مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶
صفحات: ۳۱۲-۳۰۷

ارزیابی ایمنولوژیک اثر عصاره میسلیومی ، کونیدی و آنزیم کاتالاز قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس بر میزان تولید نیتریک اکساید در مدل موشی

شهلا رودبار محمدی✍، احمد زواران حسینی* ، علیرضا خسروی**
محمدحسین یادگاری * ، محمدرضا شکوه امیری**** ، فاطمه غفاری*****

چکیـده

زمینه و هدف: آسپرژیلوز مهاجم (IA) یکی از بیماریهای مهلک و پراهمیت قـارچی در افـراد دچـار ضـعف سیسـتم ایمنـی، دیابتیک، گیرندگان مغز استخوان و بیماران مبتلا به ایدز می‌باشد. نیتریک اکساید یکی از فراورده‌های ضدمیکروبی سلول های فاگوسیتی است کـه در دفـاع غیـر اختصاصـی دارای اهمیـت ویـژه ای اسـت. از آنجاییکـه سیسـتم دفـاعی فـرد مبـتلا بـه آسپرژیلوزیس با اشکال میسلیومی وکونیدی وفراورده های قارچ مواجه مـی‌باشـد، لـذا در ایـن تحقیـق اثـر تحریکـی عصـاره میسلیومی، کونیدی و آنزیم کاتالاز قارچ آسپرژیلوس فومیگـاتوس بـر میـزان تولیـد نیتریـک اکسـاید (No) از نوتروفیـل‌هـا و ماکروفاژهای مدل موش بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: ابتدا آنزیم کاتالاز براساس تکنیک کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص گردید. سپس سوسپانسـیون قـارچی حاوی ۱×۱۰^{۳} کونیدی آماده و ۴۰ سر موش Balb/c ، به چهار گروه تقسیم و با ۳۰۰ µg از آنزیم کاتالاز، عصـاره میسـلیومی، کونیدی و ادجوانت به‌طور مجزا و به طرز داخل صفاقی تلقیح شدند. ماکروفاژهای صفاقی و همچنین نوتروفیل‌های هـر گـروه تحت شرایط استریل جدا و در معرض آنزیم کاتالاز تخلیص شده به مقدار ۰/۵ mg/ml قرار گرفتنـد. میـزان تولیـد نیتریـک اکساید این سلولها با استفاده از روش گریس و در مایع رویی محیط کشت سلولی اندازه‌گیری شد.

نتایج و یافته‌ها: آنالیز یافته‌ها با تست آنوا (Anova) نشان داد میزان تولید نیتریک اکساید نوتروفیل ها وماکروفاژهای گروه حساس شده با کاتالاز به‌طور معناداری بیش از سایر گروهها بود ($P \leq ۰/۰۵$) کاتالاز بـا افـزایش تولیـد نیتریـک اکسـاید و در نتیجه افزایش توان کشندگی ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها می‌تواند در تحریک سیستم ایمنـی میزبـان علیـه عفونتهـای قـارچی از جمله آسپرژیلوس فومیگاتوس میتواند موثر باشدودر طراحی یک مدل واکسن استفاده گردد. در حالیکـه فـرم کونیـدی، عصـاره میسلیومی چنین تأثیری نداشت.

کلید واژه‌ها: آسپرژیلوس فومیگاتوس، نیتریک اکساید، عصاره میسلیومی.آنزیم کاتالاز

✍ نویسنده مسئول: *گروه آموزشی قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران – ایران*
* گروه آموزشی ایمنی‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران – ایران
** گروه آموزشی قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران – ایران
*** گروه آموزشی قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران
**** فارغ التحصیل قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران – ایران
***** گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آسپرژیلوز مهاجم (IA) یکی از بیماری‌های مهلک و پراهمیت قارچی در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی، دیابتیک، گیرندگان مغز استخوان و بیماران مبتلا به ایدز می‌باشد. مکانیسم دفاعی میزبان علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس عمدتاً از دفاع غیراختصاصی بهره می‌برد [۱۱,۱۲,۱۳]. ماکروفاژهای آلوئولار نخستین خط دفاعی میزبان در کنار سایر اجزای سیستم ایمنی ذاتی می‌باشد که چنانچه به‌دلیل ضعف سیستم ایمنی، قادر به هضم کونیدی نباشند، سایر سلولهای فاگوسیت کننده از قبیل ماکروفاژهای صفاقی و نوتروفیل‌ها درصدد هضم عناصر قارچی برمی‌آیند [۱۵,۱۶]. ماکروفاژها فعالیت ضدمیکروبی خود را عمدتاً از دو طریق وابسته و غیروابسته به اکسیژن آغاز می‌کنند نیتریک اکساید یکی از فراورده‌های ضدمیکروبی و ضدالتهابی وابسته به اکسیژن ماکروفاژهاست. ماکروفاژها بسیاری از عملکردهای اجرائی خود را فقط هنگامی که با میکروب و سایتوکاین‌ها و یا سایر محرک‌ها فعال شوند بروز می‌دهند یک نوع از این فعالیت‌ها مانند تولید نیتریک اکساید به‌دنبال محرک خارجی پس از القا صورت می‌گیرد. چنانچه هر عاملی بتواند در تحریک تولید نیتریک اکساید و افزایش توان ضد پاتوژنی ماکروفاژهای آلوئولار و صفاقی مؤثر باشد دفاع میزبان را علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس تقویت می نماید [۶,۷,۸]. از آنجاییکه سیستم دفاعی میزبان با اشکال مختلف کونیدی، میسلیوم و آنزیم‌های مختلف قارچ مواجه می‌باشد لذا در این بررسی اثر کونیدی، عصاره میسلیومی و آنزیم کاتالاز به‌طور مجزا به روی میزان تولید نیتریک اکساید در سلولهای فاگوسیت کننده سنجش شد [۹,۱۰].

روش بررسی

تهیه سوسپانسیون حاوی کونیدی

قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس در محیط کشت جامد چابکس کشت داده شد. پس از گذشت یک هفته، ml ۱۰۰ نرمال سالین استریل به همراه توین ۲۰ (Tween 20) روی محیط کشت ریخته و محتوای سوسپانسیون حاصل از گاز استریل عبور داده شد. سپس به مدت ده دقیقه با دور g × ۱۳۰۰ در دمای ۴°C سانتریفوژ و از رسوب حاصل میزان ۱۰۶ × ۱ کونیدی قارچ در هر میلی‌لیتر برداشت شد. از کونیدی قارچ جهت تزریق به حیوان استفاده گردید.

مدل حیوانی

۴۰ سر موش Balb/c ماده ۸-۶ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵-۲۳ گرم به‌طور تصادفی و غیرانتخابی به گروههای پنج تایی تقسیم، و هر گروه به‌طور مجزا با مقدار µgr ۳۰۰ از آنزیم کاتالاز، کونیدی، عصاره میسلیومی و ادجوانت تلقیح شدند.

تزریق داخل صفاقی مدل حیوانی طی سه مرحله دوره بیست روزه ابتدا به همراه ادجوانت کامل فروند و سپس با ادجوانت ناقص فروند انجام پذیرفت.

جهت بررسی میزان تولید نیتریک اکساید نیاز به جداسازی ماکروفاژهای صفاقی و نوتروفیل‌ها از هر گروه مورد آزمایش بود.

مراحل جداسازی ماکروفاژهای صفاقی

موش‌های هر گروه ابتدا توسط اتر بیهوش شده پوست شکم را تحت شرایط استریل باز کرده، حدود ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر RPMI را به صفاق موش تزریق نموده، سپس مایع تزریق شده را جمع‌آوری کرده و در لوله‌های درپیچ‌دار استریل که قبلاً به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی ۵ واحد هپارین ریخته بودیم اضافه گردید.

لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ×۲۰۰ سانتریفوژ و دو بار با بافر هنکس و در آخر سلولها با محیط RPMI-1640 ، شستشو داده شد. سلولهای شسته شده را به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و تعداد آنها توسط لام نئوبار شمارش شد. تعداد سلولها به ۲×۱۰۵ در هر میلی‌لیتر رسانده با استفاده از رنگ تریپان بلو ۰/۲٪ تعداد و درصد سلولهای زنده کنترل گردید.

مراحل کشت ماکروفاژ و جمع‌آوری مایع رویی

ابتدا چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلول ماکروفاژ به تعداد ۲×۱۰۵ پر شد. میکروپلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور Co2 دار و در دمای ۳۷°C قرار گرفت در این حالت ماکروفاژها به کف پلیت چسبیده و سلولهای غیرچسبنده در مایع رویی چاهک قرار می‌گیرند که بدور ریخته می‌شوند. سپس ماکروفاژهای جدا شده از گروههای مختلف مدل

Archive of SID
www.SID.ir

حیوانی در معرض ۰/۵ mg/ml کاتالاز قرار گرفته و چاهک کنترل مثبت و کنترل منفی نیز در کنار چاهک تست به قرار زیر تعیین می‌گردد. چاهک کنترل مثبت حاوی ۲×۱۰۵ سلول ماکروفاژ، ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و ۵۰ میکرولیتر لیپوپلی‌ساکارید (۱۰۰ ng/ml) بود و چاهک کنترل منفی حاوی ۲×۱۰۵ سلول ماکروفاژ، ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و ۵۰ میکرولیتر مهارکننده نیتریک اکساید NMMA (N-monomethyl-arginine) بود. سپس میکروپلیت ۲۴ ساعت در انکوباتور Co2 دار در دمای ۳۷°C نگهدارش شده و مایع رویی هر چاهک به‌طور جداگانه جهت اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید تولید شده در میکروتیوب ۰/۵ ml جمع‌آوری و در ۷۰°C- نگهداری شد.

مراحل جداسازی نوتروفیل‌ها

موشها توسط اتر بیهوش شده و سپس تمام خون قلب جمع‌آوری گردید. خون به نسبت یک به یک به محلول ۶٪ هیدروکسی اتیل استارچ اضافه گردید. این مخلوط به مدت زمانی ۳۰-۲۵ دقیقه ساکن مانده، سپس مایع رویی با سمپلر جدا شده و به نسبت یک به یک به فایکولی که در دمای اتاق قرار گرفته اضافه گشت. آنگاه بیست دقیقه با دور RPM ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد، رسوب سلولی جهت حذف گلبولهای قرمز دوبار با آمونیوم کلراید ۰/۸٪ و یکبار با RPMI شستشو داده شد. تعداد ۲×۱۰۵ نوتروفیل‌های زنده پس از شمارش و رنگ‌آمیزی با تریپان بلو به چاهک‌های محیط کشت سلولی وارد شد.

روش کشت نوتروفیل‌ها

ابتدا ۲×۱۰۵ نوتروفیل به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید سپس دو چاهک اول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد که حاوی ۲×۱۰۵ نوتروفیل، ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و پنجاه میکرولیتر لیپوپلی‌ساکارید (۱۰۰ ng/ml) بود.

دو چاهک بعدی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد که حاوی ۲×۱۰۵ نوتروفیل و ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و ۵۰ میکرولیتر مهارکننده نیتریک اکساید (NMMA) بود. در چاهک‌های بعدی ۲×۱۰۵ نوتروفیل در معرض ۰/۵ mg/ml کاتالاز قرار گرفته، سپس پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور Co2 دار در دمای ۳۷°C قرار گرفته و بعد از آن مایع رویی هر چاهک به‌طور مجزا در میکروتیوپ‌های ۰/۵ ml جمع‌آوری و جهت سنجش میزان نیتریک اکساید تولید شده در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

اندازه‌گیری نیتریک اکساید

نیتریک اکساید بسیار ناپایدار بوده و نیمه عمری بین ۱۰-۶ ثانیه داشته و به سرعت در حضور اکسیژن به نیتریت (No2) تبدیل می‌شود. غلظت نیتریت در مایع رویی کشت سلول به‌عنوان شاخص تولید نیتریک اکساید در نظر گرفته می‌شود و میزان آن با واکنش رنگ سنجی گریس تعیین می‌گردد.

مایع رویی کشتهای سلولی ماکروفاژی و نوتروفیلی که در برودت ۷۰°C- نگهداری شده بود در دمای اتاق قرار گرفته به مدت یک دقیقه در دور (RPMI ۷۰۰-۶۰۰) سانتریفوژ شد. سپس جهت تهیه منحنی استاندارد غلظت‌های مختلفی از نیتریت سدیم آماده گشت ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس همزمان به غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم و مایع رویی جمع‌آوری شده از کشت ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها به‌طور مجزا اضافه گردید. پس از ده دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، طیفی از رنگ‌های ارغوانی با شدتهای مختلف براساس میزان نیتریت موجود در آنها ایجاد شد که با طول موج ۵۴۰ نانومتر و فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر میزان جذب (OD) خوانده شد. سپس منحنی استاندارد براساس غلظتهای مختلف نیتریت سدیم ترسیم گردید و با استفاده از خط رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها با استفاده از عدد جذب (OD) آنها محاسبه و به‌صورت میکرومولار نیتریت بیان گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اندازه‌گیری نیتریک اکساید

تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون پارامتری آنالیز واریانس یک طرفه (LSD) و غیرپارامتری آنوا (ANOVA) و بسته نرم‌افزاری SPSS انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱ . میانگین تولید NO توسط ماکروفاژهای صفاقی موشهای حساس شده در گروههای مختلف پس از آخرین تزریق در شرایط in vitro که در مجاورت القا کننده کاتالاز

گروههای حساس شده با	القا کننده		
	کنترل مثبت (خطای استاندارد ±میانگین)	کنترل منفی (خطای استاندارد ±میانگین)	کاتالاز (خطای استاندارد ±میانگین)
ادجوانت	۲۰/۱۴ ± ۱/۵۱	۶/۸۶ ± ۰/۲۵	۷/۴۹ ± ۰/۲۶
کاتالاز	۲۰/۳۳ ± ۱/۵۱	۷/۵۶ ± ۰/۶۱	۱۸/۷۷ ± ۰/۸۸
کونیدی	۱۸/۵۳ ± ۱/۰۶	۶/۹۵ ± ۰/۱۸	۸/۳۵ ± ۰/۲۲
عصاره	۱۸/۲۱ ± ۱/۳۰	۶/۶۴ ± ۰/۳۱	۱۷/۶۳ ± ۳۸۰

جدول ۲ . میانگین تولید NO توسط نوتروفیلهای موشهای حساس شده در گروههای مختلف که پس آخرین تزریق، در شرایط in vitro در مجاورت القا کننده‌های کاتالاز

گروههای حساس شده با	القا کننده		
	کنترل مثبت (خطای استاندارد ± میانگین)	کنترل منفی (خطای استاندارد ±میانگین)	کاتالاز (خطای استاندارد ± میانگین)
ادجوانت	۱۳/۲۸ ± ۱/۱۷	۲/۲۱ ± ۰/۲۴	۳/۳۰ ± ۰/۲۰
کاتالاز	۱۴/۳۹ ± ۱/۷۴	۲/۶۵ ± ۰/۵۸	۲۴/۴۵ ± ۵/۲۱
کونیدی	۲۱/۶۰ ± ۱/۸۸	۳/۴۲ ± ۰/۴۹	۱۲/۱۴ ± ۳/۲۸
عصاره	۱۳/۶۳ ± ۱/۲۵	۵/۰۲ ± ۱/۷۷	۳/۸۴ ± ۰/۲۶

میزان نیتریک اکساید تولید شده در ماکروفاژهای صفاقی از گروه حساس شده با کاتالاز

در این گروه ماکروفاژها زمانیکه در معرض القا کننده کاتالاز قرار گرفتند نیتریک اکساید بیشتری ۱۸/۷۷±۰/۸۸ µM نسبت به سایر گروهها تولید کرده بودند این تفاوت از لحاظ آماری معنادار بوده است ($P \leq ۰/۰۵$)

میزان نیتریک اکساید تولید شده در ماکروفاژهای صفاقی از گروه حساس شده عصاره میسلیومی

در این گروه نیز ماکروفاژها پس از قرار گرفتن در مقابل القا کننده کاتالاز نیتریک اکساید بیشتری ۱۷/۶۳±۳۸۰ نسبت به گروه حساس شده با کونیدی داشتند که این تفاوت از لحاظ آماری معناداری بوده است ($P \leq ۰/۰۵$).

میزان نیتریک اکساید تولید شده در نوتروفیل‌ها از گروه حساس شده با کاتالاز

نوتروفیل‌های این گروه نیز پس در معرض قرار گرفتن با القا کننده کاتالاز دارای میزان نیتریک اکساید بیشتری (۲۴/۴۵±۵/۲۱µM) نسبت به اثر گروهها بوده‌اند ($P \leq ۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

نیتریک اکساید عامل مؤثری بر علیه بسیاری از عفونتهای قارچی مانند هیستوپلاسموزیس و پنی‌سیلیوزیس مارنفئی می‌باشد، مطالعه Bellosi و همکاران نشان داد که شکل میسلیومی قارچ کاندیدا آلبیکنس نیز نسبت به عمل نیتریک اکساید حساس بوده و نیتریک اکساید در توقف رشد کاندیدا چه به‌صورت مستقیم و چه از طریق همراهی با سایر عوامل، مؤثر است [۱,۱٤]. نتایج در مطالعه حاضر نشان داد زمانی که سلولهای ماکروفاژ و نوتروفیل از موشهای حساس شده در گروههای مختلف با القا کننده کاتالاز انکوبه گشتند افزایشی در میزان تولید نیتریک اکساید نسبت به گروه کنترل ایجاد شد (۵/۲۱±۲۴/۴۵ و ۰/۸۸ ±۱۸/۷۷).

استفاده از مهارکننده نیتریک اکساید (N- NMMA monomethyl-arginine) به همراه کونژوگه و اینترفرون گاما در چاهک‌های کنترل، مقدار تولید نیتریک اکساید را تا سطح حدود ۵ میکرومول کاهش داد. از چنین کاهش سطح نیتریک اکساید می‌توان نتیجه گرفت تولید معنادار NO در گروههای حساس شده به‌دلیل فعالیت مسیر تولید NO از راه L-argenie بوده است.

مقدار کم نیتریک اکساید تولیده شده از گروه موشهای تزریق شده با کونیدی احتمالاً به‌دلیل وجود برخی از مولکولهایی با وزن مولکولی پایین و دارای خواص ساپرسیو می‌باشد که از فاز کونیدال قارچ آسپرژیلوس تولید شده و بر ارتشاح آنیون سوپراکسید، هیدروژن پراکسیداز اثر مهاری دارد. اینگونه مولکولها به گرما مقاوم بوده و قبل از جوانه زدن کونیدی ترشح شده و با میکروفیبریل‌های قابل انقباض سیتوپلاسمی وارد واکنش شده، توانایی فاگوسیتوز را کاهش می‌دهد. از سوی دیگر نیز تولید IFN-γ و IL-6 را و با استفاده از فاکتورهای AP1 و Nf-KB مهار می‌کند [٤,۱۷,۱۸].

گرچه مطالعات بسیار محدودی بر روی نقش کونیدی قارچ آسپرژیلوس بر تحریک سنتز نیتریک اکساید صورت گرفته ولی در مطالعه سال ۲۰۰۳ Latge و همکاران نشان می‌دهد، مدت انکوباسیون و نوع استرین کونیدی آسپرژیلوس به‌کار رفته نوع و محل ماکروفاژها و گونه میزبان در مقدار تحریک نیتریک اکساید مؤثر می‌باشد[۱۵]. از آنجایی که سلولهای مورد آزمون گروههای مختلف که تحت القاء عصاره میلسیومی قرار گرفته‌اند به لحاظ تولید نیتریک اکساید نسبت به سلولهایی که تحت اثر کونیدی قرار گرفته‌اند، اختلاف آماری معناداری نداشت احتمالاً بتوان وجود عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی را در عصاره میسلیومی نیز حدس زد.

از آنجایی که میزان تولید نیتریک اکساید ماکروفاژهای صفاقی و نوتروفیل‌ها پس از در معرض قرار گرفتن با آنزیم کاتالاز افزایش یافت. لذا می‌توان از منظر تحریک و افزایش دهنده فعالیت سلولهای عملگر ایمنی می‌توان در تحریک و در یک از این آنزیم جهت طراحی یک مدل واکسن استفاده کرد با توجه به تأکید سازمان بهداشت جهانی (WHO) و انستیتو عفونت و آلرژی NIAID در ایجاد طراحی واکسن درخصوص عفونتهای مرتبط با کاندیدا، آسپرژیلوزس و کریپتوکوکوس [۲,۳,۵]، در مطالعه بعدی از این آنتی‌ژن جهت ایجاد یک مدل واکسن بهره گرفته شد.

References

1- Hearn, V. Wilson, E and Mackenzie, D.W.R (1992). Analysis of Aspergillus fumigatus catalases possessing antigenic activity. J. Med. Micro. 36: 61-67.

2- Albina J., Reichner J. (1998) Role of Nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apotosis. Cancer. Metas. Rev. 17, P: 35-53.

3- Cenci E., Mencacci A., Bacci A., Kurup VP. (2000) Cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. J. Immunol. 195(1): 381-385.

4- Chiller T., Farrokhshad K., Brummer E., Stenens D. (2001) The interaction of Human monocytes, monocyte-derived macrophages, and polymorphonuclear neutrophils with caspofungin (MK-0991), and echinocandin, for antigungal activity against Aspergillus fumigatus. Diag. Mic. Infect. Dis.

www.SID.ir

39: 99-103.

5- DeePe, GS. (1997) Prospects for the development of fungal vaccines. Clinc. Mic. Rev. Oct, 585-596.

6- Didier, PJ., Paradis, Gladue, RP. (1999) The C-C chemokine MIP-1 induces a selective monocyte infiltration following intradermal injection in to non human primates. Inflam. 23: 75-90.

7- Dixon DM., Casadevall A., Kiein B. (1998) Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. Med. Mycol. 39: 57-67.

8- Fuchs, D., Murr, C., Reibnegger, G. (1994) Nitric oxide synthase and antimicrobial a nature of human macrophages. J. Infect Dis. 169: 224-229.

9- Gonzalez, A., Gregori, W., Velez, D., Restrepo, A., Cano, L. (2000) Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against Paracoccidiodes brasiliensis conidia. Infect. Immu. P. 2546-2552.

10- Granet, OI., Philoppe, B., Boleti, H., Latge JP. (2000) Phagocytosis and Intracellular Fate of Aspergillus fumigatus conidia in Alveolar Macrophages. Infect. Immu. feb, P. 891-903.

11- Latge, JP. (1999) Aspergillus fumigatus and aspergillosis. Clin. Mic. Rev. Apr, P. 310-350.

12- Latge, JP. (2001) The pathobiology of Aspergillus fumigatus. Trends in Mic. 9(8).

13- Mehrad, B., Strieter, RM., Standiford, TJ. (1999) Role of TNF-α in pulmonary Host Defense in Murine Invasive Aspergillosis. J. Immunol. 162: 1633-1640.

14- Miles, AM. (1995) Nitric oxide synthase in circulating on polymorphonuclear leukocytes. J. Leukocyte Biol. 58: 616-622.

15- Philippe, Granet, I., Perez, MS., Meeren, AV., Latge, JP. (2003) Killing of Aspergillus fumigatus. by Alveolar Macrophages Is Mediated by Reactive Oxidant Intermediates. Infect. Immun. June, P. 3034-3042.

16- Roilides, E., Dimitriadou Georgiadou, A. (1998) Tumor necrosis factors enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against Aspergillus fumigatus. Infec. Immun. 99: 5999-6003.

17- Roilides, ET., Sein, A., Holmes, S. (1995) Effects of macrophage colonystimulating recetor on antifungal activity of monounuclear phagocytes against aspergillus fumigatus. J. Infect Dis. 172: 1028-1038.

18- Waid, A., Leisenring, W., Burik, J., Bowden, R. (2002) Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergiong bone marrow transplanation. Clin. Infect. Dis. 34: 909-917.

www.SID.ir