مجموعه ی پروتئین های مقایسه ای پروتئین های ترشحی غدد مترشحه رهاشده توسط کرم کبد فاسیولاهپاتیکا در صفرای میزبانی گوسفند و در محیط کشت خارج از میزبان در آزمایشگاه.

آلودگی دام با انگل کرم کبد فاسیولاهپاتیکا عامل اصلی تلفات اقتصادی جهانی است . تولیدات ترشحی غدد مترشحه (ES) ، تولید شده توسط F. هپاتیکا نقش کلیدی در درک بر هم کنش و عمل متقابل میزبان – انگل است و هدف هایی برای شیمیایی و ایمنی درمانی پیشنهاد می کند .

برای اولین بار، زیر پروتئومیکس ها، برای مقایسه ی تولیدات ES تولید شده توسطE . هپاتیکای بالغ در محیط زنده استفاده شده ، در صفرای میزبان گوسفندی با روش های ES خارج از میزبان کلاسیک در محیط آزمایشگاه مقایسه شد . تنها پروتئازهای کاتپسین L از F. هپاتیکا در ترکیبات صفرای میزبان گوسفندی L تعیین هویت شده بود . چندین پروتئین میزبان همچنین شامل آلبومین و انولاز تعیین هویت شده بود به همراه کمپلکس ممانعت کننده ی تریپسین میزبان به عنوان یک بیومارکر (مارکرزیستی) بالقوه ی عفونت F. هپاتیکا تعیین شده بود . دوره زمانی در آزمایشگاه تجزیه پروتئاز کاتپسین L را به عنوان اصلی پروتئوم ES در شرایط آزمایشگاه تائید می کند . به علاوه پروتئین های دفع مسمومیت (ترانسفرازگلاتاتیون و پروتئین باند شده ی اسیدچرب)، اکتین و آنزیم های گلیکولیتیک انولاز و گلیسرآلدهید 3- فسفات دهیدروژناز همه در شرایط آزمایشگاه تعیین هویت شده بود . وسترن بلات (تکنیکی برای ردیابی پروتئین ها) پروتئین هایES در شرایط آزمایشگاه و محیط زنده ، تنها پروتئاز کاتپسین L را که شناخته شده با ذخیره شده از حیوانات آلوده به F . هپاتیکا است ، را نشان می دهد . پروتئین های رها شده ی دیگر کرم کبد در محیط کشت آزمایشگاهی ممکن است به داخل محیط زیست صفرای میزبان از مسیر طبیعی ریزش پوست کرم کبد بالغ رها شود . این پروتئین ها ممکن است در تجزیه ی محیط کشت جاندار ما بواسطه ی افزایش میزان جابه جایی صفرا تشخیص داده نشوند و ممکن است توسط سرم های ذخیره ای آلوده ی کرم کبد تشخیص داده نشوند زیرا آنها تنها در بالغین تولید می شوند .

این مطالعات برجسته به سختی پروتئین های ES خارج از میزبان را به طور صحیح تعیین هویت می کند و بیشتر پتانسیل پروتئازهای کاتپسین L رابه عنوان داوطلبین درمانی تائید می کند. پروتئومیکس مولکولی و سلولی .

انگل کرم کبد فاسیولا هپاتیکا انسان ها و دام های نشخوارکننده ی سراسر جهان را آلوده می کند . تخمین زده شده که 2/4 میلیون نفر با گونه های فاسیولا آلوده اند و بیش از 180 میلیون در خطر هستند (1) . به علاوه ، F . هپاتیکا عامل ضرر برآورده شده ی 3 بیلیون دلار درجهان در سال بواسطه ی تلفات دامی است ، مخصوصا در گوسفند و با کاهش بهره وری از طریق ردکسیون (آزمایش برای تعیین تقویتی میکروبهای شیر) شیر و بازدهی گوشت در گله گاو .

در حال حاضر میزان عفونت کرم کبد در قسمتهای شمال غرب اروپا بیش از 30٪ تخمین زده شده است در غیاب واکسن های تجاری ، بنزی میدازول مشتق تری کلابندازول (TCBZ) دارویی است که به طور وسیع برمندفاسیولا استفاده می شود . برخلاف دیگر کشنده های فاسیولا، TCBZ ، فعالیتی برضد هر دو کرم کبد جوان که مسئول آسیب به کبد آلوده شده با فاسیولای حاد است و کرم های کبد بالغ که عامل تضعیف آلودگی با فاسیولای مزمن می باشد نشان می دهد .

اخیرا مقاومت به TCBZ در چندین کشور اشاره شده گزارش شده است که کنترل شیمی درمانی این عفونت ممکن است به زودی توافق شود .

بیشتر روش های زمینه ای تشخیصی متداول برای تشخیص عفونت فاسیولا به شمارش تخم های کرم کبد در نمونه های مدفوع نیازمند است .

به هر حال شمارش تخم زمانگیر و گران است و محدودیت توانایی در تشخیص سریع مرحله ی حاد عفونت را دارد . روش های تشخیصی ایمنولوژیکی جدید با تعیین هویت آنتی ژنی حفاظت شده ی تجاری ، در شکلی ازیک تست زمینه ای یک جایگاهی سریع فراهم است . DriDot پایه ای بر آلگوتیناسیون لاتکس و یک هم یاری ELISA برای کاربردهای دامپروری آزمایشگاهی است . بیشتر تحقیقات تشخیصی پایه ای به تست های صحیح معتبر به طور آزادانه نیازمند است و به تهیه ی تغییر مولکولی برای جمعیت های کرم کبد جگر نزدیک می شود . در ویژگی های برتر مدل های گله ی گاو پاسخ ایمنی عفونت F هپاتیکا پیش از فساد مداوم در حدود 4 تا 6 هفته بعد از عفونت است . این پاسخ ایمنی با تعویض در حدود زمان بلوغ به درون مجرای صفراوی ظاهر می شود . حضور کرم های کبد ، پاسخ های Thelper,Tcell راکه مانع القای سیستم ایمنی حفاظتی که میزبان را برای عفونت ها مستعدتر می سازد ، تغییر می دهد . احتمال اینکه ترشحات کرم کبد وقایع علامت دهی پایه ای ماکروفاژ میزبان را برای تعویض پاسخ ایمنی پیش از فساد خاموش کنند قبل ازاینکه عفونت به طور مناسب کنترل شود تغییر می کند .

توسعه ی F هپاتیکای جوان و بالغ به درون مجرای صفراوی درون کبدی و کیسه های صفرای آلوده ی میزبان ، رهاسازی تولیدات باقی مانده ی ترشحی غدد مترشحه (ES) که سرانجام می تواند منجر به فیبروز و آهکی شدن بافت های میزبان گردد ادامه می دهد .

مطالعات بیوشیمیایی در آزمایشگاه پیش بینی کرده است که تولیدات ES ، F هپاتیکا ، نقش هایی را که در رفتار غذایی ، دفع مسمومیت ترکیبات صفراوی و پرهیز از سیستم ایمنی ایفا می کند . پروتئومیکس آزمایشگاهی رهاسازی چندین پروتئین اصلی فوق خانواده از کرم کبد را حمایت می کند . برای مثال ، معمولا فازII دفع مسمومیت GST ، به منظور پرهیز از ایمنی نقش هایی را برای اینکه درمحیط آزمایشگاهی کشت کرم کبد ترشح شود پیدا می کند.

شکل های چندگانه پروتئاز کاتپسین L ، همچنین در آزمایشگاه بوسیله ی F هپاتیکای بالغ ترشح می گردد . این پروتئازها می تواند هموگلوبین میزبان و پروتئین های ماتریکس را برای تغذیه بشکند و همچنین در کمترین حالت آزمایشگاه از شکستن IgG میزبان ، شاخص نقش های پرهیز از ایمنی ، شایسته است .

در مطالعات آزمایشگاهی می توان تنها تلاشی برای ظرفیت پروتئین تقلیدی ترشح شده بوسیله ی F هپاتیکا در صفرای میزبان داشته باشد . این بستگی دارد به اینکه پروتئوم ES F هپاتیکا بوسیله ی برداشتن انگل از بافت طبیعی میزبان و نگه داشتن انگل در مخلوط شیمیایی تغییر خواهد کرد . چنانچه بروتئومیکس بوسیله ی پروتئین های منحصر به فرد از مخلوط پروتئین های انگل و میزبان تعیین شود که پتانسیل خارج از میزبان در شرایط آزمایشگاهی معتبر در جاندار و ایجاد امکان برای تحلیل های زمان واقعی پیشنهاد می شود.

پروتئومیکس جانداران درعفونت های انگلی همچنین امکان تعیین هدف های جدید و هدف های درمانی قدیمی تر معتبر، تولید پروب های پروتئین برای حساسیت و تشخیص های انتخابی و افزایش درک ما از چگونگی تعدیل شدن انگل ها در سیستم ایمنی پیشنهاد می شود. پروتئومیکس های جستجو شده در صفرای گوسفند هنوز گزارش می شود ، و مطالعات پایه ای پروتئین از صفرای انسان شامل یک سری از جدائی های کروماتوگرافی بیش از تعیین هویت پروتئین ها می باشد . صفرا از گوسفندهای اهلی تنها پیش از یک سطح برجسته در رابطه با ترکیبات اصلی صفرا ویژه شده است .

محتویات پروتئینی در صفرای پستانداران مثل گوسفند، معمولا در یک رنجی از 5 - 1 mg/ ml است . تعدادی از پروتئین ها در صفرا یافت شده اند مثل آلبومین که از پلاسما یا از سلول های سیستم صفراوی استخراج شده است (هپاتوسیت ها و سلول های مجرای صفراوی) و در چندین گونه ی پستانداران نشان داده شده اند.

در کیسه ی صفرا، صفرا غلیظ می شود تا 10 برابر با تغییر محتویات ، اغلب با اضافه کردن گلیکوپروتئین های موکوس یادفع انواع دیگر پروتئین . IgA پلی مری یک ترکیب پروتئینی اصلی در صفرای پستانداران نشان داده شده است . به هرحال آن فراوان در صفرای گوسفند به نظر نمی رسد . سطوح IgG و IgA در صفرای میزبان بررسی شده است که میزبان با فاسیولاهپاتیکا به نسبت زیادی کمتر از سطوحی که در سرم یافت شده است آلوده شده است. در این مطالعه پروتئومیکس شبیه شده برای دوره ی زمانی تجزیه ی پروتئین رها شده از F هپاتیکا در محیط کشت آزمایشگاهی و تعیین هویت پروتئین رها شده از انگل به طور مستقیم در محیط صفرای گوسفندی استفاده می گردد. بنابراین برای اولین بار تولیدات پروتئوم ES توسط F هپاتیکا به درون یک مایع میزبان در موجود زنده تعیین هویت می گردد و با پروتئوم ES آزمایشگاهی از خارج از میزبان و انگل های بالقوه ی تنش مقایسه می گردد.

- **دستورالعمل آزمایشی:**

تهیه و جمع آوری صفرا- کیسه های صفرا از غیر عفونی و به طور طبیعی کبدهای عفونی گوسفند فورا پیش از کشتار از یک کشتارگاه محلی جمع می گردد . حالت عفونی توسط سرویس های بهداشتی گوشت بریتانیا برای گواهی تعیین هویت از پاتولوژی کلینیکی مشترک با آلودگی فاسیولا تائید می شود . به علاوه عفونت کرم کبد همچنین فورا توسط حضور فیزیکیF هپاتیکای بالغ در کبد و مجراهای صفراوی و بعدا توسط تخم در استخراج نمونه های صفراوی و بعدا توسط تخم در استخراج نمونه های صفرا تائید می شود . مایع صفرا از هشت کیسه ی صفرای غیر عفونی و 9 کیسه ی صفرای عفونی با کرم کبد، از طریق سرنگ و سوزن استریل بدست آمده است . تعداد کرم کبد بالغ از 14 تا 65 شخص یا فرد در نمونه ی عفونی تعیین شده است .

مراقبت از هجوم مواد انگلی دفعی در عفونت نمونه های صفراوی انجام می گیرد. نمونه های صفراوی منحصر به فرد در 0005 / 21 ، سانتریوفوژ می شود سپس صاف می گردد (دفع تخم انگل و دیگر مواد ذره ای) و سپس با 50 ٪ اتانول برای دفع بیشتر ترکیبات غیر پروتئینی یافت شده در صفرا رسوب داده می شود. نمونه های صفراوی بیشتر از طریق سانتریوفوژ در 15 min در g × 000/ 21 در 4 C صاف می شود . بعد از سانتریوفوژ سوپرناتانت با یخ سرد 10٪ TCA ، استون ، ته نشین می گردد. نمونه های

صفرا در بافر 1 (محتوی 6 مولار اوره، 1/5 مولار تیوره 3٪ (w/ v)CHAPS ،66 میلی مولار DTT ، 0/5 ٪ (V/v) ناقل امفولیت و ممانعت کننده ی پروتئازها) دوباره حل می گردد.

جمع آوری و تهیه ی تولیدات ES – عصاره ی کبدی F هپاتیک از عفونت طبیعی جگر گوسفند در روز کشتار جمع می گردد تا برای کمتر از 6 دفعه در PbS ، PH 3/ 7 در 37 C شسته شود تا به انگل اجازه دهد که محتویات روده ای را برگرداند و مواد میزبانی را دفع کند .

تولیدات ES به عنوان تشریح پیشین با تغییرات کوچک به کار گرفته شده و 10 کرم کبد در درمان برگشتی جمع می گردد . کرم کبد برای 2، 4 ، 8 و 16 ساعت درC 37 کشت داده می شود . نگهداری محیط کشت به تنهایی ، کرم های کبد دست نخورده قرار می دهد و همه زنده می مانند . وقتی که در دوره ی زمانی تعیین شده دفع می گردند . تولیدات ES از طریق سانتریوفوژ g 4000 در min 15 در C 4 صاف می گردند .

سوپر ناتانت ES بیش تر در g 000, 45 برایmin 20 سانتریوفوژ می گردد. یک حجم 5 میلی لیتری از تولیدات ES از هر دوره ی زمانی با یخ سرد ٪ 10 TCA ، استون ته نشین می گردد. نتایج پلیت های پروتئین دوباره درون بافر II حل می گردد. (محتوای m 8 اوره، 2٪ (w/ v) CHAPS ، 33 m m DTT و ٪ 0/5 (V/v) ناقل آمفولیت ها و ممانعت کننده ی پروتئاز). در زمان یکسان از آماده سازی تولیداتES از F هپاتیکای کبدی یک نسبت از عصاری کرم کبد در ٪1 بنزوکائین در اتانول نهایی می گردد و در یک محیط کشت اصلی کرم کبدجگر قرار می گیرد. کرم کبد نهایی جگر برای انکوباسیون در C 37 برای 4 ساعت اجازه داده می شود . نتایج محیط کشت ها ، محتوی تولیدات رها شده ی غیر مخصوص از کرم کبد نهایی به درستی به عنوان تولیدات ES از کرم کبد کشت شده مثل آنچه در بالا شرح داده شد آماده می گردد./

سلام بر بنده و رسول خدا، حضرت محمد (ص)، سلام بر بنده و ولیّ خدا، حضرت علی (ع)، سلام بر کاملترین مخلوق و حجّت خدا ، حضرت مهدی(عج).

Jadeye_tariki@yahoo.com
کتابخانه نیلوفر آبی: http://nilofare-abi-lib.blogfa.com
تارنگار نیلوفر آبی: http://nilofare-abi.persianblog.ir
سایت استاد محمّد رضا یحیایی: http://mry14mn.ir & http://www.mry14mn.net & http://www.mry14mn.com

شهریور ماه 1387 خورشیدی. تنظیم و ویرایش: امیر نعمتی.