مقایسه آنتی ژن های پروتئینی دفعی ترشحی آسکاریس لومبریکوئیدس و توکسوکاراکاتی از لارو مرحله دوم با روش های بیوشیمیایی

فاطمه ملکی [۱] ، دکتر جعفر مسعود [۲]

واژه های کلیدی : *آسکاریس لومبریکوئیدس و توکسوکاراکاتی ، آنتی ژن*

چکیده

دراین بررسی آنتی ژن های دفعی ترشحی آسکاریس لومبریکوئیدس و توکسوکاراکاتی از لارو مرحله دوم پس از تهیه در معرض ژل کروماتوگرافی روی سفاکریل S-200 قرار گرفتند و هر کدام به چندین قسمت آنتی ژنیک جداسازی شدند. آنتی ژن های دفعی ترشحی این نماتودها با استفاده از سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید - ژل الکتروفورز جداسازی شدند. در جداسازی آنتی ژن های دفعی ترشحی آسکاریس لومبریکوئیدس و توکسوکاراکاتی با روش SDS-PAGE به ترتیب ۸ باند و ۹ باند برای هر کدام تجزیه شدند و باندهایی را با اوزان مولکولی بین ۱۲ تا ۱۳۰ کیلو دالتون ۰، نگ آمیزی با کوماسی برلیانت بلو نشان دادند.

سرآغاز

درانگـــل شناسی بیشترین تعداد کرم هایی که انسان را آلوده می سازند ، در گروه کرم های گرد یافت می شوند که برخی از آنها علاوه بر انسان میزبان حیوانی دارند و برخی نیز تحت شرایط خاصی بیماری زا محسوب می شوند ، در نتیجه تغییرات زیادی در مراحل مختلف سیر تکامل وعواقب پاتولوژیک آنها در انسان دیده می شوند(۴). در دهه های اخیر عمده مطالعات و تحقیقات انجام شده در زمینه انگل شناسی بیشتر معطوف به بررسی بیولوژی (بیوشیمی) و ایمنولوژی انگل ها گردیده است واکثر مقالات منتشره در مجلات علمی مربوطه به این رشته را ، مباحث فوق دربرمی گیرد(۱۰). معمولاً جهت تشخیص آلودگی های انگلی در مورد کرم هایی مثل آسکاریس لومبریکوئیدس که میزبان نهایی شان انسان است ، رویت تخم کرم در مدفوع نشانه آلودگی است. ولی در مورد بیماری های انگلی ای مثل

۱- گروه انگل شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس ، صندوق پستی ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵ ، تهران.
۲- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی ، دانشکده بهداشت و انستیتوتحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران ، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵ ، تهران.

توکسوکارا که انسان میزبان اتفاقی می باشد ، تشخیص مراحل لاروی انگل هاتنها با بهره گیری از روش های سرولوژیکی امکان پذیر می باشد (۴). آسکاریس لومبریکوئیدس بیش از هر بیماری انگلی دیگری مردم جهان را مبتلا ساخته است و براساس اطلاعات موجود حدود ۶۵۰ میلیون تا یک میلیارد نفر به این انگل آلودگی دارند(۳).

میانگین شیوع این انگل از ۳۲ تا حدود ۶۰ درصد متفاوت است (۱۰ و ۵). آلودگی به آسکاریس در نواحی گرمسیر و مناطق روستایی کشورهای در حال توسعه به علت فقدان امکانات بهداشتی بسیار بالاست و بین ۹۰ تا ۹۷ درصد مردم به آن آلوده می باشند (۵). توکسوکارا نیز که انگل شایع سگ و گربه و از بیماری های مشترک بین انسان وحیوان بوده و در همه مناطق دنیا انتشار دارد ، دربرخی از گزارش ها تا ۲۲ درصد از سگ ها و ۵۵ درصد از گربه ها در آمریکا مبتلا به انگل بوده اند (۱۰).

تاکنون موارد انسانی زیادی از این بیماری ازنقاط مختلف جهان گزارش نموده اند و از طرفی گزارشات متعدد از عوارض چشمی و مغزی این بیماری لزوم مطالعه و شناخت هرچه بیشتر آن را روشن می سازد (۵).

نمونه گیری و روش بررسی

تعدادی کرم بالغ ماده آسکاریس لومبریکوئیدس بعد از درمان افراد آلوده جمع آوری گردیدند. به منظور بدست آوردن کرم بالغ ماده توکسوکاراکاتی ، تعدادی گربه نیز اتوپسی گردیدند. هر دو کرم ماده در PBS (PH=۷/۲) نگهداری گردیدند. آنگاه تخم های آنها را خارج نموده و در اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال به مدت ۲-۱ ماه نگهداری نمودیم (۱۲). سپس سانتریفوژ نموده و درمحلول هیپوکلریت سدیم ۶٪ در انکوباتور 37^{0C} به مدت یک ساعت قرار دادیم ، سپس تخم های لارو را در محیط کشت استریل (HMEM)[1] قرار دادیم (۱۴و۱۱). لاروهای خارج شده از تخم را از دستگاه برمن عبور داده ، آنگاه آنها را درمحیط کشت نگهداری نمودیم (۶و۱). محیط کشت برداشت شده را توسط کیسه ، دیالیز نموده ومیزان پروتئین آن را اندازه گیری کرده (۶) ، کلیه نمونه ها را در -20^{0C} نگهداری نمودیم. با استفاده از روش اولترافیلتراسیون فراکشن ۲ با وزن مولکولی بین ۲۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون از ژل فیلتراسیون با سفاکریل S-200 عبور داده شدند. وزن مولکولی پروتئین ها با (SDS) (PAGE)[2] با استفاده از ژل صفحه ای و رنگ آمیزی ژل ها با کوماسی برلیانت بلو (BCB) رنگ آمیزی شدند.

1- Eagle's Minimal Essential Medium with Hanks salts.

2- Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

یافته ها

در این بررسی ۳۱۵۰ میلی لیتر آنتی ژن دفعی ترشحی از آسکاریس و ۲۷۰۰ میلی لیتر از توکسوکارا در مدت ۹۰ روز که لاروها در محیط کشت فعال بودند بدست آمد. آنها در حدود $\frac{۱}{۵}$ حجم اولیه تغلیظ شدند (نمودار۱) . آسکاریس لومبریکوئیدس در هر میلی لیتر آنتی ژن ۱/۵ میلی گرم و توکسوکرا نیز ۰/۷۸ میلی گرم پروتئین داشتند. هر لارو آسکاریس در یک روز ۵ نانوگرم پروتئین و هر لارو توکسوکارا در یک روز ۲/۶ نانوگرم پروتئین تولید نمودند (نمودار ۲)..محیط کشت لیوفیلیزه شده آسکاریس پس از عبور از ستون ژل کروماتوگرافی در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۴ فراکشن داد. فراکشن اول یک پیک بلند و فراکشن های دوم ، سوم وچهارم پیک های نسبتاً کوتاهی را نشان دادند. پس از اندازه گیری با روش برادفورد میزان پروتئین آنها مشخص شد (نمودار ۳) و توکسوکارا نیز در عبور از ستون ژل کروماتوگرافی ۴ فراکشن بدست آمد ، فراکشن اول یک پیک کوتاه ، فراکشن دوم یک پیک بلند و فراکشن سوم و چهارم پیک های کوتاه با حجم زیاد بودند که پس از تغلیظ میزان پژوتئین شان اندازه گیری شد (نمودار ۴).

با استفاده از (SDS-PAGE) آسکاریس ۸ باند نشان داد ، یک باند با وزن مولکولی بیش از ۱۰۰ کیلو دالتون و ۷ باند باوزن مولکولی بین ۱۳ تا ۹۵ کیلو دالتون نشان داد و فراکشن های آن نیز اجزا ۶۷ ، ۴۳ ، ۳۱ کیلو دالتون را نشان دادند. آنتی ژن توکسوکارا کاتی ۹ باند پروتئینی نشان دادند ، که یک باند آن دارای وزن مولکولی ۱۳۰ کیلو دالتون و ۸ باند دیگر از آن بین ۳۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون جدا شدند و فراکشن های آن نیز اجزا ۴۳,۴۸,۷۵,۹۴ و ۳۳ کیلو دالتون را نشان دادند.

گفتگو و بهره گیری پایانی

آنتی ژن دفعی ترشحی لارو مرحله دوم آسکاریس لومبریکوئیدس و توکسوکارا کاتی که از محیط کشت بدست آمده بودند ، توسط محققین مختلف بررسی شده است با اصلاحاتی که در روش های کشت انجام شده است تقریباً ۰/۵ تا ۱ میلی گرم فرآورده های دفعی ترشحی توکسوکارای لیوفیلیزه شده را می توان در هفته از $1X10^{۷}$ لاروی که در ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت HMEM نگهداری شده اند بدست آورد (۷).

در سال ۱۹۸۷ توانستند از تعداد $۱۰^{۷}$ لارو بطورمتوسط روزانه ۰/۴۱ میلی گرم در میلی لیتر آنتی ژن تولید نمایند که این تقریباً برابر با ۸ نانوگرم پروتئین برای لارو در یک روز است (۲). دراین مطالعه با استفاده از روش دیساویگنی (۷) از هر لارو آسکاریس لومبریکوئیدس روزانه ۵ نانوگرم و از آنتی ژن دفعی ترشحی توکسوکاراکاتی روزانه ۲/۶ نانوگرم آنتی ژن بدست آمد که مقدار اختلافی که در تولید پروتئین وجود دارد به روش نگهداری لاروها بستگی داشت. مراحل خالص سازی آنتی ژن به صورت توام توسط محققین

انجام شده است. بااستفاده از ژل فیلتراسیون از آنتی ژن خام کرم توکسوکارا ، ۲ پیک بدست آمده است که پیک اول را ایمنوژن اعلام نمودند. در حالی که پیک دوم هیچگونه واکنشی با سرم بیماران آلوده از خود نشان نداد (۸).

با استفاده از سفادکس G_{25} ، آنتی ژن دفعی ترشحی توکسوکارا را تخلیص کردند و ۳ پیک بلند و ۳ پیک کوتاه در ۸۰۰ میلی لیتر از محلول بافر ژل کروماتوگرافی بعد از اندازه گیری با اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۸۰ نانومتر را نشان داد (۱۳).

دراین بررسی ، روی سفاکریل S-200 ، آسکاریس لومبریکوئیدس در ۳۰۰ میلی لیتر ازمحلول بافر ژل کروماتوگرافی ۴ فراکشن ظاهر ساخت. فراکشن اول آن پیک بلند وفراکشن دوم و سوم و چهارم پیک های نسبتاً کوتاه را نشان دادند. توکسوکاراکاتی در ۲۵۰ میلی لیتر از محلول بافر ژل کروماتوگرافی ۴ فراکشن ظاهر ساخت. فراکشن اول آن یک پیک کوتاه ، فراکشن دوم یک پیک بلند و فراکشن سوم و چهارم پیک های کوتاه بودند.

طبق بررسی محققین ، با روش SDS-PAGE ، اجزاء ۱۴ تا ۲۲۵ کیلو دالتون را در آسکاریس لومبریکوئیدس جدا کرده اند ، که بیشترین اوزان مولکولی در آسکاریس بین اجزاء ۱۴ تا ۶۰ کیلو دالتون گزارش شده است (۹).

در مورد توکسوکاراکاتی نیز اوزان مولکولی ۳۲ ، ۵۵ ، ۷۰ ، ۱۲۰ و ۴۰۰ کیلو دالتون را نیز گزارش نموده اند ، که تمامی اوزان مولکولی آنتی ژنیک بوده و با سرم انسان ، میمون و موش آلوده به توکسوکارا واکنش نشان داده است (۹).

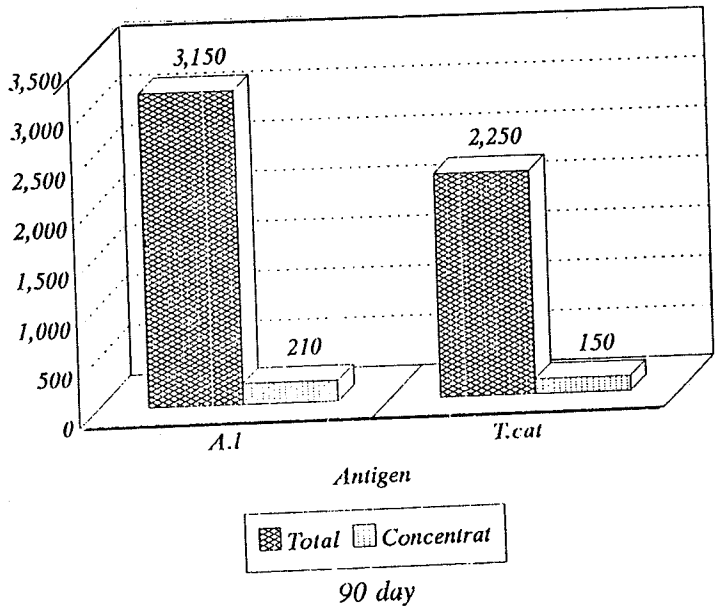
در بررسی های انجام شده در مورد آسکاریس مولکول های ایمنوژن بدست آمده ، دارای وزن مولکولی ۵۰-۱۰ کیلو دالتون بودند و در عصاره حاصل از کرم بالغ توکسوکارا نیز ایمنوژن مشابه آسکاریس شناسایی شده است (۱۳).

دراین تحقیق ، آنتی ژن دفعی ترشحی آسکاریس دارای حداقل ۸ باند پروتئینی بین ۱۲-۱۲۰ کیلو دالتون بوده که اجزا باوزن مولکولی ۱۲۰ ، ۷۵ ، ۴۳ ، ۱۸ و ۱۲ کیلو دالتون قوی تر از سایر باندها نشان داده شده است. آنتی ژن دفعی ترشحی توکسوکارا نیز حداقل ۹ باند پروتئینی بین ۱۳۰-۳۳ کیلو دالتون بودند که اجزای دارای وزن مولکولی ۱۴ و ۶۷ کیلو دالتون قوی تر از سایر باندها بودند. با نظر اجمالی به نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که مقایسه آسکاریس و توکسوکارا در اوزان مولکولی ۱۲۰ ، ۷۶ ، ۶۷ ، ۴۳ و ۳۰ کیلو دالتون باندهای مشترک نشان دادند.

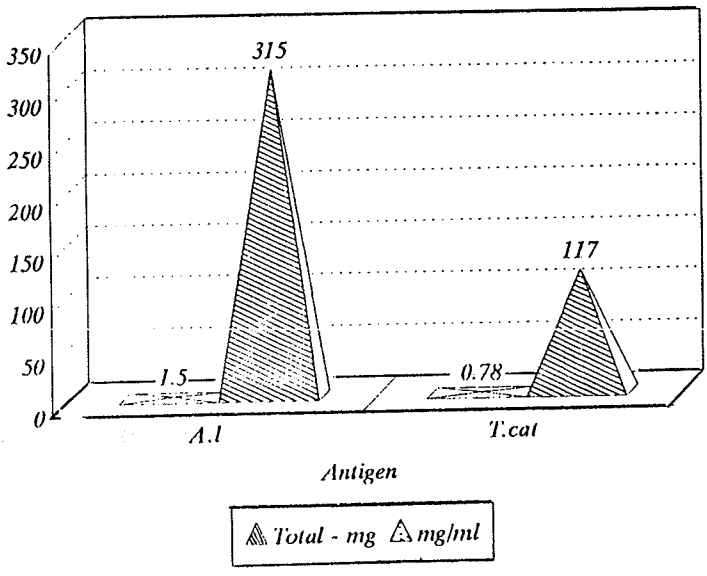
فراکشن های آنها نیز در اوزان ۶۷ و ۴۳ کیلودالتون باندهای مشترک نشان دادند. از آنجا که این گروه کرم ها در یک خانواده طبقه بندی شده اند ، نشان دادن وزن های مولکولی همانند و مشابه دور از انتظار نیست.

سپاسگزاری

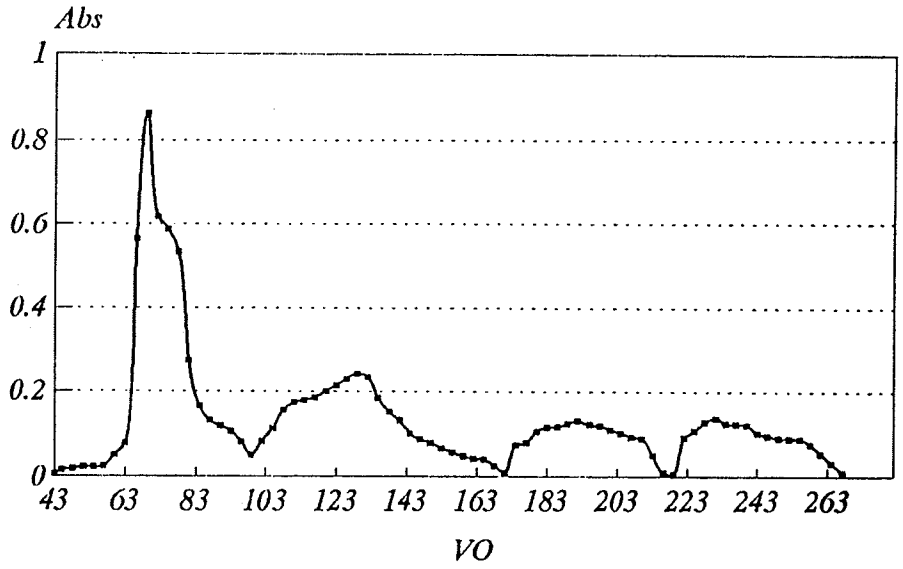
کلیه مراحل این تحقیق باامکانات دانشکده پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. که بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از پخش انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می دارم.



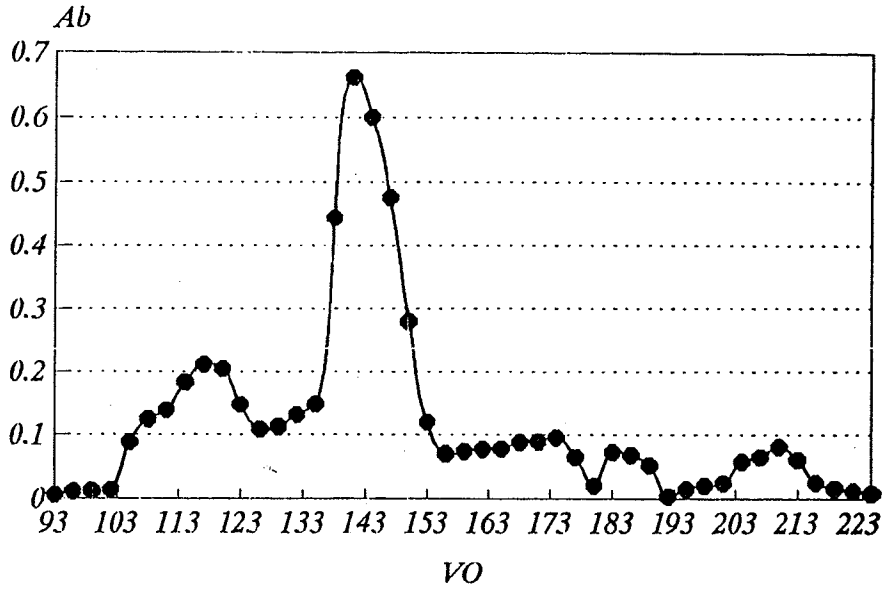
نمودار ۱- میزان محیط کشت استخراج شده از تعداد لاروهای موجود در محیط کشت (HMEM)



نمودار ۲ - غلظت پروتئین موجود در آنتی ژن دفعی ترشحی لارو مرحله دوم



نمودار ۳- پیک های حاصل از تخلیص با ژل کروماتوگرافی *(Ascaris lumbricoides)*



نمودار ۴ - پیک های حاصل از تخلیص با ژل کروماتوگرافی *(Toxocara cati)*

کتابنامه

1- Agulia , C. , Cuellar , C. (1987): Comparative study of assays detecting circulating immune complexes and specific antibodies in patients infected with Toxocara. J : Helminth. 61: 196-202.

2- Badley , J.E. , Hay , F.C. (1987): Analysis of Toxocara larval excretory secretory antigens. J: Parasit 73(3) PP: 593-600.

3- Bain , V.G. , Anderson , R.C. (1988): Biliary Ascariasis J: Clin Gastroenterol. 10(4) 448-51.

4- Beaver , P.C. , Jung , R.C. , Cupp , E.V. (1984): Clinical parasitology philadelphia , Lea and febiger.

5- Crompton , D.W.T. , Nesheim , M.C. (1989): Ascariasis and its prevention and control. Taylor and Francis , London.

6- Cuellar , C. , Fenoy , S. (1992): Cross-Reactions of sera from Toxocara Canis infected Mice with Toxocaraiasis leonina and Ascaris summ Antigens. Australian Society for Parasitology Vol. 22(3) PP: 301-307.

7- Desavigny , D.D. (1975): Invitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara E.S. antigen for use in b serodiagnostic Tests for VLM.

8- Jeska , E.h (1967): Antigenic analysis of a metazoan parasite Toxocara canis. Purification and analysis of Two antigenic components. J: Immunol 98: 1290-1300.

9- Kennedy , M.W. , Maizels , R. (1987): Species specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of T.Canis infective larvae. J: Parasitic Immuno , 9: 407-420.

10-Kenneth , S. , Warren , Adel , A. , Mahmoud (1984): Tropical and Geographical Medicing Mac-Grawhill Book-Company. PP: 3747-357 , 431-437.

11-Krupp , I.M. (1974): Hemagglutination Test for the detection of antibodies specific for the detection of antibodies specific for Ascaris and Toxocara canis antigens inpateints with suspected visceral larvae migrans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:378-384.

12-Oshima , T. (1976): Abservantions of the age resistance eosinophilia and larval behavior or in the Helminth free Beagles infected , with Toxocara , Japan. arasit. Vol 25: No(6) 447-455.

13-Oshima , T. , Sugane , K. (1983): Purification and characterization of ES antigen of Toxocara larvae. J: Immunol , 50 , 113-120.