Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
سال یازدهم ، شماره دوم ، تابستان ۱۳۸۲ ، ص ۶۰

تخلیص وشرح ویژگیهای ساختاری گلیکو کنژوگه اصلی ، لیپوفسفوگلیکان (LPG)ازانگل لیشمانیا .ل ماژور سویه ی ایران (MRHO/IR/75/ER)

علی فتاحی بافقی[۱] ، دکتر احمد زواران حسینی[۲] ، دکتر عبدالحسین دلیمی اصل[۳] ، دکتر عباس محمودزاده پورناکی[٤] ، دکتر فاطمه غفاری فر[٥]

چکیده

سطح سلولی تک یاخته جنس لیشمانیا را دو رده پادگنی عمده، گلیکو پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی (GP63) و گلیکو کنژوگه همگون لیپو فسفوگلیکان (LPG) تشکیل می دهد . تجمع فزاینده مولکولهای ویرولانتی چون LPG است که به عنوان لیگاند برای یاخته های پستانداران پس از انتقال به بدن آنان و تبدیل به فرم داخل سلولی (جسم لیشمن) عمل می کند. لیپوفسفوگلیکان گیرنده اصلی برای ماکروفاژهاست که حاوی ۸۱٪ کربوهیدرات ، ۱۷٪ فسفات و ۱/۴٪ لیپید می باشد و نشان داده شده که یک مولکول مناسب برای برانگیختن دستگاه ایمنی میزبان است . این پژوهش مطالعه ای بنیادی - کاربردی است که از مهر ۱۳۸۰ تا خرداد ۱۳۸۱ با کشت ۵ میلیارد (۵×۱۰^{۹}) لپتومونادهای Leishmania (L) Major سویه خاص ایران یعنی (MRHO/IR/75 /ER) به انجام رسید (RPMI 1640 Sigma غنی شده). کار جمع آوری ، تغلیظ و تخلیص مولکول LPG از پیکره انگل لیشمانیا برای نخستین بار در ایران انجام شد و راههای شناسایی و خلوص آن با هدف به کارگیری آن در طراحی یک واکسن مناسب و کار برضد طیف گسترده ای از بیماری های لیشمانیوزی مورد بررسی قرار گرفت . نتایج نشان داد که روش استفاده از ستون اکتیل -سفاروز می تواند به میزان زیادی LPG را با درصد خلوص بالا تولید نماید.

واژه های کلیدی: لیشمانیا.ل.ماژور، لیپوفسفو گلیکان (LPG)، تخلیص

مقدمه

لیشمانیوز طیف وسیعی از علایم بالینی را بروز می دهد و جزء ده بیماری مهم دنیاست که عامل آن یک تک یاخته انگلی و درون سلولی اجباری از زیر جنس لیشمانیا می باشد و عمدتاً به چهار شکل بروز می کند :

لیشمانیوز پوستی (سالک شهری - روستایی) ، لیشمانیوز احشایی (کالا آزار)، لیشمانیوز جلدی - مخاطی و لیشمانیوز پوستی منتشر. فرم خارج سلولی آن در روده میانی پشه خاکی تکثیر می یابد که نزدیک به ۳۰ گونه پشه خاکی قادر به انتقال انگل می باشند . شکل داخل سلولی آن (آماستیگوت) در ماکروفاژهای مهره داران زندگی می کند و در اکثر موارد حیوانات اهلی (مثل سگ) و وحشی (مثل جوندگان) مخزن

۱ - دانشجوی دوره دکترای انگل شناسی
۲- دانشیار گروه ایمونولوژی
۳- استاد گروه انگل شناسی
٤- دانشیار گروه انگل شناسی
٤- استادیار گروه انگل شناسی
۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد.
۵و۳و۲- دانشگاه تربیت مدرس تهران
٤- دانشگاه علوم پزشکی حضرت بقیه الله (عج) تهران

www.SID.ir

Archive of SID

عفونت (زونوز) بوده و گاهی انسان خود به عنوان مخزن عمل می کند. (آنتروپونوتیک) [۱،۶].

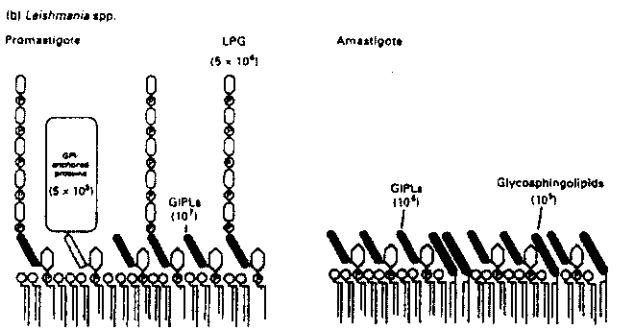
از سال ۱۹۹۳ میلادی به بعد کانونهای بومی لیشمانیوز گسترش و شمار افراد مبتلا فزونی یافته است. هم اکنون یک دهم جمعیت جهان در معرض خطر بیماری و سالیانه دو میلیون مورد جدید از ۸۸ کشور دنیا (۶۶ کشور در دنیای قدیم (کشورهای واقع در قاره های آسیا، آفریقا و اروپا) و ۱۲ کشور در دنیای جدید (کشورهای واقع در قاره آمریکا) گزارش می شود. ۵۰۰/۰۰۰ مورد جدید کالا آزار که در دنیا گزارش می شود که از ۵ کشور بنگلادش، برزیل، هند، نپال و سودان است. ۹۰ درصد موارد سالک که در دنیا گزارش می شود از افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه است. انتشار جغرافیایی لیشمانیوز بیشتر مرتبط به عوامل توسعه از جمله مهاجرت از روستا به شهر و طرحهای صنعتی – کشاورزی بوده و افزون بر آن بیماریهای ناتوان کننده دستگاه ایمنی (مشخصاً ایدز) در این میان نیز نقش بارزی را ایفا می کنند، کما اینکه عفونت مشترک ایدز – لیشمانیوز بسیار خطرناک بوده و در اکثر موارد منجر به مرگ زودرس بیماران می شود و این معضلی است که خطر مرگ و میر افراد مبتلا به کالا آزار یا ایدز را ۱۰۰۰-۱۰۰ برابر افزایش می دهد [۱،۶،۷،۸]. در ایران نیز وضعیت لیشمانیوزطی دو دهه گذشته رو به افزایش بوده به نحوی که تقریباً لیشمانیوز پوستی (سالک روستایی – شهری) از همه جای کشور گزارش شده و کانونهای جدید افزون بر کانونهای قدیمی (مثل استان خوزستان) اضافه شده است. لیشمانیوز احشایی دست کم در چهار استان اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر بومی و از سایر مناطق کشور تک گیر گزارش می شود [۹].

همه ی تلاشهایی که در زمینه کنترل لیشمانیوز با طراحی انواع واکسنهای نسل اول، دوم و سوم صورت گرفته با شکست مواجه شده و تا به حال هیچکدام از پژوهشها منجر به نتیجه مطلوب نشده است و از طرفی زیست شناسی مولکولی تک یاخته تاژکدار جنس لیشمانیا هر روز جنبه های بیشتری از ویژگیهای پادگنی این انگل را نشان می دهد [۸]. از جمله اینکه گلیکوکنژوگه عمده سطح Leishmania . L. Major که گیرنده اصلی برای ماکروفاژها می باشد ماکرو مولکولی مرکب از کربوهیدرات (۸۱ درصد)، فسفات (۱۷ درصد) و لیپید (۱/۴ درصد) بنام لیپو فسفو گلیکان (LPG) است. از جمله هدفهای ما در این بررسی معرفی یک روش دقیق و کارآ برای تخلیص مولکول LPG به طور طبیعی از غشای سیتوپلاسمی انگل و سپس تهیه مقدار متنابهی از این مولکول برای طراحی واکسن مناسب می باشد که مجموعه ای از چند مولکو انگل همراه یا بدون ادجوانت های خاصی تهیه می شود (شکل ۱).

واکسیناسیون موشهای آزمایشگاهی با LPG تخلیص شده از Leishmania.L. Major در لیپوزوم ها بر ضد لیشمانیوز پوستی مقاومت ایجاد کرده است [۱۰].

LPG حاوی بیش از نیمی از کربوهیدراتهای انگل لیشمانیا است و واحدهای تکراری آن دی ساکاریدهای فسفریله شده است که میانگین این واحدها ۱۶ عدد و همگی به وسیله پیوندهای α- glycosidic به هم متصل شده اند [۱۱].

سطح میانگین سلولی تک یاخته انگلی جنس لیشمانیا را دو رده پادگنی عمده به نامهای گلیکو پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی (GP_{63}) و گلیکوکنژوگه همگون لیپوفسفوگلیکان (LPG) تشکیل می دهد. این دو پادگن در چرخه زندگی انگل، مجرای گوارشی پشه خاکی و فاگولیزوزوم ماکروفاژ پستانداران، نقش عمده و حیاتی دارند به طوری که هر دو به گیرنده های روی ماکروفاژ متصل و پروماستیگوتها را به داخل ماکروفاژ هدایت می کنند. مطالعات ایمن شناسی و بیوشیمیایی آشکار نموده است که GP_{63} در اکثر



شکل ۱ : مقایسه ای مولکول لیپوفسفو گلیکان (LPG) در سطح یاخته انگل لیشمانیا در مراحل مختلف تکاملی آن

www.SID.ir

Archive of SID

گونه ها ساختار ثابتی دارد ولی LPG ساختار متفاوتی به خود گرفته و برای مطالعات سروتیپ لیشمانیا به کار می رود . روش اتصال GP_{63} و LPG به غشای پلاسمایی به شیوه ی فسفولیپید گلیکوزیل است که این شیوه اتصال در تک یاخته ها معمول می باشد [۱۲].

در یک بررسی ، لنفوسیتهای موشها با فرگمنتهای مختلف LPG واکسینه شدند و دیده شد که تحریک T-cell ها مرتبط با ساختار هسته LPG بوده تا ساختار تکرار شونده فسفوگلیکان و لیپید ، برآورد شده است که تقریباً $۱/۲۵ \times ۱۰^{۶}$ مولکول LPG بر روی یک پروماستیگوت لیشمانیا وجود داشته باشد [۱۳].

LPG به همراه GP_{63} و GLP در سطح پروماستیگوت یک گلیکوگالیک متراکمی است که همه سطح انگل حتی تاژک را می پوشاند و بر روی پروماستیگوت ها خیلی بیشتر از آماستیگوتها می باشد و برای بقای آنها در داخل ماکروفاژها حضور LPG ضروری است. LPG از اتصال فاگوزوم که همان واکوئل پازاتیوفوروس است با اندوزوم جلوگیری می کند و به طور قدرتمندی رادیکالهای هیدروکسیل و آنیون های سوپر اکسید NADPH اکسیداز را حین فاگوستیوز مصرف می کند. همچنین LPG به همراه GP_{63} با جمع آوری رادیکالها ، آماستیگوتها را از کشته شدن حفظ می کند و با غیرفعال کردن آنزیم های فاگوزومی، دگرانوله شده و از طریق سد کردن اتصال فاگوزوم با لیزوزوم ، زمینه ی ابقای انگل را در داخل ماکروفاژ فراهم می کند [۱۴].

روش بررسی

این پژوهش مطالعه ای بنیادی - کاربردی است که از مهر ۱۳۸۰ تا خرداد ۱۳۸۱ توسط گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران طی سه مرحله به انجام رسید:

۱-تهیه، کشت، تغلیظ و جمع آوری انگل Leishmania. L . Major سویه خاص ایران : L . L . Major یعنی MRHO/IR/75/ER را با برداشت طحال و غدد لنفاوی موش مخزن انگل (Balb/c) و قطعه قطعه کردن آن در محیط تک فاز RPMI – 1640 (Sigma) ریخته و به محیط دو فاز (NNN) منتقل نمودیم و در دمای $۲۵ \pm ۱ ^{o}C$ به مدت ۷۲-۴۸ ساعت نگهداری و پس از آن با دور 150g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی (Supernatant) که حاوی انگل است جمع آوری و جهت تکثیر انبوه به محیط RPMI – 1640 (Sigma) که حاوی ۲۰-۱۵ درصد سرم جنین گاوی FCS (Sigma) می باشد منتقل شد و باشمارش روزانه انگل زمانی که تعداد آن در هر سی سی به میزان مناسب رسید ، با استفاده از بافر فسفات سدیم (PBS) ۰/۱۵ مولار (Ph=7.2) سه مرتبه آن را با دور 2000g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و شستشو داده و تا رسیدن به میزان لازم ، رسوبهای حاوی لپتوموناد‌های لیشمانیا را یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد ، ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ – درجه سانتی گراد و ۴-۳ ماه در دمای $۷۰ ^{o}C$- نگهداری نمودیم که این مراحل مرتباً تکرار شد تا به تعداد ۵×۱۰^{۹} (۵ میلیارد) لپتوموناد در مرحله لگاریتمی رسیدیم [۱۵] و با توجه به اینکه بر روی سطح هر انگل لیشمانیا درمرحله لپتوموناد $۱/۲۵ \times ۱۰^{۶}$ کپی از LPG وجود دارد بنابراین با بکارگیری ۵ میلیارد لپتوموناد چیزی حدود $۶/۲۵ \times ۱۰^{۱۵}$ LPG استحصال شد و این کمترین تعداد لپتومونادی بود که می بایستی برای تهیه LPG خالص جهت طراحی واکسن کشت داده می شد.

۲-آزاد سازی، استخراج و تخلیص لیپوفسفوگلیکان (LPG)

لپتوموناد‌های فرم لگاریتمی ذخیره شده به میزان ۵×۱۰^{۹} از دمای $۷۰ ^{o}C$- بیرون آورده شد و هنگامی که به دمای اتاق رسید همه را در یک ظرف ریخته و با استفاده از PBS ۵۰ میلی مولار محتوی Nacl ۰/۱۷ (PH=7.3) دو مرتبه با دور 2000g به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده و سپس با استفاده از محلول حاوی کلروفرم / متانول / آب به ترتیب با نسبت (۴ : ۸ : ۳) استخراج و مایع رویی کنار گذاشته شد و رسوب حاصل دوبار و هر بار به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در حالی که با بهم‌زن مغناطیسی و مگنت به هم زده می شد با آب اشباع از ۱- بوتانول مخلوط شد . پس از آن مواد غیر محلول آن طی سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه و با دور 10/000g جدا گردید و مایع رویی (Supernatant) جمع آوری و لیوفیلیزه شد. پس از لیوفیلیزه ، مواد حاصل با کلروفرم / متانول به نسبت (۱: ۲) شستشو

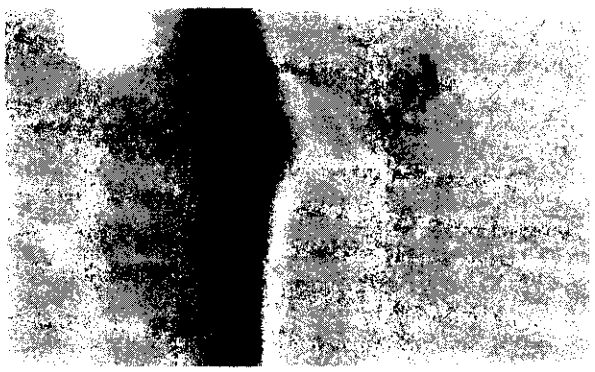
www.SID.ir

Archive of SID

داده شد. آخرین مرحله تخلیص مواد رسوب یافته از این شستشو بایستی با انجام کروماتوگرافی روی ستون اکتیل – سفاروز Octyl- Sepharose (Pharmacia) انجام گیرد.

۳- انتقال بر روی ستون اکتیل سفاروز جهت خلوص و اثبات آن : ستونی به ارتفاع ۱۵cm و قطر ۲/۵cm (۲/۵×۱۵ cm) تهیه و اکتیل – سفاروز بر روی آن قرار گرفت. ابتدا رسوب نهایی در بافر ۰/۱ مولار ۲- [تریس (هیدروکسی متیل) آمینو] اتان سولفانات (تی ای اس) با PH=7 محتوی ۵ درصد ۱- پروپانول (حجم / حجم) حمل و به تدریج بر روی ستون سوار شد. برای خالص سازی نهایی LPG در مرحله اول با جریان عبوری ۴ میلی متر در ساعت به تعداد ۷۰ فرکشن هر کدام ۳ میلی متر و جمعاً طی ۵۲ ساعت ، کلیه مولکولها به جز LPG از روی ستون اکتیل – سفاروز به کمک دستگاه Fraction–Collector–100 (Pharmacila . Biotech) و با استفاده از بافر TES با PH=7 خارج شدند.

در مرحله دوم که مولکولهای LPG در ستون اکتیل سفاروز باقی مانده بودند ، یک دستگاه Gradian – Maker تهیه شد که متشکل از دو استوانه هرکدام به قطر ۲/۵ cm و مرتبط با هم که یکی فقط خروجی و دیگری ورودی – خروجی دارد و در داخل اولی ۱-پروپانول ۷۰ درصد و در دومی ۱-پروپانول ۵ درصد می باشد و این دستگاه بر روی چرخاننده مغناطیسی بوده که مگنت داخل ستون دوم دستگاه Gradian – Maker است که. ۱-پروپانول از ۷۰-۵ ٪ را به کمک پمپ بر روی ستون اکتیل – سفاروز می ریخت . به این ترتیب با سرعت ۱۲ میلی متر در ساعت ، کل LPG ها داخل ستون را با استفاده از دستگاه Fraction–Collector 100 (Pharmacia. Biotech) شسته و ۹۴ فرکشن هر کدام حاوی ۳ میلی متر جمع آوری شد [۴،۱۰،۱۶،۱۷]. پس از آن برای مشخص شدن تعداد احتمالی Peak ها در فرکشن های غیر LPG و LPG میزان جذب نور (OD) آنها با دستگاه اسپکتوفتومتر Super 9200 (CECIL aquanus 9000 Series) خوانده شد و در نهایت از Peak فرکشن هایی که در شستشوی LPG به دست آمده بود Peak ادامه بافر TES بوده و Peak آخر نیز ۱- پروپانول با غلظت بالا بود و بقیه Peak ها جمع آوری و لیوفیلیزه شد. در مجموع از ۵ میلیارد لیپوموناد فرم لگاریتمی حدود ۱ گرم LPG خالص تهیه شد که برای اثبات خلوص آن ابتدا یک کروماتوگرافی روی سفادکس G – 150 به همراه متانول سرد و سپس یک SDS – PAGE انجام گرفت که در ستون اول ژل با نقره رنگ آمیزی شده که ماده اولیه بوده و بیانگر وجود پروتئین در LPG است و ستون دوم و سوم با PAS رنگ می شود که بیانگر وجود کربوهیدراتها و LPG و خلوص آن است [۱۸] (شکل ۲) .



شکل ۲ : ژل پروفایل لیپوفسفو گلیکان (LPG) خالص شده با ژل پروفایل استاندارد که پس از کروماتوگرافی روی سفادکس G-۱۵۰ و رسوب در متانول سرد، LPG برای SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

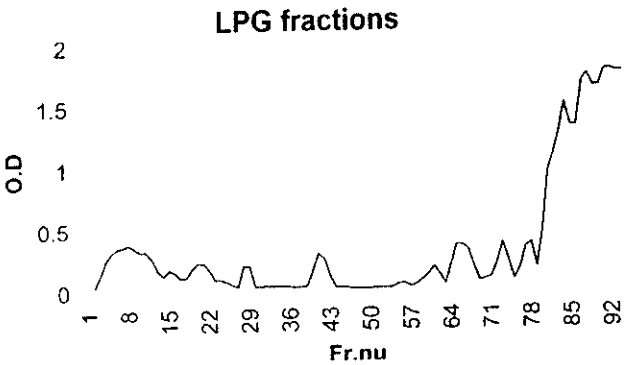
در مجموع از ۵ میلیارد لیپوموناد فرم لگاریتمی نزدیک به ۱گرم لیپوفسفوگلیکان تهیه شد که در وهله اول خروجی ۷۰ فرکشن هر کدام ۳ میلی متر و جمعاً در ۵۲ ساعت مربوط به همه مولکولها به جز LPG بود که جذب نوری آنها در جدول و نمودار (۱) نشان داده شده است و در وهله دوم با استفاده از بافر Elute تمام مولکولهای LPG از روی ستون اکتیل سفاروز شسته و به ۹۴ لوله منتقل شدند که جذب نوری آنها در جدول و نمودار(۱) نشان داده شده است. برای اثبات خلوص فرکشن های LPG پس از انجام کروماتوگرافی روی سفادکس G-150 و سانتریفوژ با متانول سرد از رسوب آن ، یک SDS – PAGE انجام و ژل در ستون اول با نقره رنگ آمیزی شد (جهت نشان دادن حضور پروتئین به میزان خیلی کم) و در ستون دوم و سوم با

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ آمیزی بویود یک اسید شیفت (PAS) رنگ شد برای نشان دادن حضور بسیار زیاد کربوهیدرات (۸۱٪) در مولکول LPG . ژل پروفایل LPG خالص شده در هر دونوع رنگ آمیزی با ژل پروفایل استاندارد در شکل (۲) مقایسه شده است . نتایج نشان داد که استخراج LPG از پیکره انگل لیشمانیا با روش استفاده با ستون اکتیل سفاروز می تواند میزان زیادی LPG با درجه خلوص بالا تولید نماید.

Salvator و همکاران نیز ۱۰ لیتر از محیط کشت حاوی پروماستیگوتهای لیشمانیا (حدود 10^{11} لپتوموناد) را برداشته و پس از شستشو با PBS ۲۵۰cc با PH= 7.2 برای استخراج به شرح زیر عمل کردند. دو بار با محلول کلروفرم / متانول/ آب (۳:۲:۱)، چهار بار با کلرید منیزیم ۴ مولار و سه بار کلروفرم / متانول / آب (۱:۱:۳) در دمای ۴ درجه شستشو دادند و در نهایت محصول حاصل را با ۱۵ cc از محلول آب / اتانول / دی اتیل اتر / پیریدین (۰/۱۷:. ۱ : ۵: ۱۵: ۱۵) در دمای ۴ درجه مخلوط و سپس آن را با بخار تحت فشار خشک نموده و پس از عبور دادن از ستون سفادکس (G-150) ، لیوفیلیزه و نمک زدایی نمودند که در مقایسه با روش انجام شده به دلیل اینکه ما از ستون حاوی اکتیل سفاروز (Octyl – Sepharose, Pharmacia) که بسیار اختصاصی عمل می کند استفاده نمودیم که در وهله اول کلیه مولکولها را بجز مولکول LPG از ستون شسته و عبور می دهد و در وهله دوم با استفاده از بافر مخصوص (Elute Buffer) فقط مولکولهای LPG از ستون کنده و استخراج می شوند.



نمودار ۱ : میزان جذب OD و فرکشن های مولکولهای غیر (LPG)

جدول ۱ : میزان جذب (OD)و فرکشن های لیپوفسفوگلیکان (LPG)

میزان جذب	فرکشن	میزان جذب	فرکشن
۰/۰۳۵	۱	۰/۰۰۳	٤٨
۰/۰۵۲	۲	۰/۰۰۵	٤٩
۰/۲۲۵	۳	۰/۰۰٦	٥٠
۰/۲۷۸	٤	۰/۰۱۲	٥١
۰/۳۵۵	٥	۰/۰۱۱	٥٢
۰/۳٤۰	٦	۰/۰۱۳	٥٣
۰/۳۷۲	۷	۰/۰۱٤	٥٤
۰/۳۷۹	۸	۰/۰۷۰	٥٥
۰/۳۰۸	۹	۰/۰۱۲	٥٦
۰/۳۲٦	۱۰	۰/۰۱۷	٥٧
۰/۳۱۰	۱۱	۰/۰۵۱	٥٨
۰/۲۰۹	۱۲	۰/۰۸۵	٥٩
۰/۱۲۲	۱۳	۰/۱۳٦	٦٠
۰/۱۲۰	۱٤	۰/۲۰۲	٦١
۰/۲۱۹	۱٥	۰/۲۷۳	٦٢
۰/۰۷۲	۱٦	۰/۳٦۸	٦٣
۰/۱۲۷	۱۷	۰/۳٤٥	٦٤
۰/۰۸۵	۱۸	۰/۳٦۲	٦٥
۰/۲٦۳	۱۹	۰/۳۳۲	٦٦
۰/۱۷٥	۲۰	۰/۲۹٥	٦۷
۰/۲٥۲	۲۱	۰/۰٥۳	٦۸
۰/۰۷٥	۲۲	۰/۰٥٦	٦۹
۰/۰۹۳	۲۳	۰/۰۸۰	۷۰
۰/۰۷٦	۲٤	۰/۰۹۱	۷۱
۰/۰٥٤	۲٥	۰/۲۹٥	۷۲
۰/۰۲۸	۲٦	۰/٤۳۲	۷۳
۰/۰۲٥	۲۷	۰/۱۳۷	۷٤
۰/۰۳٦	۲۸	۰/۱۱۳	۷٥
۰/۰۲۱	۲۹	۰/۱۸۸	۷٦
۰/۰۲٥	۳۰	۰/٤٦٦	۷۷
۰/۰۲۷	۳۱	۰/۲٦۲	۷۸
۰/۰۳۰	۳۲	۰/۰٦۲	۷۹
۰/۰۲٤	۳۳	۰/۸۸۰	۸۰
۰/۰۳۲	۳٤	۱/۰۱۲	۸۱
۰/۰۲۸	۳٥	۱/۱٥٥	۸۲
۰/۰۲۰	۳٦	۱/۳٦۸	۸۳
۰/۰۱۸	۳۷	۱/٦٦۰	۸٤
۰/۰۲٥	۳۸	۰/۹۹۰	۸٥
۰/۰۲۹	۳۹	۱/٦٤۰	۸٦
۰/۰۲۸	٤۰	۱/۷٤۰	۸۷
۰/۰۳۰	٤۱	۱/۷٥۰	۸۸
۰/۰۱۹	٤۲	۱/٥٥۰	۸۹
۰/۰۱٦	٤۳	۱/۷٦۰	۹۰
۰/۰۱۸	٤٤	۲/۸۰۰	۹۱
۰/۰۱۳	٤٥	۱/۷٦۸	۹۲
۰/۰۱٥	٤٦	۱/۷٥٦	۹۳
۰/۰۰۲	٤۷	۱/۷۸۰	۹٤

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

این مطالعه با هدف تخلیص فراوان ترین مولکول پایدار در همه مراحل زندگی انگل لیشمانیا (LPG) ، از طریق تکثیر، تغلیظ و آزاد سازی ۵ میلیارد فرم لپتوموناد لگاریتمی به انجام رسید . ستون اکتیل – سفاروز افزون بر خلوص بالا میزان زیادی مولکول LPG جمع آوری می کند و نشان می دهد که با استفاده از این نوع کروماتوگرافی (کروماتوگرافی به روش تعویض یون Ion - Exchange) ، میزان زیادتری مولکول LPG با درجه خلوص بالاتری تولید می شود که قبلاً توسط Mc Convile و همکاران نیز به انجام رسیده است [۱۰] . در یک بررسی مشخص نمودند که مولکول LPG ، ۶۰ درصد از کل ترکیبات غشای خارجی Acanthamoeba. Castellani را نیز تشکیل می دهد [۱۹] و در بررسی دیگر مشخص شد که LPG در هر مرحله آماستیگوت ، پروماستیگوت لگاریتمی و پروماستیگوت های ایستای انگل لیشمانیا حضور دارد و افزون بر اینکه پایدارترین مولکول غشایی است ، در فرم عفونت زا و بیماریزا برای پستانداران یعنی پروماستیگوت های فرم ایستا از تراکم بیشتری برخوردار است و ترکیبات آن شامل لیپید، فسفات و کربوهیدراتهاست که درصد این مواد در همه گونه ها یکسان می باشد [۲۰] . با وجودی که ۱۰۵ سال از توصیف کلاسیک لیشمانیوز می گذرد ، هنوز هیچ واکسنی برای آن تهیه نشده و آخرین تلاشها نیز تنها درجه سودمندی ۱۵ درصد داشته و طیف وسیع لیشمانیوز در سراسر جهان از جمله ایران رو به گسترش بوده است. برای اهمیت بهداشتی لیشمانیوز در کشور ما همین بس که نوع پوستی آن (سالک شهری - روستایی) تقریباً در سراسر کشور شایع و لیشمانیوز احشایی (کالا آزار) نیز در استان های اردبیل ، فارس ، بوشهر و آذربایجان شرقی بومی و از سایر نقاط ایران تک گیر گزارش می شود ، لذا با توجه به شیوع وسیع لیشمانیوز و اینکه در کشور ما در زمینه تخلیص مولکولهای درگیر در سیستم ایمنی کمتر کار شده ، پیشنهاد می شود که زمینه تخلیص مولکولهای ایمنوژن و به ویژه کار تجربی در حیطه انسانی بیشتر مد نظر قرار گیرد. ما در این مطالعه برای نخستین بار در ایران از فرم لگاریتمی لپتوموناد های L . L . Major سویه ایران (MRHO/IR/75/ER) ، تعداد ۵×۱۰^{۹} لپتوموناد تکثیر و خالص سازی LPG رابه انجام رسانیدیم . از آنجا که روی سطح هر لپتوموناد $۱/۲۵ \times ۱۰^{۶}$ مولکول LPG باشد چیزی حدود $۶/۲۵/۱۰^{۱۵}$ مولکول LPG به دست آمد . ارزیابی کار با همراه یا بدون یاور (Adjuvant) در محیط های In vivo (موش Balb/c) و In vitro (لنفوسیتهای خون محیطی انسان) در حال انجام است. پیشنهادی می شود مولکول های عمده و مؤثر در چرخه زندگی انگل تخلیص و با یا بدون یاور (Adjuvant) در محیط های In vitro و In vivo به خصوص در حیطه انسانی انجام گیرد که در همین زمینه ارزیابی ایمنی سلول و تعیین الگوی Th1 و Th2 در محیط های In vivo و In vitro در حال انجام است.

References

1- WHO Information. Fact Sheet 2000 No. 116 Revised May .

2- Borovsky . P . F. Veon – med z (MIL Med J) 1898; 11925 – 941.

3- Malcol . M . J . Mc Conville , Antony Bacic , Grahamf . Mitchell . and Emanulela . ***Lipophosphoglycan of Leishmania Major.*** Proc. Natl . Acad SC.USA 1987; Vol 1.84 : 8941-8945.

www.SID.ir

Archive of SID

4- Gerald . Spath , Lind a Epstein , Ben leader Steven M . Singer , Herbert A . Avila Salvator J. Turco . ***Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite – Leishmania Major.*** PNAs 2000 Vol.97 , 16 : 9258 – 9263.

5- Salvatore. J . Torco and Albert Descoteavx. ***The lipophosphoglycan of leishmania parasites.*** Annu, Rev. Microbiol 1992 , 46 : 65 –94.

6- TDR Fiftenth programe report Progress 1999-2000.

7- WHO Health Report 2001 Leishmaniasis disease information.

8- Emanuela Handman ***Leishmaniasis Current status of Vaccines Development.*** Clinical Micrbiology Review 2001 Vol . 14 (12) : 229 - 243.

۹ - خبرنامه انجمن انگل شناسی ایران بهار ۱۳۸۱ شماره ۵ .

10- MalcolmJ. Mc Conville . Antony Bacic , Greham.F, Mithell and Emanuella Handman. ***Lipophosphoglycan of leishmania major that Vaccines against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid achor.*** Procn Njatl. Acad. Sci. USA 1987 , Vol . 84 : 8941 - 8945.

11- Salvatore . J. Turco , Steven . R . Hull , Palmer . A . Orlandi , Jr . and Steven . D. Shepherd. ***Structure of the major Carbohydrate Fragment of the Leishmania donovani Lipophosphoglycan.*** Biochemistry 1987, 26 : 6233 - 6238.

12- Malcolm . J . Mc Conville & Antony Bacic . ***A family of Glycionositol phospholipids from Leishmania Major. Isolation, Characterization and Antigenicity.*** The Journal of Biologcal Chemistry 1989,Jan.15,Vol.264,(2):757-766.

13- Armando Jardim , Douglas . L . Tolson , Salvatore . J. Torco , Terry . W . Pearson and Robert W. olafson. ***The Leishmania donovani Lipophosphoglycan T- Lymphocyte – Reactive component is A Tightly Associated protein complex.*** The Journal of Immunology 1991 Nov. 15 .Vol 147, 10 : 5338 – 5344

14- Assrevy. J , Cunha . F . Q , Epperlein . M, Noronha – Dutre . A . Q , Donnel . C . A , Leiw . F . Y , Moncada . S. ***Production of Nitricoxide and Superoxide by Activated Macrophages and Killing of Leishmania major.*** Evr .J. Immunol 1998 , 8 :131-134

15- Stengeros , Thurning . H . Rollinghoff . M , Bodgan . C .***Tissue expression of inducible nitric oxide synthese is closely associated with resistance to Leishmania major.*** J.Exp. Med 1995 , 180(6) : 783-793 .

16- Thomas . L. I . G , York – Dieter Siterhof , Davidcaraik . Rechard Simpson , Emanuel Handman and Anthony Bacic. ***Purfication and Structural by leishmania parasites.*** The Journal of Biological Chemistry 1996 Vol. 271 , (35) , 30 : 21583-21596.

17- Alicia Ponte – Sucre , Dirk heise & Heirron Moll. ***Leishmania major lipophosphoglycan Modolates the Phenotype and Inhibits Migration of Murine langerhans cells.*** Immunology 2001 Vol. 104 . 4 : 462-467.

18- Falmer . A . Orlandi & Salvator . J . Turco. ***Structure of the leishmania donovani lipophosphoglycan.*** The Journal of Biological Chemistry. 1987 Vol. 262 . (21) 25 : 10384 – 10391.

19- Edward . D , Korn , Dorr . G. Dearborn , and Paddy . L . Wright . ***Liopophoglycan of the plasma membrane of Acanthamoeba , castellani.*** The Journal Biological Chemistry 1974 , Vol. 249 . (11) : 3335 – 3341.

20- Malcolm .J.Mc Convile and Antony Bacic . A family of Glycoinositol Phospholipids From Leishmania major isolation, characterization and antigenicity. The Journal of Biological Chemistry 1989 Vol. 264 (2) : 757 -766.

www.SID.ir