

تهیه زایموزان از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس

سیدمهدی موسوی^۱، شهلا رودبارمحمدی^۲، زهیر حسن صراف^۳، محمدحسین یادگاری^۴، علیرضا خسروی^۵

دریافت مقاله: ۹۰/۱/۲۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۰/۳/۳۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۰/۱۰/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۱/۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: زایموزان به بخشی از دیواره سلولی مخمر اطلاق می‌شود که واجد برخی ویژگی‌های ایمونومدولاتوری مانند تحریک‌کنندگی فاگوسیتوزیس و سیستم رتیکوآندوتلیال است. اخیراً زایموزان موضوع بررسی‌های کلینیکی متنوعی بوده است. هدف از انجام این بررسی یافتن روشی سریع و جدید برای جداسازی زایموزان از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی ابتدا مخمر کاندیدا آلبیکنس پس از کشت، جمع‌آوری گردید. دیواره سلولی مخمر بعد از شکستن، سانتریفیوژ و شستشوی مکرر در Na_2PO_4 به صورت سوسپانسیون ۵٪ در آمد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳ ساعت در آب جوش قرار گرفت و با آب و الکل مطلق شسته شد. در انتها محصول به دست آمده به صورت پودر لیوفیلیزه درآمد. برای تأیید تخلیص از تست‌های توقف کمپلمان و SDS-PAGE LAL استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که فراکشن زایموزان حدوداً معادل ۱/۸٪ وزن خشک مخمر اولیه بود. این فراکشن توانایی توقف کمپلمان را داشت. نتایج تست L.A.L مؤید وجود بخش پلی‌ساکاریدی گلوکان بود. همچنین در الکتروفورز بانده زایموزان - پروتئین مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که روش به کار رفته روشی سریع و مفید برای دستیابی به زایموزان از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس است. با توجه به نتایج تست کمپلمان، زایموزان جدا شده ویژگی‌های بیولوژیک خود را حفظ کرده است.

واژه‌های کلیدی: زایموزان، کاندیدا آلبیکنس، دیواره سلولی مخمر

۱- (نویسنده مسئول) دانشجوی دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

۲- استادیار گروه آموزشی قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۲۶۸۹۸، دورنگار: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۵۵، پست الکترونیکی: smmosavi1078@yahoo.com

۳- استادیار گروه آموزشی ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

۴- دانشیار گروه آموزشی قارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

۵- استادیار گروه آموزشی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

مقدمه

امروزه استفاده از مواد و عناصر با منشأ طبیعی در درمان، پیش‌گیری و یا کند کردن سیر بیماری و بهبود و تقویت توان دفاعی میزبان از اهمیت بسزایی برخوردار است، در دهه‌های اخیر با توجه به تغییر شیوه زندگی انسان (مانند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف، بیماری‌ها و اختلالات نقص ایمنی مانند ایدز و بیماری‌های اتو ایمنی، دیابت کنترل نشده، استرس، استفاده از داروهای سیتو توکسیک، پرتودرمانی ...) ابتلا به عفونت‌ها افزایش یافته است [۱].

از طرفی، مقاومت عوامل بیماری‌زا، طولانی بودن دوره درمانی، هزینه سنگین برخی داروها و بروز عوارض جانبی و واکنش‌های ناخواسته آنها، محققین را ترغیب به مطالعه و یافتن داروها و یا عوامل مؤثر جایگزین به ویژه از گیاهان دارویی و یا عناصری با منشأ طبیعی کرده است. از آن جا که مواد طبیعی از عوارض جانبی کمتری برخوردارند و مقبولیت استفاده عمومی دارند [۲] نیاز روز افزون به یافتن، و استخراج و تخلیص مناسب آنها یک ضرورت تحقیقاتی است.

مخمر کاندیدا آلبیکنس با توجه به برخی اجزای دیواره سلولی‌اش می‌تواند یکی از میکروارگانیسم‌های مناسب جهت استخراج عوامل ایمنو مدولاتوری باشد. دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس مرز بین این قارچ و محیط اطراف بوده و دارای ساختاری است که بسیاری از اعمال بیولوژیک ضروری قارچ را انجام می‌دهد. همچنین منبع عمده آنتی‌ژن‌های کاندیدا می‌باشد، این آنتی‌ژن‌ها پروتئینی و یا گلیکو پروتئینی می‌باشند که برخی قادرند پاسخ ایمنی را تحریک نمایند [۳].

زایموزان یک ترکیب غیر محلول دیواره سلولی مخمر با ساختاری مرکب از گلوکان در اتصال به پروتئین است که اولین بار این نام به فراکشن مخمری (ساکاررومیسیس سرویسه) داده شد که واجد خواص ایمنولوژیک ویژه‌ای بود که می‌توانست کمپلمان را غیرفعال نماید [۴]. در اواخر دهه ۱۹۸۰ محققین دانشگاه هاروارد نحوه فعالیت بتا گلوکان (ماده مؤثر زایموزان) در تحریک سیستم ایمنی را توصیف کردند. گیرنده خاصی برای بتا گلوکان در سطح برخی از سلول‌ها نظیر ماکروفاژها وجود دارد که فعال شدن آن آبخاری از وقایع ایمنولوژیک را به دنبال دارد و به افزایش ایمنی می‌انجامد [۵]. با توجه به مطالعات ذکر شده و سایر بررسی‌ها گروه‌هایی وجود دارند که می‌توانند مزایای بیشتری از این فرآورده بیولوژیک دیواره سلولی مخمری ببرند. برای مثال افراد دارای نقص ایمنی، مبتلایان به عفونت‌های مکرر، مبتلایان به انواع تومورها، در موارد کاهش فعالیت سیستم ایمنی ناشی از افزایش سن، در بیماری‌های ژنتیکی و در سرکوب ایمنی. همچنین افرادی که در معرض رادیکال‌های آزاد بیشتر یا دوزهای پایین اشعه قرار می‌گیرند و کسانی که تولید رادیکال‌های آزاد در آنها بیشتر ناشی از ابتلاء به بیماری‌های مزمنی نظیر دیابت یا التهاب‌های مزمن است و کسانی که تحت تأثیر استرس قرار دارند نیز از گروه‌های پیشنهادی جهت دریافت این فراکشن هستند. در نهایت افراد در معرض آرترواسکلروزیس نیز با توجه به ویژگی‌های آنتی‌کلسترولی زایموزان می‌توانند از آن بهرمنند گردند [۶]. در مطالعه‌ای پیشنهاد شده است که می‌توان از زایموزان برای درمان دیابت استفاده کرد زیرا حتی تجویز دوز واحد آن در موش‌های مبتلا به دیابت، باعث سرکوب (با افزایش Foxp3⁺T-reg) چشم‌گیر بیماری شده بود [۷]. فعالیت

هر یک از ارلن‌ها اضافه گردید. سپس ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ در دقیقه منتقل و در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت نمونه با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و با استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار (۸۰۰ دور در دقیقه) سه مرتبه شسته و جمع‌آوری گردید.

جداسازی دیواره سلولی: به منظور جداسازی دیواره سلولی از روش Casavana استفاده شد. ابتدا زیر هود و تحت شرایط استریل، سلول‌های مخمیری شسته شده کاندیدا آلبیکنس درون لوله در پیچ‌دار استریل با حجم مشخصی از بافر لایزیس (حاوی: ۲/۳ گرم SDS-۵ میلی‌لیتر ۲، مرکاپتواتانول و ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS ۱۰ میلی‌مولار) مخلوط و به میزان نصف حجم بافر پرل شیشه‌ای استریل به آن افزوده شد. سپس آنتی‌پروتئاز Phenyl Methan Sulfonyl Fluoride (PMSF) (۰/۰۰۱) مولار) که درون اپندورف ۰/۵ با الکل ۷۰٪ حل شده بود به منظور جلوگیری از تخریب پروتئین‌های آزاد شده (ضمن شکستن دیواره سلولی) به مخلوط اضافه شد. در این مرحله، محتویات لوله ورتکس شده و شکسته شدن سلول‌های مخمیری با میکروسکوپ نوری تأیید گردید. پس از هر بار 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 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از جداسازی پرل شیشه‌ای عصاره مخمیری به مدت ۵ دقیقه در آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس در ظرف حاوی یخ قرار گرفت. لوله‌های حاوی سوسپانسیون سلولی مجدداً به مدت ۵ دقیقه به کمک ورتکس مخلوط شده و سپس سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه)

ماکروفازها به عنوان یک بازوی سیستم دفاعی همواره جهت حذف بیماری‌های قارچی مد نظر محققین قارچ‌شناسی پزشکی بوده است. لذا هدف مطالعه حاضر یافتن روشی سریع (در مقایسه با ساکرومیسس سرویسه) جهت دستیابی به زایموزان از دیواره سلولی مخمر کاندیدا آلبیکنس است که با طی مراحل کمتر بتوان به این ماده دارای خواص متعدد ایمونومولوتوری دست یافت و از آن جهت تحریک سیستم ایمنی (به ویژه ایمنی غیراختصاصی) و یا به صورت ادجوانت استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

سوش قارچی: در این مطالعه آزمایشگاهی ابتدا مخمر کاندیدا آلبیکنس [سوش استاندارد (ATCC:1032)] با رعایت شرایط استریل بر روی محیط سابورودکستروز آگار و کلرامفنیکل کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از ۴۸ ساعت مخمرها رشد کردند و از آن به تعداد 1×10^6 به محیط Glucose Yeast Extract Peptone (GYEP) منتقل شد تا به فاز رشد لگاریتمی برسد.

کشت انبوه کاندیدا آلبیکنس: به این منظور از محیط GYEP همراه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز (پنی‌سیلین، استرپتومایسین و کلرامفنیکل) استفاده شد. پپتون به صورت محلول در اتو کلاو استریل شد. عصاره مخمر و گلوکز بعد از حل شدن در آب مقطر با استفاده از فیلتر (۰/۲ میکرومتر) استریل شدند. مقدار ۲۰۰۰ میلی‌لیتر از این محیط تهیه و در ۴ ارلن استریل تقسیم شد. سوسپانسیونی از نمونه کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه به میزان 1×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر و به مقدار ۸ میلی‌لیتر تهیه شده و از این سوسپانسیون ۲ میلی‌لیتر به

در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در انتها مایع‌رویی دیالیز گردید [۸].

تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد: به این منظور از رنگ کوماسی بریلیانت بلو (G250) استفاده شد و برای تهیه نمونه استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. دانسیته‌های نوری مربوطه با دستگاه الیزا ریدر (طول موج ۵۹۰nm) قرائت شد [۹].

تخلیص زایموزان: ابتدا سوسپانسیون دیواره سلولی ۳-۵ بار با مقادیر کافی آب (با استفاده از همزن حاوی آهن‌ربا به مدت ۱۵ دقیقه) شسته شده تا این که سوپرناتانت (مایع شفاف فوقانی حاصل از سانتریفوژ) شفاف حاصل شد. رسوب به دست آمده در Na_2HPO_4 (دی سدیم هیدروژن فسفات) (یک مولار) به صورت سوسپانسیون ۰.۵٪ حل شد و بعد از ۳ ساعت جوشاندن، در حالی که هنوز سوسپانسیون گرم بود سانتریفوژ (در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) شد. سپس رسوب در آب حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت.

سوسپانسیون سانتریفوژ شده مجدداً در آب حل گردیده و به مدت یک ساعت در بن ماری قرار گرفت (حرارت جوش). این عملیات تا حصول به سوپرناتانت (مایع شفاف فوقانی حاصل از سانتریفوژ) شفاف تکرار گردید و رسوب حاصل در حالت انجماد به صورت پودر خشک (Freeze Dried) درآمد. در این مرحله به رسوب پودر شده، اتانول مطلق سرد اضافه شد تا سوسپانسیونی ۰.۵٪ ایجاد گردید و بعد از قرار دادن آن روی شیکر، رسوب حاصل (پس از سانتریفوژ) در اتانول مطلق سرد حل شد به طوری که سوسپانسیونی ۰.۲٪ به دست آمد که آن را پس از ۳

ساعت سانتریفوژ کرده و رسوب حاصل مجدداً به صورت پودر خشک در آمد [۴].

تعیین وزن مولکولی محصول به دست آمده (الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دو سولفات (SDS-PAGE)): جهت تعیین وزن مولکولی زایموزان از ژل جداکننده ۱۰٪ و ژل متراکم‌کننده ۴٪ تحت شرایط احیایی استفاده شد. میزان ۴۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه (۵x) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه درون چاهک ژل قرار گرفت و در ولتاژ ثابت تفکیک انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی بلو G-۲۵۰ رنگ‌آمیزی شد و برای تعیین وزن مولکولی از مارکر استاندارد استفاده گردید [۱۰].

تست توقف کمپلمان: جهت بررسی فعالیت بیولوژیکی محصول (زایموزان)، تست قابلیت مهار کمپلمان انجام شد. ممانعت از لیز گلبول قرمز و مهار کمپلمان در غلظت‌های مختلف (۴-۲-۱-۰.۵ میلی‌گرم) بررسی گردید. به این ترتیب که زایموزان در مقادیر فوق در ترکیب با ۱ میلی‌گرم کمپلمان و آنتی‌بادی جهت توانایی ممانعت از لیز اریتروسیت‌های گوسفندی مورد بررسی قرار گرفت. در شرایط طبیعی ترکیب آنتی‌بادی-کمپلمان-اریتروسیت منجر به لیز گلبول‌های قرمز می‌گردد [۱۱].

تست LAL (Limulus Amebocyte Lysate): اساس این تست بر مبنای انعقاد ژل است. بدین صورت که در صورت وجود زایموزان در محصول استخراج شده، ژل مورد نظر منعقد شده و رنگ آبی ایجاد می‌گردد و در صورت عدم وجود آن، ژل منعقد نشده و تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. حساسیت کیت مورد استفاده Eu/ml (میلی‌لیتر/ واحد سم داخلی) ۰/۱۲۵ بود (با استفاده از متد Gel/clot) نمونه در

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که با استفاده از روش استفاده شده در این مطالعه می‌توان مراحل تخلیص را در مقایسه با ساکارومیسس سرویسه (تقریباً به نصف) کاهش داد و به حجم بیشتری از محصول رسید. در مطالعات گذشته با استفاده از سلول تام مخمر ساکارومیسس، پروتکل دارای ۴۴ مرحله بود. بنابراین با استفاده از سلول‌های شکسته شده کاندیدا و تخلیص دیواره سلولی و سپس استخراج زایموزان از آن می‌توان بسیاری از مراحل را کاهش داد. طولانی بودن روند تخلیص همواره احتمال آلودگی میکروبی کشت‌های مورد استفاده را افزایش می‌دهد [۴].

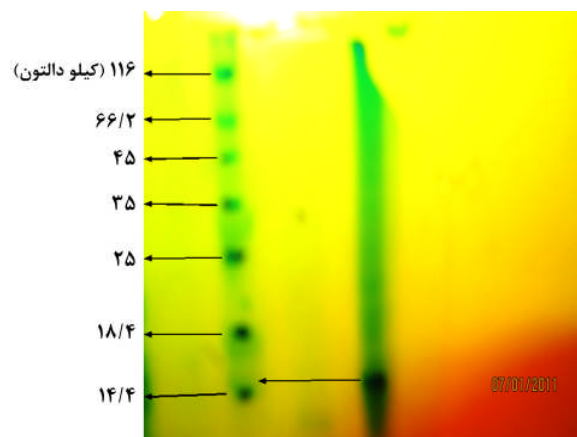
بررسی‌های متعددی نشان داده، زایموزان یک فعال‌کننده سیستم ایمنی است که می‌تواند نقش تنظیم‌کننده بیولوژیکی سیستم دفاعی را نیز داشته باشد و حتی از آن می‌توان به عنوان ادجوانت (یاور) استفاده کرد [۱۳]. زایموزان توان تحریک سلول‌های دندتیک را نیز دارد [۱۴].

زایموزان با تأثیر در آزاد شدن سیتوکاین‌های تیپ Th1 نظیر IL-1 و IL-2 در فعال شدن لنفوسیت‌های T، clony-stimulating factor و تولید مغز استخوان نقش دارد. اینترلوکین ۱ و ۲ از ایمنومدولاتورهای آندوژن می‌باشند که برای ایجاد پاسخ مؤثر ایمنی لازم هستند. در مطالعه‌ای، ترشح اینترلوکین ۱ و ۲ طحال و پلاسما پس از مصرف گلوکان در موش صحرایی، طی ۱۲ روز تا یک ساعت قبل از خون‌گیری و خارج کردن طحال اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که گلوکان باعث افزایش مؤثر این

یک میلی لیتر ۱ L.R.W (LAL Reagent WATER) حل گردید. سپس مقدار ۲۵۰ لانداز نمونه روی ویال‌های کیت ریخته شد و پس از شیک (تکان دادن) به مدت یک ساعت در حالت بدون حرکت در انکوباتور با دمای متوسط ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در این مرحله از نظر تشکیل ژل مورد بررسی قرار گرفت. دو نمونه مثبت و منفی نیز به عنوان کنترل گذاشته شد (نمونه منفی L.R.W و نمونه مثبت اندوتوکسین استاندارد Ecoli) که نتایج مثبت و منفی همزمان قرائت گردید [۱۲].

نتایج

پس از اتمام فرآیند جداسازی و تخلیص، محصول نهایی زایموزان در حدود ۱/۸٪ وزن خشک مخمر اولیه به دست آمد. این فراکشن توانایی توقف کمپلمان در همه غلظت‌های به کار رفته را داشت (که یکی از ویژگی‌های بیولوژیک زایموزان است). همچنین تغییر رنگ ژل در تست L.A.L مؤید وجود بخش پلی‌ساکاریدی گلوکان بود. باند زایموزان (گلوکان در اتصال به پروتئین) در الکتروفورز (SDS-PAGE) دیده شد (شکل ۱).



شکل ۱- باند زایموزان در مقایسه با مارکر در ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دو سولفات

است و هم خطر آلودگی کاندیدا به میکروارگانسیم‌های دیگر را در حین عصاره‌گیری تقلیل می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که می‌توان مراحل تخلیص این فراکشن را (در مقایسه با ساکارومیسس سرویسه) به نصف تقلیل داد (تعداد مراحل ۲۰ مورد است)، بنابراین روش به کار رفته در این مطالعه برای تهیه زایموزان طبیعی از دیواره سلولی مخمر کاندیدا آلبیکنس مناسب است. زایموزان پس از استخراج خواص بیولوژیک خود را نیز حفظ می‌کند.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که در انجام این طرح همکاری نمودند، تشکر بعمل می‌آید.

سایتوکاین‌ها و در نتیجه فعال شدن لنفوسیت‌های T و colony stimulating factor می‌شود [۱۵].

لازم به ذکر است که در تمامی مطالعات فوق از زایموزان تجاری ساکارومیسس سرویسه استفاده شده است.

لذا با تخلیص مناسب، بومی و بهینه زایموزان کاندیدا آلبیکنس می‌توان حداقل به مدت سه سال آن را در دمای ۲-۸ درجه نگهداری کرد و با توجه به اقبال روزافزون به فرآورده‌های بیولوژیک با منشاء طبیعی، مکمل‌های غذایی مطمئن و نتایج فوق‌العاده زایموزان در موارد مناسب از آن استفاده کرد. کاندیدا آلبیکنس قارچی سهل‌الوصول بوده که به راحتی می‌توان آن را در حجم انبوه تولید کرد و با شکستن دیواره سلولی (با استفاده از تکنیک به کار رفته در این مطالعه) مراحل تخلیص را کاهش داد که این موضوع هم در کاهش هزینه تولید زایموزان طبیعی مؤثر

References

- [1] Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 1 th ed, churchill livingstone. 2003; 3-16
- [2] Wasser SP. Medicinal mushroom science, history, current status, future trends and unsolved prolems. *Int J MedMuh* 2010; 12: 1-16.
- [3] Ripon JW. Medical Mycology. 3th ed .Saunders Company. 1998; pp: 520-1.
- [4] Holan Z, Beran K, Miller I. Preparation of zymosan from yeast cell walls. *Folia Microbiol* 1980; 25(6): 501-4.
- [5] Czop JK, Auston KF. A beta- glucan inhibitable reseptor on human monocytes:its identity with the phagocytic receptor for particulat activators of the complement pathway. *J Immunol* 1985; 134(4): 2588-93.

- [6] Akramien D. Effects of beta- glucan on the immune system. *Medicina kaunas* 2007; 43(8): 597-606.
- [7] Christiana N. Zymosan Zaps Diabetes. *J Immunol* 2010; 185(5): 2641-2.
- [8] Cassone A. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr Top Med Mycol* 1989; 3: 248-314.
- [9] Bredford MM. A rapid and sensitive for the quantitation microgrames of protien utilizing the principle of pritein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1970; 72: 248-54.
- [10] Shapiro AL. Molecular weight estimation of polypetide chain by electrophroesis in SDS-polysacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Common* 1967; 28(5): 815-20
- [11] Smith MC, Pensky J. Inhibition of lymozan induced alternativ complement pathway activation by concavalin A. *Infect Immun* 1982; 38(3): 1279-84.
- [12] Seo SC, Reponen T, Levin L, Grinshpun SA. Size-fractionated (1-3)-beta-D-glucan concentrations aerosolized from different moldy building materials. *Sci Total Environ* 2009; 407(2):806-14.
- [13] Akira A, Takeshi I, Shin T, Takeshi K. Zymosan Enhances The Mucosal Activity of Poly(I:C) In A Nasal Influenza Vaccne. *J Med Virology* 2010; 82: 476-84.
- [14] Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padron F, Blanco L, et al. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *mediators Inflamm.* 2010; 2: 45-7. (2010; pii: 201929. Epub 2010)
- [15] Sherwood E. Enhancement of interleukin-1 and interleukin-2 production by soluble glucan. *Int J Immunopharmacol* 1987; 9(3): 261-7.

Preparation of Zymosan from *Candida Albicans* Cell Wall

S.M. Moosavi¹, Sh. Roodbar Mohammadi², Z.H. Saraf³, M.H. Yadegari⁴, A.R. Khosravi⁵

Received: 17/04/2011 Sent for Revision: 20/06/2011 Received Revised Manuscript: 18/01/2012 Accepted: 14/05/2012

Background and Objectives: Zymosan is the name given to a yeast cell wall fraction having the specific immunomodulatory property, e.g. stimulation of phagocytosis and reticuloendothelial system. Interest in this fraction is derived from positive results of zymosan administration. Recently zymosan has been used more fragmentally in various clinical investigations, for example in transplantation and autoimmune disease.

Our aim was to find a rapid and new procedure for isolation of zymosan from *Candida albicans* cell wall.

Materials and Methods: In this laboratory study, *Candida albicans* was cultured on *GYEP Yeast* and harvested, then cell wall of the yeast *Candida albicans* after disintegration, centrifugation and repeat washing were suspended in 0.5M Na₂HPO₄ as a 5% suspension. The suspension was boiled for 3h, purified by repeated washing with water and ethanol. Finally the product was freeze-dried. Zymosan purification was confirmed using complement fixation test, LAL test and SDS-PAGE.

Results: The yield of zymosan was about 1.8 percent of original yeast by dry weight. This yeast fraction had property of inactivating the complement. Result of L.A.L test have demonstrated that zymosan product had glucan. also zymosan bound was detected.

Conclusion: This study suggested that this method is fast and useful (in comparison to *Saccharomyces Cervisiae*) for preparation of zymosan from *Candida albicans* cell wall. Regarding to the results of complement fixation test, the zymosan preserved its biological properties.

Key words: Zymosan, *Candida Albicans*, Cell wall

Funding: This research was funded by Tarbiat Modarres University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Tarbiat Modarres University approved this study.

How to cite this article: 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. [Farsi]

1- Medical Mycology Faculty of Medicine, Tarbiat Modares Tehran, Iran

2- Assistant Prof, Dept. of Mycology, Tarbiat Modares Tehran, Iran

(Corresponding Author) (021) 88026898, Fax: (021) 82884555, E-mail: smmosavi1078@yahoo.com

3- Prof, Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares, Iran

4- Assistant Prof, Dept. of Mycology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares, Iran

5- Assistant Prof, Dept. of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Iran