گلوکان به‌دست آمده، انجام شد.

نتایج: میزان ۱۹۰ میلی‌گرم بتا ۱ و ۳ گلوکان محلول در آب از ۱ گرم وزن خشک کاندیدا آلبیکنس در فرم لوله زایا، استخراج شد که با توجه به وزن خشک اولیه، معادل ٦۳ درصد دیواره کاندیدا آلبیکنس محاسبه شد. بتا ۱ و ۳ گلوکان تخلیص شده در مقایسه با کردلان (بتا ۱ و ۳ گلوکان استاندارد) در آزمون کالوز و نیز در دستگاه شناسایی ساختمان هیدروژن ^{1}H -NMR تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان محلول در آب از فرم لوله زایای کاندیدا آلبیکنس از طریق اکسید نمودن دیواره و خالص‌سازی آنزیمی نسبت به دیگر روش‌ها با مقادیر بالاتر و روش آسان‌تری انجام می‌پذیرد.

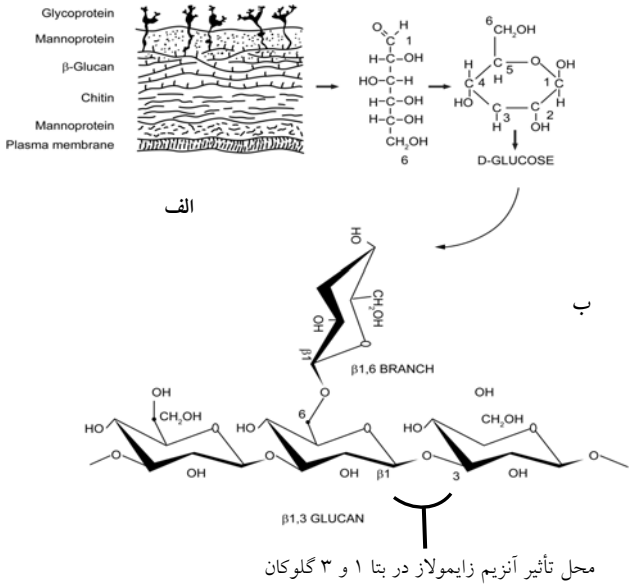
کلیدواژگان: استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان، اکسیداسیون دیواره کاندیدا آلبیکنس، خالص‌سازی آنزیمی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات:۸۹-۹۷

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

مقدمه

امروزه معرفی مکمل‌های غذایی و داروهای ایمن با آثار جانبی کم، بارقه امیدی برای اکثر بیماران صعب‌العلاج است و مصرف آن‌ها به عنوان مکمل و جایگزین مناسب نسبت به داروهای با آثار جانبی بالا کاربرد گسترده دارد [۱]. بتا ۱ و ۳ گلوکان [β(1,3)D-glucans] یکی از شاخص‌ترین این مکمل‌های غذایی است که از دیر باز شناخته شده و نقش درمان کنندگی دارد. کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) از جمله مخمرهای دارای اهمیت در پزشکی است که در دیواره خود حاوی انواع بتاگلوکان از جمله بتا ۱ و ۳ گلوکان، بتا ۱ و ٦ گلوکان و بتا ۱ و ٤ گلوکان است. نظر به این‌که از بین انواع بتا گلوکان، بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها به دلیل فرم ساختاری و وجود پیوندهای بتا ۱ و ۳ گلیکوزیدی، فعال‌تر است، از اهمیت ویژه‌ای در درمان برخوردار است. تقریباً ۳۰ درصد وزن مخمر کاندیدا آلبیکنس به دیواره آن اختصاص دارد که از این مقدار، ۸۰–۹۰ درصد مربوط به دو پلی‌ساکارید مانان (Mannan) و بتا گلوکان است (شکل ۱ الف). بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها پلی‌مرهای خطی D–گلوکزی است که ٤٠ تا ٦٠ درصد دیواره کاندیداآلبیکنس را تشکیل می‌دهد و اغلب زمانی به بیشترین میزان خود می‌رسد که مخمر، لوله زایا (Germ Tub) تولید نماید که در این وضعیت، میزان بتا ۱ و ۳ گلوکان معادل ٦٧ درصد کل دیواره می‌شود [۲].



شکل ۱ (الف) برش عرضی دیواره کاندیدا آلبیکنس، (ب) توالی‌های بتا ۱ و ۳ گلوکان و بتا ۱ و ٦ گلوکان [۲]

بتا گلوکان‌های دیواره به دلیل وجود بتا ۱ و ٦ گلوکان، در حلال‌های آب و قلیا نامحلول بوده و بسیار سخت استخراج می‌شود. بیشتر تحقیقاتی که تاکنون صورت گرفته روی انواع بتا گلوکان نامحلول نظیر زایموزان و زایموسل (Zymosan and Zymocel) بوده است که فعالیت‌های زیستی آن با فرم محلول بتا ۱ و ۳ گلوکان متفاوت است [۳].

بتا ۱ و ۳ گلوکان‌های محلول دارای خواص ایمنومدولاتوری (Immunomodulatory) و درمانی است [٤–۷]. همچنین فرم محلول در آب بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها زیست‌سازگارپذیر بوده و دارای خاصیت جذب مخاطی بالا است؛ بنابراین به عنوان مکمل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

غذایی در راستای اهداف درمانی بسیار مورد توجه است. معرفی روشی آسان برای تهیه بهینه فرم محلول در آب بتا ۱ و ۳ گلوکان از دیواره کاندیدا آلبیکنس، هدف مطالعه حاضر است.

مواد و روش‌ها

کشت گونه قارچی

در تحقیق حاضر سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC-10231) موجود در بانک سلول‌های قارچی گروه قارچ‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس برای استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان به کار برده شد. کاندیدا آلبیکنس (ATCC-10231) روی محیط کشت سابرودکستروز براث (Sabouraud Dextrose Broth) به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس مخمرهای کاندیدا آلبیکنس توسط سانتریفوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه از محیط کشت جدا شده و به منظور کشت انبوه به محیط کشت مخمر- پپتون- دکستروز مایع با ترکیب ۲ درصد گلوکز، ۲ درصد پپتون (Peptone) و ۱ درصد عصاره مخمر انتقال داده شدند. مجدداً پس از گذشت ٤٨ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مخمرهای کاندیدا آلبیکنس به میزان زیاد تولید شدند و پس از خارج نمودن آن‌ها از محیط کشت، سه مرتبه توسط سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند.

به منظور تولید لوله زایا از محیط کشت مغذی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) حاوی اسیدهای آمینه از جمله گلوتامین، گروهی از ویتامین‌ها و گلوکز استفاده شد و در شرایط استریل در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد و pH= ۷ به مدت ۵ ساعت قرار گرفت. لازم به ذکر است میزان گلوکز محیط ۳۰ درصد تنظیم شد. به این ترتیب حدود ۹۰ درصد از مخمرها تبدیل به فرم لوله زایا شدند. پس از استخراج مخمرهای حاوی لوله زایا از محیط کشت و شستشو با آب مقطر، در خلأ خشک شدند.

استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان

به منظور حذف لیپیدهای دیواره، پودر حاصل با مخلوطی به نسبت مساوی از اتانل و استن تیمار شد و سپس اکسید کننده‌هایی نظیر سدیم پراکسید ۰/۱ مولار و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد روی استیرر (Stirrer) با دور ۱۵۰ قرار داده شد. سوپ رویی با استفاده از کیسه دیالیز کات‌آف (Cut off) ۱۲ کیلودالتون به مدت ٢٤ ساعت تغلیظ شد. به این ترتیب قسمت عمده مانان‌ها که در قسمت بیرونی دیواره قرار دارد و بخشی از گلوکان‌ها که اغلب بتا ۱ و ٦ گلوکان هست از دیواره خارج شدند. ذرات باقیمانده حاصل با دی متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) مجاور و پس از گذشت ۲۰ دقیقه قرار گرفتن در حمام سونیک، گلوکان‌ها که بخش اعظم آن را بتا ۱ و ۳ گلوکان تشکیل می‌دهد، وارد فاز DMSO شدند. در مرحله بعد سوپ رویی در خلأ خشک شد و با اثر دادن آنزیم زایمولاز (Zymolyase) (۲۰۰۰ واحد بین‌المللی آنزیم) تهیه شده از شرکت Sigma Alderich (آلمان) که حاوی دو آنزیم اصلی بتا ۱ و ۳ گلوکان لامیناریتاهیدرولاز (beta 1 3 glucan laminaripentaohydrolase) و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز (beta 1 3 glucanase) است، به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه، بتا ۱ و ۳ گلوکان استخراج شد. نظر به این‌که آنزیم زایمولاز، حاوی مقادیری آمیلاز (Amylase)، زایلاناز (Xylanase) و فسفاتاز (Phosphatase) است، پروتئین‌های متصل به اسکلت گلوکانی نیز تجزیه و جدا شد و به این ترتیب محصول نهایی بتا ۱ و ۳ گلوکان به دست آمد [۸، ۹].

آزمون کالوز

کالوز (Callose) در حقیقت نام دیگر بتا ۱ و ۳ گلوکان است. این آزمون برای تأیید درستی وصول عصاره بتا ۱ و ۳ گلوکان انجام شد. برای انجام آزمون، ۱۰ میلی‌گرم از عصاره به دست آمده را با ۱۰۰۰ ماکرولیتر اتانل مخلوط و سپس از مخلوط حاصل، ٦۰۰ ماکرولیتر برداشته به ٦۰۰ ماکرولیتر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

پروکسید سدیم ۱ نرمال افزوده، در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه یکنواخت شد. سپس ماده همگن حاصل در دور g ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و به ٤۰۰ ماکرولیتر از محلول رویی، ۸۰۰ ماکرولیتر آنیلین بلو (Aniline Blue) ۰/۰۵ درصد و ٤۰۰ ماکرولیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال و ۲ میلی‌لیتر بافر ۱ مولار گلایسین/ هیدروکسید سدیم با pH=۹ اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. موارد فوق عیناً روی بتا ۱ و ۳ گلوکان استاندارد (کردلان: Curdlan) انجام گرفت [۱۰]. جذب لوله‌ها در دستگاه اسپکتروفلورومتر (Shimadzu RF-5000) با شدت تحریک (Excitation) ۳۹۳ نانومتر و میزان نشر (Emission) ٤۸٤ نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل ^{1}H –NMR

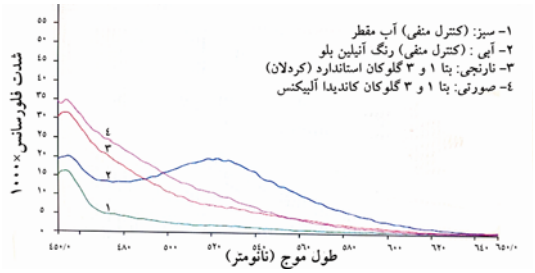
محصول به دست آمده در آب دوتره (Deuterium oxide) (دوتریم اکساید) حل شده و طیف شیمیایی ^{1}H –NMR (^{1}H Nuclear Magnetic Resonance) آن توسط دستگاه BRUKER 500 UltraShield موجود در دانشکده داروسازی دانشگاه تهران به دست آمد و با الگوی ^{1}H –NMR فرم استاندارد (کردلان) مقایسه شد [۸].

نتایج

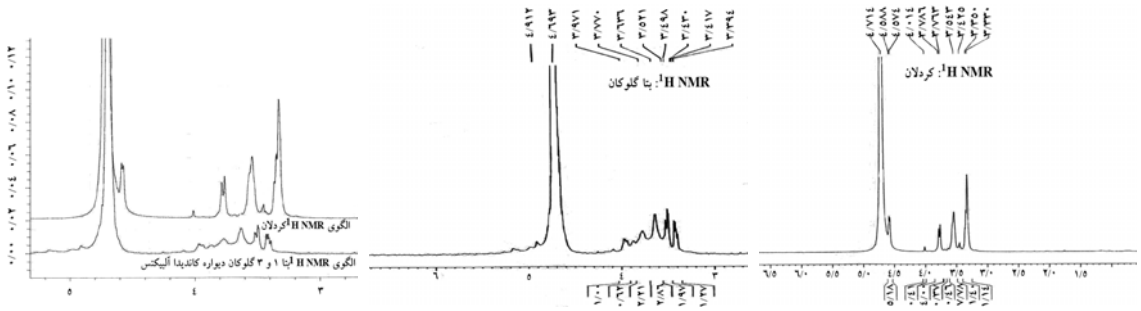
به دنبال کشت انبوه کاندیدا آلبیکنس در محیط YPD (Yeast Pepton Dextrose Agar) و متعاقب آن روی محیط DMEM، ۹۰ درصد مخمرهای کاندیدا آلبیکنس تبدیل به لوله زایا به طول تقریبی ۱۰ برابر طول مخمر شدند که مجموعاً وزن خشک آن ۲ گرم محاسبه شد.

پس از استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان از دیواره فرم لوله زایای کاندیدا آلبیکنس، نتایج نشان داد که میزان بتا ۱ و ۳ گلوکان به دست آمده، ۱۹۰ میلی‌گرم از ۱ گرم وزن خشک کاندیدا آلبیکنس حاوی لوله زایا است که این میزان ٦۳ درصد وزن دیواره محاسبه شد.

به منظور تأیید بتا ۱ و ۳ گلوکان استخراج شده، آزمون کالوز انجام شد. نمودار به دست آمده شدت فلورسانس عصاره بتا ۱ و ۳ گلوکان حاصل را توسط دستگاه اسپکتروفلورومتر، ۳۱ و برای کردلان (بتا ۱ و ۳ گلوکان استاندارد)، ۳٤ نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲ الگوی جذب به‌دست آمده از بتا ۱ و ۳ گلوکان حاصل از دیواره کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با کنترل منفی و کردلان در دستگاه اسپکتروفلورومتر (Shimadzu RF-5000)



شکل ۳ طیف حاصل از ^{1}H-NMR (۵۰۰ مگاهرتز) بتا ۱ و ۳ گلوکان استخراج شده از دیواره کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با طیف حاصل از کردلان (بتا ۱ و ۳ گلوکان استاندارد)؛ شیفت شیمیایی بتا ۱ و ۳ گلوکان در چند نقطه مشخص، معادل کردلان می‌باشد. مقادیر براساس ppm می‌باشد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

همچنین به منظور بررسی مشخصات ساختار شیمیایی بتا ۱ و ۳ گلوکان، طیف حاصل از حل نمودن آن در آب دوتره، توسط دستگاه شناسایی ساختمان هیدروژن (BRUKER 500 UltraShield) در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. با توجه به اطلاعات به دست آمده و مقایسه آن‌ها با اطلاعات طیفی کردلان و الگوی ^1H –NMR، ساختار بتا ۱ و ۳ گلوکان در عصاره حاصل تأیید شد (شکل ۳).

بحث

امروزه نظر به اهمیت داروهای ایمنومدولاتوری در درمان‌های تکمیلی انواع بیماری‌ها از جمله سرطان و با توجه به خواص درمانی بتا ۱ و ۳ گلوکان، این پلی‌ساکاریدها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده‌اند. انواع مختلف بتا ۱ و ۳ گلوکان در دو فرم محلول و نامحلول در آب از منابع طبیعی متعددی که اغلب قارچ‌ها هستند تهیه می‌شود. بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها به عنوان ایمنومدولاتورهای قوی با تأثیر بر گیرنده دکتین-یک (Dectin-1) موجود بر سطح اکثر سلول‌های ایمنی به ویژه ماکروفاژها، از طریق افزایش تعداد سلول‌ها و تولید میانجی‌های شیمیایی ایمنی (Cytokines) باعث تقویت سیستم ایمنی می‌شود و به لحاظ خاصیت ایمنی‌درمانی قوی، تحت عنوان مکمل‌های دارویی به ویژه درمانگر انواع تومور کاربرد گسترده‌ای دارد [۱۱، ۱۲]. در حال حاضر نیز از انواع گلوکان از جمله لنتینان (Lentinan) و سونفیلان (Sonifilan) به منظور درمان سرطان در برخی کشورها مانند ژاپن استفاده می‌شود [۱۳]. همچنین بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها با کاهش التهاب در درمان بیماری‌های التهابی از جمله آرتریت روماتویید [١٤] و در ترمیم زخم از طریق کاهش التهابات پوستی و دفع سریع سلول‌های مرده، مؤثر بوده‌است [١٥]. مصرف بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها در مطالعات تجربی آثار پیشگیری کننده توموری دارد [١٦] و اخیراً نیز با تهیه مشتقاتی از بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها در ابعاد نانو، از آن‌ها به عنوان حامل دارورسانی برای انتقال داروهای ضد سرطان به محل تومور استفاده می‌شود [۱۷].

بنابراین با توجه به اهمیت فراوان بتا ۱ و ۳ گلوکان در سطوح مختلف درمان، تهیه بهینه آن همواره مد نظر بوده است.

در مطالعه حاضر، استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان از دیواره کاندیدا آلبیکنس در مقادیر فراوان با استفاده از روشی آسان حاصل شد. در مطالعات دیگر، از جمله روش‌های به کار گرفته شده برای به‌دست آوردن بتا ۱ و ۳ گلوکان، روش مورد استفاده توسط مورا (Miura) و همکاران در سال ۲۰۰۳ است که میزان بتا ۱ و ۳ گلوکان جدا شده از دیواره مخمر کاندیدا آلبیکنس، ۲۹/۵ درصد گزارش شده است [۱۸] که نسبت به میزان ٦٣ درصد بتا ۱ و ۳ گلوکان که در این مطالعه از فرم لوله زایا به دست آمد اختلاف قابل ملاحظه‌ای در مقادیر وجود دارد. در مطالعه گوپال (Gopal) و همکاران، بتا ۱ و ۳ گلوکان از دو فرم مخمری و لوله زایا به دست آمد که به ترتیب مقادیر ۳۸/۹ درصد و ٦٧ درصد گزارش شد [۱۹] که با میزان بتا ۱ و ۳ گلوکان استخراج شده از فرم لوله زایا که در تحقیق حاضر انجام شد مشابهت نزدیک دارد. تأمین غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلوکز به منظور تولید لوله زایا از فرم مخمری با نتایج مطالعات دیگر مطابقت دارد [۲۰]. همچنین از محیط کشت DMEM برای تولید لوله زایا استفاده شد که برای اولین بار در این مطالعه بررسی شد. در این محیط علاوه بر تأمین شرایطی از قبیل غلظت گلوکز، دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد و pH=۷، وجود ترکیباتی مانند انواع ویتامین و ترکیب بافری ویژه HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]، باعث تبدیل ۹۰ درصد مخمرها به فرم لوله زایا در مدت زمان ۳۵ دقیقه شد که در مقایسه با مطالعه دیگری که از سرم حیوانات استفاده شده بود و مدت زمان لازم برای تولید لوله زایا ٤٠ دقیقه بود [۲۱]، در مدت زمان کوتاه‌تری صورت گرفته است. روش استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان در مطالعه حاضر، روش اکسداتیو-آنزیماتیک (Oxidative Enzymatic) است که نسبت به مطالعات دیگر که از روش‌های دشوار نظیر مجاورسازی‌های مکرر مخمر با اسید و باز در دماهای بالا [۲۲] یا استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای به همراه ورتکس نمودن‌های

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

(Vortex) مکرر به منظور ایجاد صدمات مکانیکی برای شکستن دیواره کاندیدا آلبیکنس استفاده می‌شود [۲۳]، آسان‌تر است که همگی بر مزایای روش حاضر می‌افزاید. همچنین استفاده از اکسید کننده هیپوکلریت سدیم ۳ درصد موجب حلالیت ۹۹ درصد بتا ۱-۳ گلوکان حاصل در DMSO شد [۸] که استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان را به مراتب تسریع می‌نماید. با توجه به نتایج استفاده از آزمون کالوز که به منظور تأیید بتا ۱ و ۳ گلوکان انجام شد در این آزمون، شدت فلورسانس برای بتا ۱ و ۳ گلوکان و کردلان به ترتیب ۳۱ و ۳٤ (Fluorescence Intensity: FI) در طول موج ٤٥٥ نانومتر، نشانه تشابه ماهیت این دو ماده است. همچنین مقایسه طیف شیمیایی ^1H –NMR کردلان و بتا ۱ و ۳ گلوکان استخراج شده بیانگر حضور ساختار بتا ۱ و ۳ گلوکان در عصاره حاصل از دیواره کاندیدا آلبیکنس است.

درمطالعه‌ای موسوی و همکاران [۲٤] به منظور دسترسی به بتا ۱ و ۳ گلوکان، اقدام به جداسازی زایموزان (Zymosan) (ترکیبی از انواع بتا گلوکان و پروتئین‌های متصل به آن) دیواره کاندیدا آلبیکنس نمودند که در مقایسه، استخراج بتا ۱ و ۳ گلوکان در تحقیق حاضر با خلوص و میزان بیشتر از دیواره کاندیدا آلبیکنس انجام شد که از مزایای روش حاضر به شمار می‌رود. نظر به این‌که تاکنون تنها از فرم خوراکی نامحلول در آب بتا ۱ و ۳ گلوکان به منظور ایمنی‌درمانی بیماران مبتلا به کاهش سیستم ایمنی استفاده شده است [۲۵]، تهیه بتا ۱ و ۳ گلوکان محلول در آب به دلیل مصارف تزریقی در تسریع افزایش کارایی سیستم ایمنی و استفاده به عنوان حامل دارورسانی نیاز است. نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان با روش آسان و کاربردی حاضر به مقادیر بالای بتا ۱ و ۳ گلوکان کاندیدا آلبیکنس دسترسی یافت. پیشنهاد می‌شود از بتا ۱ و ۳ گلوکان‌های محلول در آب علاوه بر مصارف درمانی در شکل و فرم طبیعی آن، در ابعاد نانو به عنوان حامل دارو در پژوهش‌های نانو فناوری استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و آزمایشگاه سیستم‌های نوین دارورسانی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران انجام شد.

منابع

[1] Clarke JO, Mullin GE. A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation. Nutr Clin Pract 2008; 23(1): 49-62.

[2] Sullivan PA, Yin CY, Molloy C, Templeton MD, Shepherd MG. An analysis of the metabolism and cell wall composition of Candida albicans during germ-tube formation. Can J Microbiol 1983; 29(11): 1514-25.

[3] Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Tanaka S, Tamura H, Yadomae T. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1→3)-β-D-glucan, CSBG from *Candida* spp. Int J Immunopharmacol 2000; 22(1): 383-94.

[4] Vetvicka V, Vashishta A, Saraswat-Ohri S, Vetvickova J. Immunological effects of yeast- and mushroom-derived beta-glucans. J Med Food 2008; 11(4): 615-22.

[5] 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.

[6] Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. Medicina (Kaunas) 2007;

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

43(8): 597-606.

[7] Harada T, Ohno N. Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of beta-glucan. Int Immunopharmacol 2008; 8(4): 556-66.

[8] Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ogura N, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. Relationship between the physical properties of Candida albicans cell well beta-glucan and activation of leukocytes in vitro. Int Immunopharmacol 2002; 2(8): 1109-22.

[9] Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Tanaka S, Tamura H, Yadomae T. Immuno-pharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1-->3)-beta-D-glucan, CSBG from Candida spp. Int J Immunopharmacol 2000; 22(5): 383-94.

[10] Goldschmidt MC, Fung DY, Grant R, White J, Brown T. New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1991; 29(6): 1095-9.

[11] Vetvicka V, Vetvickova J. Combination of glucan, resveratrol and vitamin C demonstrates strong anti-tumor potential. Anticancer Res 2012; 32(1): 81-7.

[12] Xiang D, Sharma VR, Freter CE, Yan J. Anti-tumor monoclonal antibodies in conjunction with β-glucans: a novel anti-cancer immunotherapy. Curr Med Chem 2012; 19(25): 4298-305.

[13] Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. Biol Pharm Bull 2001; 24(7): 820-8.

[14] Bauerová K, Paulovicová E, Mihalová D, Svík K, Ponist S. Study of new ways of supplementary and combinatory therapy of rheumatoid arthritis with immunomodulators. Glucomannan and Imunoglukán in adjuvant arthritis. Toxicol Ind Health 2009; 25(4-5): 329-35.

[15] Vetvicka V, Vetvickova J. β (1-3)-D-glucan affects adipogenesis, wound healing and inflammation. Orient Pharm Exp Med 2011; 11(3): 169-75.

[16] Novak M, Vetvicka V. Glucans as biological response modifiers. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2009; 9(1): 67-75.

[17] Soto ER, Caras AC, Kut LC, Castle MK, Ostroff GR. Glucan particles for macrophage targeted delivery of nanoparticles. J of Drug Deliv 2011; 2012: 1-13.

[18] Miura NN, Adachi Y, Yadomae T, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. Structure and biological activities of beta-glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. Microbiol Immunol 2003; 47(3): 173-82.

[19] Gopal PK, Shepherd MG, Sullivan PA. Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1984; 130(12): 3295-301.

[20] Jafari nodoushan AA. The Effect of Temperature, pH and the Glucose Concentration on Germ Tube Formation of *Candida Albicans*. Med Lab J 2008; 2(1): 66.

[21] Isibor JO, Eghubare AE, Omoregie R. Germ Tube Formation in *Candida Albicans*: Evaluation of Human and Animal Sera and Incubation Atmosphere. SEMJ 2005; 6(1-2).

[22] Huang GL. Extraction of two active polysaccharides from the yeast cell wall. Z

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]

Naturforsch C 2008; 63(11-12): 919-21.

[23] Cabib E, Blanco N, Arroyo J. Presence of a large β(1-3)glucan linked to chitin at the Saccharomyces cerevisiae mother-bud neck suggests involvement in localized growth control. Eukaryot Cell 2012; 11(4): 388-400.

[24] Moosavi SM, Roodbar Mohammadi Sh, Saraf. ZH, Yadegari MH, Khosravi AR. Preparation of Zymosan from *Candida Albicans* Cell Wall. J Rafsanjan Univ Med Scie 2012; 11(5): 481-8. (Persian)

[25] Lehne G, Haneberg B, Gaustad P, Johansen PW, Preus H, Abrahamsen TG. Oral administration of a new soluble branched beta-1,3-D-glucan is well tolerated and can lead to increased salivary concentrations of immunoglobulin A in healthy volunteers. Clin Exp Immunol 2006; 143(1): 65-9.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07]