Archive of SID

دانشور
پزشکی

بررسی نوع و فعالیت آنزیم‌های موجود در مواد دفعی - ترشحی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور

نویسندگان: دکتر حسینعلی مهرانی[*1]، دکتر عباس محمودزاده[2]، شهناز شیربازو[3] و دکتر مهوش جعفری[4]

۱. استاد بیوشیمی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی - مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)
۲. دانشیار انگل‌شناسی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی - مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)
۳. مربی انگل‌شناسی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی - مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)
۴. استادیار بیوشیمی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی - مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)

* نویسنده مسئول مکاتبه: h.mehrani@bmso.ac.ir

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال دوازدهم - شماره ۵۶
اردیبهشت ۱۳۸۴

چکیده

سابقه: لیشمانیوز جلدی، بیماری شایع در مناطق مختلف دنیا است که توسط تک یاخته لیشمانیا ایجاد می‌شود. روش‌های مختلف به‌کار رفته، از جمله واکسیناسیون برای پیشگیری و کنترل این بیماری تاکنون نتایج مطلوب نداشته است. مواد مختلف، از جمله آنزیم‌ها را انگل لیشمانیا در محیط کشت از خود دفع و ترشح می‌کند. آنزیم‌ها می‌توانند در بیولوژی انگل نقش مهمی بازی کنند. آن‌ها برای نفوذ به سلول میزبان، هضم بافت‌های میزبان، تحریک‌سیستم‌ایمنی میزبان و ... توسط انگل تولید می‌شوند.

هدف: شناسایی‌آنزیم‌های‌موجود در مواددفعی-ترشحی‌انگل‌لیشمانیا ماژور در محیط کشت‌است.

روش: انگل لیشمانیا ماژور که در موش نگهداری می‌شد در محیط کشت به شکل پروماستیگوت رشد داده شد و پس از چهار بار پاساژ از محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله و آنتی‌بیو تیک به محیط کشت عاری از سرم و آنتی‌بیو تیک منتقل گردید. مواد دفعی - ترشحی با استفاده از سانتریفیوژ و فیلتر ۲۲ درصد میکرون در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تهیه شد و جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها و تعیین انواع پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. دو آنزیم اسید فسفاتاز و استیل‌کولین استراز با روش اندازه‌گیری فعالیت اختصاصی آنزیم در مایع دفعی ـ ترشحی شناسایی گردید.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در زمان صفر منفی بود، از ساعت ۶ به بعد شروع به افزایش کرد، در ۲۴ ساعت به حد اکثر مقدار خود رسید و از این زمان به بعد، کاهش یافت. فعالیت اسید فسفاتاز در زمان صفر بسیار جزئی بود و در ۶ ساعت حد اکثر مقدار خود را داشت و پس از این مدت، سیر نزولی نشان داد. همچنین در SDS-PAGE مواد دفعی - ترشحی، سه باند پروتئینی در محدوده ۱۳۰، ۱۰۰ و ۷۵ کیلو دالتون ظاهر گردید که شدت باند ۱۱۰ کیلو دالتونی بیش‌تر از باند ۱۳۰ و ۷۵ کیلو دالتونی بود.

بحث و نتیجه‌گیری: از آن‌جا که پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، نقش مهمی در ایجاد عفونت و ایمنی‌زایی در میزبان بازی می‌کنند، امید می‌رود آنزیم‌ها و پروتئین‌های حاصل از مواد دفعی - ترشحی عامل مناسبی برای واکسیناسیون و ایجاد ایمنی در لیشمانیوز جلدی باشند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، مواد دفعی، ترشحی، اسید فسفاتاز، استیل‌کولین استراز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیشمانیوزها از مسائل بهداشتی مهم در جوامع بشری هستند و در حال حاضر نیز در ۸۲ کشور به‌صورت اندمیک شایعند. ابتلای ۱۲ میلیون نفر در دنیا، گزارش سالیانه ۲ میلیون مورد جدید بیماری و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا، نشان دهنده اهمیت بالای بهداشتی این طیف از بیماری است [۱].

علی‌رغم استفاده از انواع مختلف داروهای گیاهی و شیمیایی، درمان دارویی مؤثر، ارزان و بدون عوارض جانبی برای این بیماری‌در دسترس‌نیست [۲]. روش‌های دیگر کنترل بیماری از قبیل مبارزه با ناقلین و مخازن تاکنون مؤثر نبوده است [۳]. بنابراین به نظر می‌رسد، بهترین و منطقی‌ترین راه مبارزه، تقویت سیستم ایمنی انسان باشد. این‌عمل می‌تواند یا از طریق لیشمانیزاسیون (تلقیح انگل زنده) و یا از طریق واکسیناسیون صورت بگیرد. لیشمانیزاسیون انجام شده در ایران نشان داد که ۸۶/۹ درصد افراد در مقابل ابتلای مجدد به بیماری مصون هستند [۴و۵]، ولی به‌دلیل اشکالات مختلف این روش جز در مناطق و گروه‌های جمعیتی با خطر ابتلای بالا مجوز استفاده ندارد. عدم موفقیت واکسن‌های استفاده شده تاکنون برای ایجاد ایمنی حفاظت‌کننده و مشکلات ناشی از لیشمانیزاسیون نشان می‌دهد که می‌توان با تغییر روش‌ها و استفاده از مواد دفعی – ترشحی مناسب با تقویت سیستم ایمنی و ایجاد محافظت به کنترل بیماری نایل آمد.

مواد دفعی – ترشحی اولین مولکول‌هایی از انگل هستند که سیستم ایمنی با آن‌ها برخورد می‌کند و به علت تولید مداوم در مراحل بعدی سیکل زندگی انگل، در اختیار سیستم ایمنی بدن قرار می‌گیرند. این مواد در تأمین تعادل بین انگل و میزبان، تأمین چرخه زندگی انگل، خنثی کردن پاسخ‌های ایمنی میزبان، تحریک مکانیزم‌های پروتکتیو، کمک به تغذیه انگل از میز بان، جلوگیری از انعقاد خون، تسهیل ورود انگل به میز بان و کمک به فرار انگل از سیستم ایمنی نقش دارند [۶].

در مراحل مختلف چرخه زندگی انگل و نیز در سویه‌های مختلف برخی از انواع مواد دفعی - ترشحی متفاوت هستند. لذا از این مواد در افتراق گونه‌ها و سویه‌ها و تشخیص مراحل مختلف زندگی انگل می‌توان استفاده کرد [۷]. مواد دفعی – ترشحی قسمت اعظم آنتی‌ژن‌های گردشی در خون را تشکیل می‌دهند و در بیماران با نقص ایمنی می‌توان با آنتی‌بادی منوکلونال بیماری را تشخیص داد [۸و۹].

به‌دلیل تأثیر برخی از این مواد در سلول‌ها و بافت‌های میزبان و تخریب آن‌ها، این مواد در پاتو ژنز انگل نقش بازی می‌کنند [۱۰]. با توجه به پیچیدگی و تنوع زیاد مواد دفعی – ترشحی لازم است مطالعات گسترده‌تری در باب شناخت و موارد کاربرد آن‌ها انجام شود.

آنزیم‌های استیل‌کولین استراز به‌طور فعال توسط انگل‌های مختلف ترشح می‌شود [۱۱]. در مطالعات قبلی بجز در لیشمانیا ماژور (L.major) از بقیه گونه‌های لیشمانیا اسید فسفاتاز ترشحی جداشده است [۱۲]. همچنین در محلول رویی محیط کشت لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور، وجود پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی گزارش شده است [۱۳]. واکسیناسیون میزبان با سیستئین پروتئاز Fasciola hepatica نیز باعث کاهش باروری کرم گردیده است [۱۴].

در دو دهه گذشته، مولکول‌های سطحی و پیکره‌ای انگل‌های لیشمانیا مورد توجه محققین بوده، ولی نتایج ایمونیزاسیون با این مواد چندان رضایت بخش نبوده است. با مطالعاتی که روی توکسوپلاسما و برخی تک یاخته‌های دیگر انجام شده، وجود مواد مختلف، از جمله مواد پروتئینی و آنزیم‌ها در مواد دفعی – ترشحی گزارش گردیده و از آن‌ها برای شناسایی اعمال بیولوژیک انگل، تحریک سیستم ایمنی میزبان و روش‌های تشخیصی استفاده شده است [۷].

هدف از این مطالعه، شناسایی آنزیم‌های موجود در مواد دفعی – ترشحی انگل لیشمانیا ماژور در محیط کشت است. در این مطالعه، پروماستیگوت انگل

www.SID.ir

Archive of SID

لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI 1640 بدون FCS کشت داده شد و در مواد دفعی - ترشحی منجر به شناسایی دو آنزیم فعال اسید فسفاتاز و استیل‌کولین استراز گردید.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی به‌کار رفته در این مطالعه فوق‌العاده خالص و در رده آنالیتیکال بوده و از شرکت‌های سیگما و مرک تهیه گردیده‌اند. انگل لیشمانیا ماژور، سویه اصفهان ایران (MRHO/IR/75/ER) از دانشگاه تربیت مدرس بخش ایمونولوژی تهیه و برای تهیه مخزن به موش Balb/c تلقیح گردید و در محیط کشت نیز عبور داده شد.

نحوه کشت انگل

پاساژ سوم از محیط NNN به محیط RPMI 1640 حاوی FCS (۱۰ درصد)، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در دمای ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور یخچال دار کشت داده شد. از پاساژ چهارم برای بررسی مواد دفعی - ترشحی استفاده گردید. پروماستیگوت‌ها پس از سه بار شستشو (با محیط RPMI بدون FCS و آنتی‌بیوتیک) به محیط RPMI بدون آنتی‌بیوتیک و FCS منتقل شد.

در زمان‌های مختلف (۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) نمونه انگل در g ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی از فیلتر ۲۲ /۰ میکرون جهت حذف انگل‌های باقی مانده در محلول رویی عبور داده شد. مواد حاصل به‌عنوان مواد دفعی - ترشحی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها بلا فاصله پس از جمع‌آوری به ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان بررسی در این دما نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان پروتئین در نمونه‌های دفعی - ترشحی

غلظت پروتئین در نمونه‌ها به روش براد فورد [۱۵] با استفاده از کوماسی برلیانت بلو G–250 در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت استیل‌کولین‌استراز

اندازه‌گیری فعالیت استیل‌کولین استراز در نمونه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته المن انجام گرفت [۱۶]. به‌طور خلاصه، یک میلی‌لیتر از مواد دفعی - ترشحی بدون تغلیظ و یا ۲۰۰ میکرولیتر تغلیظ شده به دو میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار pH =۷/۴ حاوی دی‌تیو - دی‌نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) ۰/۴ میلی‌مولار افزوده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترای استیل تیوکولین ۱۵ میلی‌مولار افزوده و پس از مدت ده دقیقه با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر کوئینیدین سولفات ۰/۵ گرم در دسی‌لیتر واکنش متوقف گردید و میزان جذب نمونه‌ها در ۴۱۰ نانومتر قرائت شد.

فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول سوبسترای هیدرولیز شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. جهت تأیید فعالیت کولین استراز از مهارکننده اختصاصی ایسرین [۱۷] استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت اسیدفسفاتاز

جهت اندازه‌گیری فعالیت اسید فسفاتاز از سوبسترای پارانیتروفنل فسفات استفاده شد [۱۸]. به ۲ میلی‌لیتر محلول بافری استات ۱۰۰ میلی‌مولار pH=۴/۵ مقدار یک میلی‌لیتر از مواد دفعی - ترشحی افزوده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۲۷°C با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر پارانیترو فنل فسفات ۱۲۵ میلی‌مولار واکنش شروع و پس از مدت ده دقیقه میزان جذب پارانیتروفنل حاصل در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم براساس میکرومول سوبسترای هیدرولیز شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید. جهت تأیید فعالیت اسید فسفاتاز از مهارکننده تارتارات استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم کولین‌استراز در هموژنه تام پروماستیگوت (همراه سایر نمونه‌ها) مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز ژل اکریل امید (SDS – PAGE)

برای انجام الکتروفورز از روش لاملی استفاده شد [۱۹]. نمونه‌ها با استفاده از دیالیز خشک تغلیظ و سپس توسط ژل جداکننده ۱۲ درصد و تثبیت‌کننده ۶ درصد تفکیک گردید. ژل به مدت ۶ ساعت با استفاده از دستگاه UWR 570 با ولتاژ متغیر با آمپر ثابت ۳۰ میلی‌آمپر الکتروفورز گردید و سپس نمونه‌ها پس از تثبیت باکوماسی بریلیانت بلو و نقره رنگ‌آمیزی شد.

نتایج

در نمونه‌های کشت داده شده تعداد انگل در هر میلی‌لیتر 10^7 انگل شمارش گردید و در RPMI بدون FCS و آنتی‌بیوتیک، تعداد انگل تقریباً ثابت بود.

همچنان‌که در جداول مشاهده می‌شود، پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور پس از انتقال از محیط کشت RPMI 1640 حاوی سرم گوساله به محیط کشت عاری از سرم گوساله، پروتئین‌هایی را به محیط ترشح می‌کند. میزان پروتئین‌های دفع شده نسبت به زمان افزایش نشان داد و این افزایش پس از۲۴ ساعت اولیه تقریباً تثبیت گردید. بر عکس، فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز تا۲۴ ساعت اولیه افزایش و از این زمان به بعد کاهش یافت (جدول ۱).

فعالیت اسید فسفاتاز در۶ ساعت اول به حداکثر مقدار خود رسید که این افزایش نسبت به زمان صفر معنادار بود ($p<0.01$) و از این زمان به بعد، فعالیت آنزیم شروع به کاهش کرد (جدول ۲). مطلب جالب توجه، فعالیت ویژه هر دو آنزیم است. فعالیت ویژه هر دو آنزیم پس از ۶ ساعت اول که به حداکثر مقدار خود می‌رسد نسبت به زمان سیر نزولی دارد (شکل ۱). این پدیده گویای این مطلب است که در زمان‌های طولانی‌تر از ۲۴ ساعت ممکن است پروتئین‌های دیگری نیز علاوه بر این پروتئین‌ها ترشح شوند و یا این‌که نسبت به زمان، فعالیت این آنزیم‌ها به‌علت تجزیه توسط پروتئازها و یا دناتوره شدن در محیط کشت کاهش یابد. همچنان‌که در شکل ۲ نشان داده می‌شود در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، سه باند پروتئینی با اوزان مولکولی حدود ۱۳۰، ۱۱۰ و ۷۵ کیلو دالتونی قابل تشخیص است. به احتمال زیاد، باندهای مشاهده شده مربوط به اسید فسفاتاز ترشحی هستند. در صورتی‌که در زمان صفر هیچ باند پروتئینی مشاهده نشده است. لازم به ذکر است نتایج ارائه شده در جداول، میانگین چهار آزمون متفاوت است.

جدول ۱ فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در مایع دفعی- ترشحی انگل لیشمانیا ماژور*

زمان جمع‌آوری (ساعت)	میزان پروتئین دفع شده (micro gram/ml)	فعالیت آنزیم (nano mol/L)	فعالیت ویژه آنزیم (nano mol/mg protein)
صفر	۱/۳ ± ۰/۰۵	۸۰۳ ±۲۰۲	۲۰۳ ± ۴۶
۶	۵/۲ ± ۲/۱۹	۱۳۱۰ ± ۱۹۳	۵۰۰ ±۲۸**
۱۲	۶/۳ ± ۱/۷۰	۱۳۰۰± ۵۷	۳۳۶ ±۳۵
۲۴	۹/۳ ± ۱/۳۰	۱۵۰۰± ۵۴	۳۰۰ ± ۶۲
۴۸	۱۰/۵ ± ۱/۱۰	۱۴۹۰ ± ۱۰۶	۱۹۰ ± ۱۱
۷۲	۱۱ ± ۲/۸۰	۱۳۷۰ ± ۱۳۲	۱۴۶ ± ۱۴

* داده‌های جدول میانگین و انحراف معیار تکرار چهار آزمون مختلف در شرایط یکسان است.

** افزایش فعالیت آنزیم در ۶ ساعت نسبت به زمان صفر معنادار است ($p<0.01$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در مایع دفعی-ترشحی انگل لیشمانیا ماژور*

زمان جمع‌آوری (ساعت)	میزان پروتئین دفع شده (micro gram/ml)	فعالیت (nano mol/L)	فعالیت ویژه (nano mol/mg protein)
صفر	۱/۳ ± ۰/۰۵	۳۰۹ ±۲۲	۲۴۰ ± ۴۹
۶	۵/۲ ± ۲/۱۹	۱۰۶۰± ۱۸	۴۹۸ ±۹۸**
۱۲	۶/۳ ± ۱/۷۰	۱۰۴۰ ± ۷۰	۲۵۶ ± ۷۱
۲۴	۹/۳ ± ۱/۳۰	۱۰۲۰ ± ۵۴	۲۲۷ ± ۵۱
۴۸	۱۰/۵ ± ۱/۱۰	۹۷۰ ± ۱۴	۱۵۰ ± ۵۰
۷۲	۱۱ ± ۲/۸۰	۹۵۰ ± ۹۰	۹۴ ± ۲۹

* داده‌های جدول میانگین و انحراف معیار تکرار سه آزمون مختلف در شرایط یکسان است

** فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز پس از ۶ ساعت نسبت به زمان معنادار است ($p<0.01$)

شکل ۱ فعالیت ویژه آنزیم‌های اسیدفسفاتاز و استیل‌کولین استراز در مایع دفعی - ترشحی نسبت به زمان دایره‌های تو پر (•) نشانگر فعالیت اسید فسفاتاز و مربع‌های تو پر (•) استیل‌کولین استراز است.

* داده‌ها میانگین چهار آزمون است.

شکل ۲ الکتروفورز SDS-PAGE مواد دفعی-ترشحی انگل لیشمانیا ماژور رنگ‌آمیزی شده به روش نقره: S مربوط به وزن‌های مولکولی استاندارد، زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت مربوط مواد دفعی-ترشحی جمع‌آوری شده در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت در محیط کشت عاری از سرم است. زمان ۲۴ ساعت تکرار دو آزمایش متفاوت است. وزن‌های مولکولی به ترتیب از بالا به پایین عبارتند از: میوزین (205 KD)، بتا گالاکتوزیداز (116 KD)، گلیکوژن فسفریلاز (98 KD)، آلبومین سرم کاو (66 KD)، اوآلبومین (45KD)، لاکتات دهیدروژناز (35 KD) و لیزوزایم (14.3 KD).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

عدم موفقیت نتایج تحقیقات سه دهه گذشته بر روی انواع واکسن‌های کشته شده (نسل اول) و نوترکیب (نسل دوم) لیشمانیا ایجاب می‌کند که درتحقیقات جدید برای ایجاد ایمنی محافظت‌کننده از مواد دیگری غیر از مولکول‌های ساختاری که تاکنون به‌کار رفته استفاده شود [۲۰]. استفاده از مواد دفعی ـ ترشحی در انگل‌های کرمی برای تحریک سیستم ایمنی میزبان وهمچنین کاهش بار کرمی و یا کاهش تعداد تخم تولید شده موفقیت‌آمیز بوده است [۱۴]. شناسایی مواد دفعی ـ ترشحی درتک یاخته‌هایی مثل توکسوپلاسما و استفاده از آن‌ها درتحریک ایمنی میزبان و آزمون‌های سرولوژیکی تشخیصی، اهمیت این مواد را مورد تأکید قرار می‌دهد [۲۱و۲۲].

در این مطالعه، برای اولین بار از مواد دفعی – ترشحی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور، آنزیم اسید فسفاتاز و استیل‌کولین استراز شناسایی گردید. داده‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که افزایش پروتئین در مواد دفعی – ترشحی متناسب با فعالیت آنزیم‌های مترشحه نسبت به زمان نیست. با وجود این‌که آنزیم‌های اسید فسفاتاز و استیل‌کولین استراز به ترتیب در ساعت‌های ۶ و ۲۴ ساعت حد اکثر فعالیت خود را داشتند، میزان پروتئین در مواد دفعی – ترشحی تا ۷۲ ساعت افزایش نشان می‌داد. با اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم‌های فوق نشان داده شد با وجود این‌که فعالیت آنزیم‌ها در ساعات اولیه افزایش می‌یابد، ولی فعالیت ویژه نسبت به زمان کاهش دارد.

یافته‌های فوق ممکن است به علل زیر باشد:

نسبت به زمان، پروتئازها آنزیم‌های فوق را تجزیه می‌کند و فعالیت آنزیم‌ها کاهش می‌یابد یا این‌که خود آنزیم‌ها به علت دناتوره شدن فعالیت خود را از دست می‌دهند.

فرضیه سوم این است که:

همراه این آنزیم‌ها سایر پرو تئین‌ها بعد از ساعات اولیه ترشح می‌شوند.

فرضیه‌های ذکر شده و همچنین احتمال ایمنی‌زایی این پروتئین‌ها توسط محققین این مرکز در دست مطالعه و بررسی است.

در تحقیقات گذشته، جداسازی مواد دفعی – ترشحی پروماستیگوت لیشمانیا توسط سانتریفیوژ انجام می‌گرفت و محققین چنین تصور می‌کردند که مایع رویی فاقد انگل است [۱۲و۱۳]. در صورتی که در این مطالعه ما با استفاده از سانتریفیوژ در دوره‌های مختلف (حتی تا g ۲۵۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد) در مایع رویی پرو ماستیگوت مشاهده کردیم، وجود انگل در مایع رویی به علت متحرک بودن پرو ماستیگوت‌ها است که به هر حال مایع رویی حاوی انگل است. در این مطالعه، پس از سانتریفیوژ، محلول رویی از فیلترهای ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا مایع دفعی – ترشحی عاری از انگل باشد.

منابع

1. W.H.O. 2000. Information fact sheet number 116 revised.

2. World Health organization. Control of the Leishmaniasis, Technical report series. (1990), 793: 47-65.

۳. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت امور بهداشتی، اداره کل پیشگیری و مبارزه با بیماری‌ها، دستورالعمل مبارزه با بیماری لیشمانیوز در کشور، گزارش سالانه ۲۱-۱، (۱۳۷۸).

۴. محمودزاده ع، محقق حضرتی ص، ثباتی ح، فقیه‌زاده س. ارزشیابی لیشمانیزاسیون در نیروهای مسلح، مجله پزشکی کوثر (زمستان ۱۳۷۶).

5. Nadim A., and Javadian E., Mohebali M. The experince of Leishmanization in the Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranian Health Journal. (1997), 3(2): 284-9.

۶. محمودزاده ع، مهرانی ح ع. کاربرد روش‌های مولکولی در انگل‌شناسی تحلیلی مؤسسه انتشاراتی گوهر منظوم تهران (۱۳۷۹) ص ۹۷.

۷. محمودزاده ع، عبداللهی ح، دلیمی اصل غ‌ح، زوران الف. ارزیابی روشن الایزای نقطه‌ای با استفاده از آنتی ژن‌های‌دفعی– ترشحی‌برای‌تشخیص توکسوپلاسموزیس دورت. مجله‌علوم‌پزشکی‌مدرس ۱۳۷۹. ۳ (۱) ص ۴۷-۵۳.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Sarkari B., Chance M., and Hommel M. Antigenuria in visceral Leishmaniasis: detection and partial charaterisation of a carbohydrate antigen. Acta tropica (2002), 82: 339-348.

9. Hafid J., Tran M., Raberin H., Akono Z.Y., Pozzetto B. and Jana M. Detection of circulating antigens of Toxoplasma gondii in human infection. Am. J. Trop. Meal. Hyj, (1995), 52: 336-339.

10. North MJ. Cysteine endopeptidases of Parasitic protozoa In: Barrett AJ (ed) proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Academic press san Diego (1994) pp 523-539.

11. Lawrence CE., and Pritchard DI. Differential secretion of acetylcholinesterase and proteases during The development of Heligmosomoides polygyrus. Int G Parasitol (1993), 23(3): 309- 314.

12. Ilg T. Proteophosphoglycans of Leishmania. Parasitology Tody (2000), 16 (11): 489-497.

13. Aminlari M., Ardehali S., and Taherian H. Detection of 63 Kda protein in the culture supernatant of Leishmania tropica and Leishmania major promastigotes. Iraian Journal of medical sciences (2001), 26 (1&2):74-76.

14. Wijffels GL., Salvatore L. Dosen M., Waddington J., willson L., Thompson C., Camphell N. , Sexton J., Wicker J. , Bowen F., Friedel T., and Spithill TW. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of Fasciola hepatica decreases worm fecundity. EXP Parasitol (1994), 78:132 – 148.

15. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. (1976), 72: 248-254.

16. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Anders, V., and Featherstone, R., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharm. (1961), 7: 88-95.

17. Stojan J., and Zorko, M., Kinetic characterization of all steps of the interaction between acetylcholinesterase and eserine. Biochemica et Biophysica Acta (1997), 1337: 75-84.

18. Burtis C.A., and Ashwood E.R., Tietz Text Book of clinical chemistry. (1999), Saunders company, Philadelphia,PP 713-714.

19. Laemmli, U.K., Cleavage of strutural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (1970), 227: 680-685.

۲۰. فتاحی بافقی ع، ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی بر ضدمولکول‌های LPG و GP 63 تخلیص شده از L.major در موش Balb/c و بیماران انسانی بهبود یافته و بهبود نایابنده، رساله دکتری (Ph.D) انگل شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس – دانشکده علوم پزشکی (پاییز ۱۳۸۲). ص. ۲۸-۳۱.

۲۱. دریانی الف، مطالعه پاسخ‌های ایمنی سلولی فراکشن‌های حاصل از آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی تاکی زوئیت توکوپلاسما گوندیی در مدل موشی، رساله دکتری (Ph.D) انگل شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس – دانشکده علوم پزشکی (بهار ۱۳۷۹).

22. Cibrelus, P. Secreted antigens of the amastigote and promastigote form of Leishmania infantum inducing a humoral response in humans and dogs. Parasite (1999), 6(2): 121-4.

www.SID.ir