اثر عصاره سوماتیک و فیلتره کشت فوزاریوم سولانی بر روی لکوسیت های خون محیطی موش

دکتر محمد رضا آقا میریان* دکتر فریده زینی** دکتر حسن جهانی هاشمی*

Effects of somatic extract and culture filtrate of fusarium solani on peripheral blood leukocytes of mouse

M. Aghamirian F. Zaini H. Jahani Hashemi

✸Abstract

Background: The effect of somatic extract and culture filtrate of fusarium solani on peripheral blood leukocyte could be used in pharmacological studies.

Objective: The aim of this study was to determine the effect of somatic and culture filtrate of fusarium solani on peripheral blood leukocytes counts in mouse.

Methods: Fusarium solani strains $UAMH_{7419}$ and $UAMH_{3317}$ were used to prepare the somatic extract and culture filtrate. These substances with or without adjuvant, were injected intraperitoneally. Peripheral blood leukocytes count was then carried out and data were analyzed using non-parametric Mann-Whitney test.

Findings: The somatic extract and filtrate culture of F. solani strains $UAMH_{3317}$ and $UAMH_{7419}$ induced leukocytosis and lymphocytosis in mouse.

Conclusion: Leukocytosis producing effect of fusarium solani strains $UAMH_{7419}$ and $UAMH_{3317}$ could be used for therapeutic purposes especially in those with leukopenia although more studies are needed.

Keywords: Somatic Extract, Fusarium Solani,Leukocytes, Pharmacology, Blood

✸چکیده

زمینـه : اثـر عـصاره سـوماتیک و فیلتـره کـشت فوزاریـوم بـر لکوسـیت مـی توانـد در مطالعـه هـای داروشناسـی اسـتفاده شود.

هـدف : مطالعـه بـه منظـور تعیـین اثـر عـصاره سـوماتیک و فیلتـره کـشت فوزاریـوم سـولانی برشـمارش لکوسـیت هـای خون محیطی موش کوچک آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها : این مطالعـه تجربـی در سـال ۱۳۸۰ در دانـشکده بهداشـت دانـشگاه علـوم پزشـکی تهـران انجـام شـد. از سـویه هـای $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ فوزاریـوم سـولانی جهـت تهیـه عـصاره سـوماتیک و فیلتـره کـشت استفاده شد. مواد مزبـور بـا یـا بـدون ادجوانـت بـه طریـق داخـل صـفاقی بـه مـوش هـای کوچـک آزمایـشگاهی تزریـق و شمارش گلبول های سفید خون انجام شد. داده ها با آزمون غیر پارامتری من ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

یافتـه هـا : عـصاره سـوماتیک و فیلتـره کـشت فوزاریـوم سـولانی سـویه $UAMH_{7419}$ و سـویه $UAMH_{3317}$ موجـب لکوسیتوز و لنفوسیتوز می شود.

نتیجه گیری : از خاصیت لکوسیتوز ایجاد شـده توسـط هـر دو سـویه مزبـور مـی تـوان در مطالعـه هـای تکمیلـی بیمـاران با کمبود لکوسیت استفاده کرد.

کلید واژه ها : عصاره سوماتیک، فوزاریوم سولانی، گلبول های سفید، داروشناسی، خون

* استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

آدرس مکاتبه : دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، بخش قارچ شناسی، Email: Aghamirian2001@yahoo.com

*** مقدمه :**

امروزه جدا سازی آنتی ژن های قارچی متداول شده است و بسیاری از آنتی ژن های جدا شده در صنعت و پزشکی مصرف می شوند.مواد مفیدی مانند پنی سیلین و گریزئوفولوین یا اسید جبیرلیک که هورمون رشد گیاه است و آلکالوئیدهای ارگوت و موسکارین‌که مصرف دارویی دارند از قارچ ها به دست می آیند.

فوزاریوم سولانی یک قارچ رشته ای ساپروفیت واجد دیواره عرضی (septate) و با رشته شفاف (hyaline) است.[۱] آنتی ژن های متعددی از فوزاریوم سولانی به دست آمده است که بعضی از آنها بر سیستم ایمنی اثر دارند، برای مثال ورتمنین که متابولیتFusariumoxysporum است، پاسخ ایمنی همورال را کاهش می دهد و توکسین T_2 ناشی از فوزاریوم سبب تغییر عملکرد سلول های T-suppressor و کاهش عملکرد فاگوسیتوز ماکروفاژها می شود و همچنین کاهش گلبولین α_1 و β_1 و β_2 از دیگر اثرات آن هستند.[۲و۳] بنابراین می توان تصورکرد که احتمالا" فوزاریوم سولانی موادی دارد که بر سیستم ایمنی مؤثر است و عملکرد آن را تحت تأثیر قرار می دهد. ویسکوا اثرFusariumsambucinum را بر لکوسیت های موش کوچک آزمایشگاهی بررسی نمود که تعداد لنفوسیت CD^+_4 موش ازدیاد یافته بود.[۴] مطالعه حاضر برای تعیین اثر عصاره سوماتیک و فیلتره کشت دو سویه $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ فوزاریوم سولانی بر روی گلبول های سفید خون محیطی موش کوچک آزمایشگاهی انجام شد.

*** مواد و روش ها :**

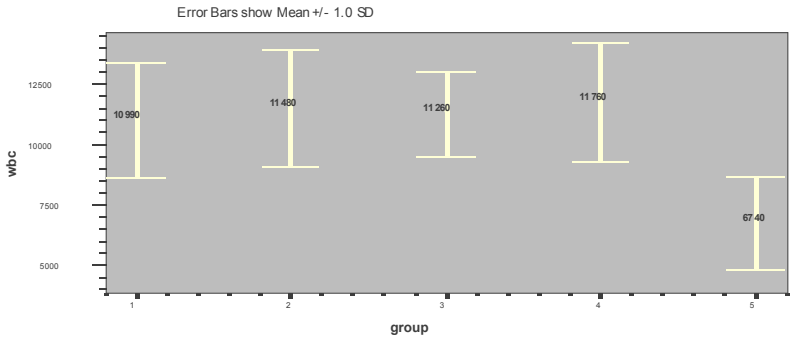
این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۰ در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. دو سویه $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ فوزاریوم سولانی از کانادا تهیه شد که سویه $UAMH_{7419}$ از بیمار و $UAMH_{3317}$ از هوا جدا شده بود. این دو سویه بر روی محیط جامد سابورودکستروزآگار محتوی کلرامفنیکل تجدید کشت و سپس از این محیط به محیط سابوروی مایع منتقل شدند. ارلن مایرهای محتوی کشت مایع به مدت ۱۴ روز در حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد نگه داری و هر روز چند بار تکان داده شدند تا از رشد ارگانیسم به صورت ورقه میسلیال (sheet) در سطح محیط مایع جلوگیری شود. بعد از گذشت ۱۴ روز و حصول اطمینان از خالص بودن نمونه ها به روش میکروسکپی، میسلیوم های قارچی به روش فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرون از مایع جدا شدند. توده های میسلیومی دوبار با آب مقطر شستشو و سپس در ظرفی استریل جمع آوری شدند و پس از توزین در دمای ۴۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. ۴ گرم از توده میسلیومی در ۱۰ میلی لیتر از فسفات با فر نمکی با pH = ۷/۴ مخلوط شده و در دستگاه هموژنیزور (EdmundBuhler) با rpm ۲۰۰۰ برای۱۰ بار و هر بار برای۳۰ ثانیه خرد شدند.[۳] میسلیوم های خرد شده در هموژنیزور نوبت اول ، با هموژنیزور(B.Broun) به کمک گلوله های شیشه ای با rpm ۴۰۰۰ برای ۱۴ بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه خرد شدند.[۵] محلول شیری به دست آمده طی دو مرحله در g × ۲۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در g×۲۵۰۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه در۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد،(BeckanAvantiJ-25) و مایع رویی از رسوب جدا گردید.[۶] آنگاه مایع حاصل (عصاره سوماتیک) به مدت۲۴ ساعت در برابر آب مقطر در ۴ درجه سانتی گراد دیالیز و لیوفیلیزه گردید (Freeze-DryerFD-1EYELA) و در ۴۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد.[۵] عمل سنجش پروتئین در محلول حاوی یک میلی گرم پودر عصاره

سوماتیک در یک میلی لیتر آب مقطر به روش برادفورد انجام گرفت.[۸] عمل سنجش پروتئین بر روی فیلتره کشت نیز انجام شد. گروه های ۱۰ تایی موش کوچک آزمایشگاهی انتخاب شدند. همچنین از ۱۰ موش قبل از تزریق نمونه، آزمایش تفکیک شمارش گلبول سفید (Differential white cell count) و شمارش تام گلبول های سفید انجام شد. سپس یک میلی لیتر عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه $UAMH_{7419}$ با غلظت ۱۴ میکروگرم پروتئین در میلی لیتر به صفاق موش ها تزریق شد و بعد از ۲۴ ساعت برای این موش ها دوباره آزمایش تفکیک شمارش گلبول سفید انجام شد. همچنین سه تزریق از عصاره سوماتیک و فیلتره کشت سویه های فوزاریوم سولانی $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ همراه با ادجوانت در ۱۰ موش انجام شد. تزریق اول با ۱۴ میکروگرم پروتئین نمونه همراه با ادجوانت کامل eund'scomplete adjuvant (FCA)، تزریق دوم با ۱۴ میکروگرم پروتئین نمونه همراه با ادجوانت ناقص دو هفته بعد از تزریق اول و تزریق سوم مثل تزریق دوم بعد از دو هفته به طور داخل صفاقی انجام شد. بعد از ۱۰ روز، خون‌گیری از موش ها انجام و آزمایش شمارش گلبول های سفید خون انجام شد.[۷] در مرحله بعد عصاره سوماتیک هر دو سویه فوزاریوم از سفادکس G-۱۰۰ و ستون ۴۰×۱سانتی متر (pharmacia) با بافر MPBS ۰/۱۵ و pH : ۷/۲ عبور داده شد و $Peak_1$ و $Peak_2$ (فراکشن های ۱۲ و ۲۸) به دست آمد که وزن ملکولی هر دو فراکشن با روش الکتروفورزژل پلی اکریل آمید در حضور(SDS-PAGE) تعیین شد. ۱۴ میکروگرم پروتئین از فراکشن ها به صفاق موش تزریق شد. ستون کروماتوگرافی قبل از تزریق کالیبره شد و همچنین BUN ، کراتینین، SGPT و SGOT سرم خون موش های کوچک آزمایشگاهی تزریق شده با فیلتره کشت و عصاره سوماتیک سویه های فوزاریوم سولانی همراه با ادجوانت در موش های کنترل به کمک کیت های پارس آزمون و اتوآنالیز RA۱۰۰۰ اندازه گیری شد.[۸و۹] داده ها با آزمون آماری من ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

*** یافته ها :**

تزریق عصاره سوماتیک و فیلتره کشت هر دو سویه مزبور به صفاق موش کوچک آزمایشگاهی موجب ایجاد لکوسیتوز و لنفوسیتوزشد که آزمون های آنالیز واریانس و Dunnett اختلاف آماری معنی داری بین گروه کنترل و گروه های دیگر نشان داد($p<۰/۰۰۵$). البته آنالیز تحقیقی اختلاف معنی‌داری بین چهارگروه آزمایش نشان نداد (نمودارشماره۱).

نمودار ۱- میانگین تعداد گلبول های سفید خون در گروه های مورد مطالعه ۲٤ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی ۱ میلی لیتر از عصاره سوماتیک یا فیلتره کشت فوزاریوم سولانی سویه های UAMH7419 و UAMH3317



گروه ۱: فیلتره کشت ۳۳۱۷ ۲: عصاره سماتیک ۳۳۱۷ ۳: فیلتره کشت ۷۴۱۹ ۴: عصاره سماتیک ۷۴۱۹ ۵: کنترل

همچنین مشخص شد که عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه $UAMH_{7419}$ در موش کوچک آزمایشگاهی باعث لنفوسیتوز می شود (جدول شماره ۱).

جدول ۱- مقایسه تعداد لنفوسیت خون محیطی (در میلی مترمکعب) در صد عدد گلبول سفید قبل و بعد از تزریق عصاره سوماتیک

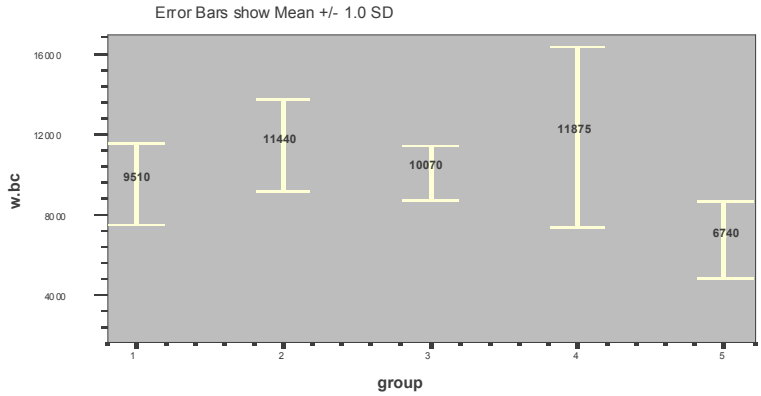
زمان شمارش / شماره موش	قبل از تزریق	بعد از تزریق
۱	۳۲	۴۴
۲	۳۰	۴۵
۳	۳۳	۴۸
۴	۳۹	۴۸
۵	۳۸	۵۵
۶	۴۰	۵۱
۷	۴۱	۵۰
۸	۳۰	۴۹
۹	۳۲	۵۳
۱۰	۳۳	۵۴
میانگین	۳۴/۸±۴/۲۴	۴۹/۷±۳/۶۵

با آزمون ویل کاکسون اختلاف تعداد لنفوسیت ها قبل و بعد از تزریق معنی دار است ($p<۰/۰۰۵$)

تزریق عصاره سوماتیک و فیلتره کشت هر دو سویه مزبور با ادجوانت به صفاق موش کوچک آزمایشگاهی نیز با لکوسیتوز همراه بود. آزمون های کروسکال والیس و من ویتنی اختلاف آماری معنی داری بین گروه کنترل و سایر گروه ها نشان داد ($p<۰/۰۰۵$). ولی آزمون کروسکال والیس اختلاف معنی داری بین چهار گروه آزمایشی نشان نداد(نمودار شماره ۲).

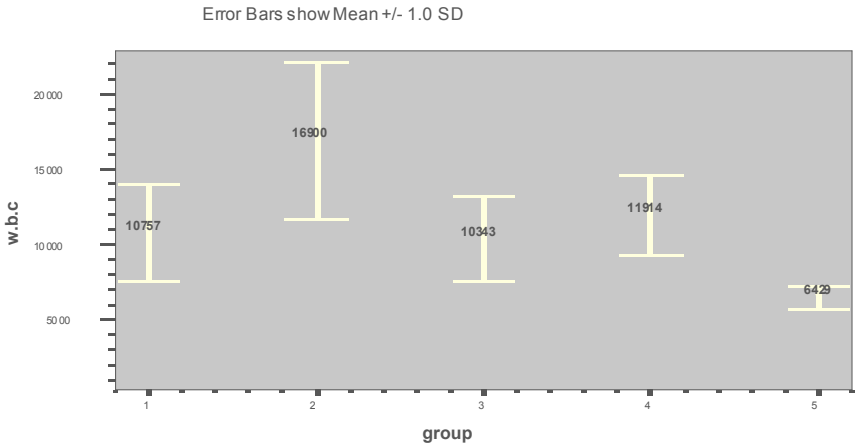
تزریق پروتئین های فراکشن ۱۲(P_1) و ۲۸ (P_2) حاصل از ستون ژل فیلتراسیون عصاره سوماتیک به صفاق موش کوچک آزمایشگاهی نیز سبب القاء لکوسیتوز شد. آزمون کروسکال والیس اختلاف معنی داری بین گروه ها ($p<۰/۰۰۱$) و همچنین بین چهار گروه آزمایشی نشان داد ($p<۰/۰۱$). با انجام آزمون من ویتنی، اختلاف بین گروه کنترل و گروه های دیگر ($p<۰/۰۰۵$) و همچنین بین گروه ۱ و ۲ معنی دار بود ($p<۰/۰۵$)(نمودار شماره ۳).

نمودار ۲- میانگین تعداد گلبول های سفید خون در گروه های مورد مطالعه ۱/۵ ماه پس از شروع تزریق ۱۴ میکروگرم پروتئین از فیلتره کشت یا عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه های UAMH7419 و UAMH3317



گروه ۱: فیلتره کشت ۳۳۱۷ ۲: عصاره سماتیک ۳۳۱۷ ۳: فیلتره کشت ۷۴۱۹ ۴: عصاره سماتیک ۷۴۱۹ ۵: کنترل

نمودار ۳- میانگین تعداد گلبول های سفید خون در گروه های مورد مطالعه ۲٤ساعت پس از شروع تزریق یک میلی لیتر از فراکشن $(P_1)_{۱۲}$ و فراکشن $(P_2)_{۲۸}$ عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه $UAMH_{7419}$ و سویه $UAMH_{3317}$



گروه ۱: P2/7419 ۲: P1/7419 ۳: P2/3317 ۴: P1/3317 ۵: کنترل

با روش SDS-PAGE مشخص شد که فراکشن ۱۲ (شامل P_1/7419 و P_1/3317) دارای وزن مولکولی ۸۶ و ۹۵ و فراکشن ۲۸ (شامل P_2/7419 و P_2/3319) دارای وزن مولکولی ۳۶ و ۴۳ کیلودالتون است. از مقایسه BUN و کراتینین و SGPT و SGOT سرم موش های کنترل و موش های تزریق شده با فیلتره کشت با عصاره سوماتیک فوزاریم سولانی سویه های $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ همراه با ادجوانت مشخص شد که نتایج این آزمون ها برای موش های تزریق شده و شاهد اختلاف معنی دار نداشت (جدول شماره ۲).

جدول ۲- میانگین BUN ، کراتینین، SGPT وSGOT سرم موش های شاهد و موش های تزریق شده با فیلتره کشت یا عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه های $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ همراه با ادجوانت*

گروه ها	BUN (میلی گرم بر دسی لیتر)	کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر)	SGPT (U/L)	SGOT (U/L)
فیلتره کشت $UAMH_{7419}$	۲۰ ± ۵	۰/۷ ± ۰/۱۸	۱۸۶ ±۱۲/۸	۱۹۳ ±۱۷/۴
عصاره سوماتیک $UAMH_{7419}$	۱۶ ±۲/۶	۰/۸ ±۰/۱۸	۱۷۹ ±۱۵/۸	۲۰۴ ±۱۶/۹
فیلتره کشت $UAMH_{3317}$	۲۰ ±۴/۱	۰/۷ ±۰/۱۵	۱۶۵ ±۱۴/۷	۱۸۷ ±۱۸/۷
عصاره سوماتیک $UAMH_{3317}$	۱۹ ±۳/۳	۰/۷ ±۰/۲۷	۱۷۵ ±۱۵/۷	۲۰۹ ±۱۹/۹
کنترل	۲۱ ±۴/۶	۰/۷±۰/۲۶	۱۷۹ ±۲۰/۶	۱۹۹ ±۱۷/۲

* تزریق یک نوبت ادجوانت کامل و دو نوبت ادجوانت ناقص

*** بحث و نتیجه گیری :**

عصاره سوماتیک و فیلتره کشت سویه های فوزاریوم سولانی $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ بر شمارش لکوسیت های خون محیطی موش اثر لکوسیتوز و لنفوسیتوز دارد.

گونه فوزاریوم سولانی به کلاس دوتروماست متعلق است که فیلتره کشت و عصاره سوماتیک سویه $UAMH_{7419}$ و $UAMH_{3317}$ با میزان ۱۴ میکروگرم پروتئین با یا بدون ادجوانت در موش کوچک آزمایشگاهی اثر معنی دار لکوسیتوز و لنفوسیتوز دارد. ادجوانت باعث بقای بیش تر مواد تزریق شده در بدن موش می شود و به کمک آن می توان اثر مواد تزریق شده را در دراز مدت مطالعه نمود.[۱و۷] ویسکوا هم از اثر Fusarium sumbucinum در ایجاد لکوسیتوز و لنفوسیتوز در موش کوچک آزمایشگاهی گزارش داده است.[۴] با به کارگیری روش ژل فیلتراسیون می توان از مجموعه ای از آنتی ژن ها فراکشن به دست آورد. ملوی با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی و ژل فیلتراسیون آنزیم آن استیل گلوکز آمینیداز را از کاندیدا آلبیکنس جدا نمود.[۹] سفادکس ۱۰۰- G منطقه مؤثر دالتونی ۴۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰ دارد و چون عصاره سوماتیک سویه ها از ۱۴ تا ۱۰۰ کیلو دالتون وزن داشتند از سفادکس ۱۰۰- G استفاده شد. همچنین از تزریق فراکشن های ۱۲ و ۲۸ به دست آمده از ژل فیلتراسیون به صفاق موش کوچک آزمایشگاهی مشخص شد که فراکشن ۱۲ که حاوی پروتئین های با وزن مولکولی ۸۶ و ۹۵ کیلو دالتون است، در مقایسه با فراکشن ۲۸ که حاوی پروتئین های با وزن مولکولی ۳۶ و ۴۳ کیلو دالتون است لکوسیتوز بیش تری ایجاد می کند که شاید به دلیل بیش تر بودن وزن مولکولی پروتئین های موجود در فراکشن ۱۲ باشد، زیرا $P_1/7419$ تهیه شده از سویه بالینی فوزاریوم سولانی ($P_1/3317$) که از سویه بالینی تهیه نشده بود در ایجاد لکوسیتوز عمل کرد. ایجاد لکوسیتوز پدیده مهمی است که بالقوه می تواند جهت مطالعه های داروسازی با اهداف درمانی به کار رود و با مطالعه بیش تر و پی بردن به عوارض جانبی این فراکشن ها مشخص خواهد شد که آیا باید فراکشن های دارای وزن مولکولی بیش تر برای ایجاد لکوسیتوز انتخاب شوند یا فراکشن هایی که وزن مولکولی کمتر و تأثیر کمتری در لکوسیتوز دارند ولی از نظر عوارض جانبی در وضعیت بهتری هستند. برای درک عوارض جانبی عصاره سوماتیک و فیلتره کشت هر دو سویه مزبور، BUN، کراتینین، SGPT و SGOT سرم خون موش های تحت تزریق فیلتره کشت و عصاره سوماتیک همراه با ادجوانت و موش های شاهد با هم مقایسه شدند که نتایج تقریباً یکسان و بدون تغییری بین موش های شاهد و تحت تزریق به دست آمد و این آزمایش ها عوارضی را در اثر این تزریق ثابت نکرد. اگرچه قضاوت صحیح در مورد عوارض جانبی این تزریق ها به تحقیقات بیش تر و آزمایش‌های گسترده تری احتیاج دارد. شاید با آزمایش های تکمیلی بتوان از این اثر لکوسیتوز و لنفوسیتوز عصاره سوماتیک و فیلتره کشت دو سویه فوزاریوم به نفع بیماران دارای نقص ایمنی یا در مبتلایان به ایدز به عنوان یک افزایش دهنده لنفوسیت T استفاده نمود.

*** مراجع :**

1. Rippon JW. Medical mycology, the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycets. Philadelphia, W B Saunders, 1988, 732-5

2.W U W. Decreased immunological responses by wortmannin containing rice

culture of Fusarium oxysporum and by purified wortmannin in avion species Immunologicoal Immunotoxical 1992; 14: 913-23

3. Vidal D. Invitro and invivotoxicity of T-2 toxin a fusarium mycotoxin to mouse peritoneal macrophages. Immun Infect 1989; 57: 2260-4

4. Viskova N Y, Svirshchevskaya E V, Sapoznikov A M, Moiaeeva E V. Immunostimulatory activity of Milife, a novel immunomodular of fungus origin. Immunopharmacol Immunotoxicol 1998; 20: 119-33

5. Longbottom J L, Austwick P K C. Handbook of experimental immunology. London, Weir D M, 1992, 121-33

6. Kibbler Gc, Mackenzie D W R, Odds FC. Principles and practice of clinical mycology. NewYork, John Wiley and Sons, 1996, 98-9

7. Dresser W D. Immunization of experimental animals, Handbook of experimental Immunology. London, Weir D M, 1992, chapter 41

8. Bollag D M, Edelstein S J. Protein methods. 3rd ed, NewYork, Wily liss, 1992, 45-61

9.Molloy C. Purification and characterization of two forms of Nacetylglucosaminidase from candida albicans showing widely different chain glycosylation. Microbiology 1994; 140: 1543-53