

تخلیص و شرح ویژگیهای ساختاری گلیکو کنژوگه اصلی، لیپوفسفوگلیکان (LPG) از انگل 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^۴، دکتر فاطمه غفاری فر^۵

چکیده

سطح سلولی تک یاخته جنس لیشمانیا را دو رده پادگنی عمده، گلیکو پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی (GP63) و گلیکو کنژوگه همگون لیپوفسفوگلیکان (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) پتومونادهای 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 بر ضد 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

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

لیشمانیوز طیف وسیعی از علائم بالینی را بروز می دهد و

۱- دانشجوی دوره دکترای انگل شناسی

۲- دانشیار گروه ایمونولوژی

۳- استاد گروه انگل شناسی

۴- دانشیار گروه انگل شناسی

۵- استادیار گروه انگل شناسی

۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد.

۲ و ۳- دانشگاه تربیت مدرس تهران

۴- دانشگاه علوم پزشکی حضرت بقیه الله (عج) تهران

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 متناهی 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).

واکسناسیون موشهای آزمایشگاهی با LPG تخلیص شده از *Leishmania.L. Major* در لیپوزوم ها بر ضد لیشمانیوز پوستی مقاومت ایجاد کرده است^(۱۰).

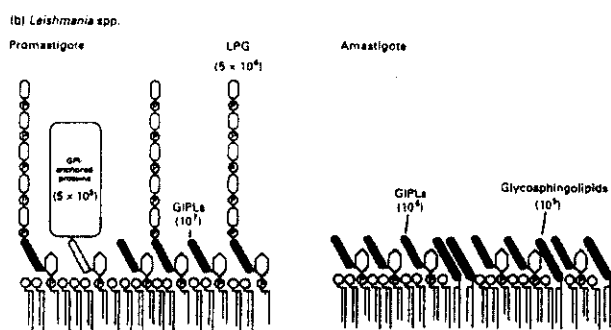
LPG حاوی بیش از نیمی از کربوهیدراتهای انگل لیشمانیا است و واحدهای تکراری آن دی ساکاریدهای فسفریله شده است که میانگین این واحدها ۱۶ عدد و همگی به وسیله پیوندهای α -glycosidic به هم متصل شده اند^(۱۱).

سطح میانگین سلولی تک یاخته انگلی جنس لیشمانیا را دو رده پادگنی عمده به نامهای گلیکو پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی (GP_{63}) و گلیکو کتروگه همگون لیپوفسفو گلیکان (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

عفونت (زونوز) بوده و گاهی انسان خود به عنوان مخزن عمل می کند. (آنتروپونتیک)^(۱۰،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 (مخصوصاً 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 ۱۰۰-۱۰۰۰ برابر افزایش می دهد^(۱۰،۶،۷،۸). در ایران نیز وضعیت لیشمانیوز طی 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 تازه کدار جنس لیشمانیا هر روز جنبه های بیشتری از ویژگیهای پادگنی این انگل را نشان می دهد^(۸). از جمله اینکه گلیکو کتروگه عمده سطح *Leishmania . L. Major* که گیرنده



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

ریخته و به محیط دو فاز (NNN) منتقل نمودیم و در دمای $25 \pm 0^\circ\text{C}$ 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 با شمارش 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 ۳-۴ ماه در دمای 70°C - نگهداری نمودیم که این مراحل مرتباً تکرار شد تا به تعداد 5×10^9 (۵ میلیارد) لپتوموناد در مرحله لگاریتمی رسیدیم^(۱۵) و با توجه به اینکه بر روی سطح هر انگل لیشمانیا در مرحله لپتوموناد $10^6 \times 1/25$ کپی از LPG وجود دارد بنابراین با بکارگیری ۵ میلیارد لپتوموناد چیزی حدود $10^{10} \times 6/25$ 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 لیپوفسفولیگان (LPG)

لپتومونادهای فرم لگاریتمی ذخیره شده به میزان 5×10^9 از دمای 70°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 ۰/۱۷ NaCl (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 بهم زدن 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 لیوفلیزه شد. پس از لیوفلیزه، مواد حاصل با کلروفرم / متانول به نسبت (۱ : ۲) شستشو

گونه ها ساختار ثابتی دارد ولی LPG ساختار متفاوتی به خود گرفته و برای مطالعات سروتیپ لیشمانیا به کار می رود. روش اتصال GP63 و LPG به غشای پلاسمایی به شیوه ی فسفولیپید گلیکوزیل است که این شیوه اتصال در تک یا تته ها معمول می باشد^(۱۲).

در یک بررسی، لئوسیتهای موشها با فرگمتهای مختلف LPG واکنش شدند و دیده شد که تحریک T-cell ها مرتبط با ساختار هسته LPG بوده تا ساختار تکرار شونده فسفولیگان و لیپید، بر آورد شده است که تقریباً $10^6 \times 1/25$ مولکول LPG بر روی یک پروماستیگوت لیشمانیا وجود داشته باشد^(۱۳).

LPG به همراه GP63 و GLP در سطح پروماستیگوت یک گلیکولیگان متراکمی است که همه سطح انگل حتی تاژک را می پوشاند و بر روی پروماستیگوت ها خیلی بیشتر از آماسیگوتها 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 GP63 با جمع آوری رادیکالها، آماسیگوتها را از کشته شدن حفظ می کند و با غیرفعال کردن آنزیم های فاگوزومی، دگرانوله شده و از طریق سد کردن اتصال فاگوزوم با لیوزوم، 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* سوئی 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)

بود و بقیه Peak ها جمع آوری و لیوفیلیزه شد. در مجموع از ۵ میلیارد لپتوموناد 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 لیئوفوسفولیکان (LPG) خالص شده با ژل پروفایل استاندارد که پس از کروماتوگرافی روی سفادکس G-150 و رسوب در متانول سرد، LPG برای SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

در مجموع از ۵ میلیارد لپتوموناد فرم لگاریتمی نزدیک به ۱ گرم لیئوفوسفولیکان 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

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 سولفات (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 (Pharmacia . Biotech) و با استفاده از بافر TES با PH=7 خارج شدند.

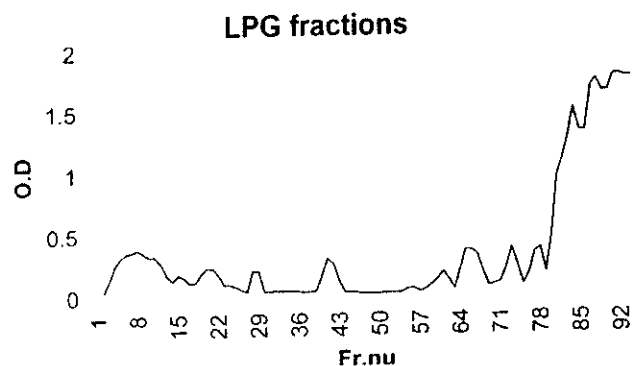
در مرحله دوم که مولکولهای LPG در ستون اکتیل سفاروز باقی مانده بودند، یک دستگاه Gradian - Maker تهیه شد که متشکل از دو استوانه هر کدام به قطر ۲/۵ cm و مرتبط با هم که یکی فقط خروجی و دیگری ورودی - خروجی دارد و در داخل اولی ۱- پروپانول ۷۰ درصد و در دومی ۱- پروپانول ۵ درصد می باشد و این دستگاه بر روی چرخاننده 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 CECIL 9200 Super (CECIL 9200 Super 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

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

میزان جذب	فرکشن	میزان جذب	فرکشن
۰/۰۳۵	۱	۰/۰۰۳	۴۸
۰/۰۵۲	۲	۰/۰۰۵	۴۹
۰/۲۲۵	۳	۰/۰۰۶	۵۰
۰/۲۷۸	۴	۰/۰۱۲	۵۱
۰/۳۵۵	۵	۰/۰۱۱	۵۲
۰/۳۴۰	۶	۰/۰۱۳	۵۳
۰/۳۷۲	۷	۰/۰۱۴	۵۴
۰/۳۷۹	۸	۰/۰۷۰	۵۵
۰/۳۰۸	۹	۰/۰۱۲	۵۶
۰/۳۲۶	۱۰	۰/۰۱۷	۵۷
۰/۳۱۰	۱۱	۰/۰۵۱	۵۸
۰/۲۰۹	۱۲	۰/۰۸۵	۵۹
۰/۱۲۲	۱۳	۰/۱۳۶	۶۰
۰/۱۲۰	۱۴	۰/۲۰۲	۶۱
۰/۲۱۹	۱۵	۰/۲۷۳	۶۲
۰/۰۷۲	۱۶	۰/۳۶۸	۶۳
۰/۱۲۷	۱۷	۰/۳۴۵	۶۴
۰/۰۸۵	۱۸	۰/۳۶۲	۶۵
۰/۲۶۳	۱۹	۰/۳۲۲	۶۶
۰/۱۷۵	۲۰	۰/۲۹۵	۶۷
۰/۲۵۲	۲۱	۰/۰۵۳	۶۸
۰/۰۷۵	۲۲	۰/۰۵۶	۶۹
۰/۰۹۳	۲۳	۰/۰۸۰	۷۰
۰/۰۷۶	۲۴	۰/۰۹۱	۷۱
۰/۰۵۴	۲۵	۰/۲۹۵	۷۲
۰/۰۲۸	۲۶	۰/۴۳۲	۷۳
۰/۰۲۵	۲۷	۰/۱۳۷	۷۴
۰/۰۳۶	۲۸	۰/۱۱۳	۷۵
۰/۰۲۱	۲۹	۰/۱۸۸	۷۶
۰/۰۳۵	۳۰	۰/۴۶۶	۷۷
۰/۰۲۷	۳۱	۰/۲۶۲	۷۸
۰/۰۳۰	۳۲	۰/۰۶۲	۷۹
۰/۰۲۴	۳۳	۰/۸۸۰	۸۰
۰/۰۳۲	۳۴	۱/۰۱۲	۸۱
۰/۰۲۸	۳۵	۱/۱۵۵	۸۲
۰/۰۲۰	۳۶	۱/۳۶۸	۸۳
۰/۰۱۸	۳۷	۱/۶۶۰	۸۴
۰/۰۲۵	۳۸	۰/۹۹۰	۸۵
۰/۰۲۹	۳۹	۱/۶۴۰	۸۶
۰/۰۲۸	۴۰	۱/۷۴۰	۸۷
۰/۰۳۰	۴۱	۱/۷۵۰	۸۸
۰/۰۱۹	۴۲	۱/۵۵۰	۸۹
۰/۰۱۶	۴۳	۱/۲۶۰	۹۰
۰/۰۱۸	۴۴	۲/۸۰۰	۹۱
۰/۰۱۳	۴۵	۱/۷۶۸	۹۲
۰/۰۱۵	۴۶	۱/۷۵۶	۹۳
۰/۰۰۲	۴۷	۱/۷۸۰	۹۴

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 دو نوع 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 پروماستیگوت های لیشمانیا (حدود ۱۰^{۱۱} 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 (۱:۳) 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)

بحث

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 ایمونژن 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 لپتومونادهای L. L. Major سویه ایران (MRHO/IR/75/ER)، تعداد 5×10^9 لپتوموناد تکثیر و خالص سازی LPG رابه انجام رسانیدیم. از آنجا که روی سطح هر لپتوموناد $1/25 \times 10^7$ مولکول LPG باشد چیزی حدود $6/25/10^{15}$ مولکول LPG به دست آمد. ارزیابی کار با همراه یا بدون یاور (Adjuvant) در محیط های *In vivo* (موش Balb/c) و *In vitro* (لنفوسیت های 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 vivo* و *In vitro* 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.

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 Conville 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 واکنشی برای آن تهیه نشده و آخرین تلاشها نیز تنها درجه سودمندی ۱۵ درصد داشته و طیف

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.

- 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*. PNA's 2000 Vol.97 , 16 : 9258 – 9263.
- 5- Salvatore. J . Torco and Albert Descoteaux. *The lipophosphoglycan of leishmania parasites*. Annu. Rev. Microbiol 1992 , 46 : 65 –94.
- 6- TDR Fifteenth programe report Progress 1999-2000.
- 7- WHO Health Report 2001 Leishmaniasis disease information.
- 8- Emanuela Handman *Leishmaniasis Current status of Vaccines Development*. Clinical Microbiology Review 2001 Vol . 14 (12) : 229 – 243.
- ۹- خبرنامه انجمن انگل شناسی ایران بهار ۱۳۸۱ شماره ۵.
- 10- Malcolm.J. Mc Conville . Antony Bacic , Greham.F, Mithell and Emanuella Handman. *Lipophosphoglycan of leishmania major that Vaccines against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor*. Proen 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 Glycinositol phospholipids from Leishmania Major. Isolation, Characterization and Antigenicity*. The Journal of Biological 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- Assrevey. 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 synthase 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 . Recharad 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 Jqurnal Biological Chemistry 1974 , Vol. 249 . (11) : 3335 – 3341.
- 20- Malcolm .J.Mc Conville 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.