

مقایسه و ارزیابی تولید پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی پروتواسکولکس اکینوкокوس گرانولوزوس در محیط‌های کشت RPMI، DMEM و PBS غنی شده با گلوکز

دکتر علی هانیلو^۱، فائزه نجفی^۲، دکتر اصغر فضائلی^۱، دکتر عباسعلی نوریان^۱

نویسنده مسئول: زنجان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی faezeh_najafi@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۱۲/۲۲ پذیرش: ۸۹/۵/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: تهیه آنتی‌ژن مناسب از موضوعات مهم در زمینه‌ی تشخیص سرولوژیک هیداتیدوز می‌باشد. پژوهشگران با کشت کوتاه مدت پروتواسکولکس‌ها در چند محیط مختلف توانسته‌اند به آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌هی دسترسی پیدا کنند. با این حال تاکنون مقایسه‌ای در خصوص میزان تولید این آنتی‌ژن‌ها در محیط‌های مختلف انجام نشده است. در این پژوهش، میزان تولید پروتئین‌های (آنتی‌ژن‌های) دفعی - ترش‌هی از طریق کشت کوتاه مدت پروتواسکولکس‌ها در محیط‌های RPMI، DMEM و PBS غنی‌شده با گلوکز مورد مطالعه قرار گرفتند.

روش بررسی: برای تهیه‌ی پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی، پروتواسکولکس‌های اکینوкокوس در محیط‌های RPMI، DMEM و PBS غنی‌شده با گلوکز به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. پس از تغلیظ و سنجش پروتئین‌های تولید شده، به منظور شناسایی اجزای مختلف آن‌ها، با روش SDS-PAGE الکتروفورز شدند. داده‌ها از طریق آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی در زمان ۲۴ ساعته‌ی کشت در محیط PBS (۱۶/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به RPMI (۷/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) و DMEM (۱۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). در حالی‌که این تفاوت بین غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی در محیط RPMI و DMEM مشاهده نشد. پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی به‌دست آمده از محیط PBS به ۱۲ باند اصلی و محیط‌های RPMI و DMEM هر کدام به ۱۴ باند اصلی در محدوده‌ی وزن ملکولی ۱۶ تا ۶۷ کیلو دالتون تفکیک شدند.

نتیجه‌گیری: برای تهیه‌ی پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی پروتواسکولکس، محیط PBS غنی‌شده با گلوکز نسبت به دو محیط دیگر مناسب‌تر است. حداکثر زمان مناسب برای تولید این پروتئین‌ها، تا ۴۸ ساعت بعد از کشت اولیه پروتواسکولکس‌ها می‌باشد.

واژگان کلیدی: اکینوкокوس گرانولوزوس، پروتواسکولکس، آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌هی

مقدمه

می‌شود. در این عفونت کیست‌های تک حفره‌ای پر از مایع در اعضای داخلی به ویژه کبد و ریه ایجاد می‌شوند. کیست‌ها متشکل از لایه‌ی مطبق خارجی و لایه‌ی زیای داخلی

بیماری کیست هیداتیک یک عفونت مزمن انگلی است که توسط مرحله‌ی لاروی سستودی به نام اکینوкокوس گرانولوزوس (*Echinococcus granulosus*) ایجاد

۱- دکترای تخصصی انگل‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۲- کارشناس ارشد انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

می‌باشند. کپسول‌های حاوی پروتواسکولکس از غشای زایا منشا می‌گیرند (۱). مایع کیست هیداتیک یکی از منابع مهم آنتی‌ژنیک برای تشخیص سرولوژیک هیداتیدوز به شمار می‌آید که مخلوطی از آنتی‌ژن‌های انگل و ترکیبات میزبان نظیر آلبومین می‌باشد (۲). امروزه با توسعه‌ی تکنیک‌های مختلف تشخیص سرولوژیک نظیر الایزا و وسترن‌بلاتینگ، کاربرد این آنتی‌ژن‌ها اهمیت زیادی پیدا کرده است (۵-۳)، به نحوی که برای تهیه، تخلیص و تغلیظ آنتی‌ژن‌های اصلی کیست هیداتیک، روش‌ها و فنون مختلفی ابداع شده‌اند (۲، ۶). با این حال دستیابی به آنتی‌ژن خالص‌تر در مقادیر مورد نیاز، همیشه یکی از مشکلات و موانع پیش‌روی پژوهشگران بوده است. چراکه از یک سو با بکارگیری مواد و تجهیزات پیچیده و پرهزینه‌ی تخلیص آنتی‌ژن و از سوی دیگر با موضوع استاندارد کردن این آنتی‌ژن‌ها از نظر کیفی و کمی روبرو هستند (۶). از آنجایی که پروتواسکولکس‌ها از منابع دیگر آنتی‌ژنیک به شمار می‌آیند و باعث تولید آنتی‌بادی در بدن میزبان می‌شوند (۷ و ۸). پژوهشگران در رویکردی جدید به روش‌های تهیه آنتی‌ژن، با کشت پروتواسکولکس‌های انگل در محیط‌های مختلف توانسته‌اند به آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌هی (Excretory/Secretory Ags) دسترسی پیدا کنند (۹ و ۱۰) و در مواردی نیز کارایی این آنتی‌ژن‌ها و سایر آنتی‌ژن‌های پیکره‌ی پروتواسکولکس‌را در تشخیص سرولوژیک بیماری ارزیابی کنند (۴، ۷، ۸ و ۱۱). در دو پژوهش جداگانه جهت دستیابی به آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌هی (E/S Ags)، پروتواسکولکس‌های اکینووکوس گرانولوزوس در محیط PBS (Phosphate Buffered Saline) غنی شده با گلوکز به مدت ۵۰ ساعت کشت داده شدند. بعد از جمع‌آوری و تغلیظ ترکیبات دفعی - ترش‌هی، به مقادیر قابل توجه پروتئین (۲/۰ میلی گرم در میلی لیتر) دست پیدا کردند (۹ و ۱۰). در تجربه‌ی دیگری توانستند، پروتواسکولکس‌ها را در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium)

کشت دهند که بعد از ۵۶ روز حداقل ۱۰ درصد آن‌ها زنده بودند (۱۲). به نظر می‌رسد محیط مذکور نیز برای کشت کوتاه مدت و تهیه‌ی پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی پروتواسکولکس مناسب باشد. اخیراً کارمنا و همکارانش با کشت پروتواسکولکس‌ها در محیط PBS غنی شده با گلوکز توانستند ۲۰ ترکیب پروتئینی با اوزان ملکولی ۹ تا ۳۰۰ کیلودالتون را در ترکیبات دفعی - ترش‌هی شناسایی کنند (۱۳). در مجموع آنتی‌ژن‌های پیکره‌ی پروتواسکولکس‌ها از همان ابتدا در تشخیص سرولوژیک هیداتیدوز مطرح بوده است، اما کشت کوتاه مدت آن‌ها در محیط کشت برای تولید پروتئین‌های (آنتی‌ژن‌های) دفعی - ترش‌هی موضوع جدیدی است. از آن جهت که این پروتئین‌ها همگی با منشا پروتواسکولکس هستند و فاقد ترکیبات آلوده کننده‌ی میزبان می‌باشند، در تشخیص سرولوژیک بیماری مورد توجه قرار گرفته‌اند. با این حال یکی از مشکلات عملی در این زمینه دستیابی به مقادیر کافی از این پروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط‌های مختلف بر متابولیسم میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه بر ترشح و دفع متابولیت‌ها تأثیر به‌سزایی دارد. بنابراین امکان دارد پروتواسکولکس‌ها در محیط‌های مختلف کشت، مقادیر متفاوتی پروتئین ترشح کنند. به لحاظ فقدان اطلاعات کافی در این زمینه، در این پژوهش میزان تولید، و اجزای تشکیل دهنده‌ی پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی پروتواسکولکس در سه محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)، RPMI و PBS غنی شده با گلوکز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته‌اند.

روش بررسی

جمع‌آوری و تهیه پروتواسکولکس‌ها: کبدهای آلوده به کیست هیداتیک از گوسفندان تازه کشتار شده انتخاب و پروتواسکولکس‌ها در شرایط آسپتیک با پونکسیون کیست‌های

صرفاً جهت کنترل بیشتر، الکتروفورز شد. وزن مولکولی باندهای تفکیک شده توسط نرم افزار آنالیز کننده تصاویر ژل (FireReader 1D Software, UVItc, Cambridge) تعیین گردید.

آنالیز آماری: میانگین و سایر شاخص‌های آماری غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی در هر سه محیط کشت محاسبه شد. با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، جهت مقایسه‌ی میانگین غلظت‌ها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و توکی (Tukey-HSD) استفاده گردید.

یافته‌ها

ارزیابی و مقایسه‌ی غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی: غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی در زمان ۲۴ ساعته‌ی کشت در محیط PBS نسبت به RPMI و DMEM به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). همچنین غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی در زمان ۴۸ ساعته‌ی کشت در محیط PBS نسبت به RPMI به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). در حالی‌که این تفاوت بین غلظت پروتئین‌ها در محیط‌های PBS و DMEM و همچنین بین RPMI و DMEM مشاهده نشد. تفاوت معنی‌داری بین غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی در زمان ۷۲ ساعته‌ی کشت در محیط‌های PBS، RPMI و DMEM مشاهده نشد (جدول ۱).

مقایسه‌ی غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی در زمان‌های مختلف گرچه نشان دهنده‌ی روند نزولی میزان تولید آن در هر سه محیط بود، اما کاهش معنی‌دار تولید پروتئین‌ها فقط در محیط‌های PBS و RPMI اتفاق افتاده بود ($P < 0.05$). به طوری‌که در محیط PBS از ۱۶/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعته به ۶/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۶ درصد میزان اولیه) در زمان ۷۲ ساعته کاهش پیدا کرد.

بارور جمع‌آوری شدند. سپس پروتواسکولکس‌ها با بافر فسفات سالین (PBS, pH=۷/۲) حاوی جتتامایسین (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) ۳ بار شستشو شدند (۱۴). زنده بودن پروتواسکولکس‌ها از طریق تست دفع اثوزین و فعالیت سلول‌های شعله‌ای تعیین گردید (۱۵). نمونه‌هایی که بیش از ۹۰ درصد پروتواسکولکس زنده داشتند، جهت کشت مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت پروتواسکولکس و تهیه‌ی پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی: برای تهیه‌ی پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی پروتواسکولکس، از محیط‌های کشت DMEM, RPMI₁₆₄₀ و محیط PBS غنی شده با گلوکز ۱۰ درصد استفاده شد. کشت پروتواسکولکس‌ها بر اساس روش کارمنا و همکارانش (۱۰) با اندکی اصلاحات انجام گرفت. به طور خلاصه، در فلاسک کشت سلولی مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از پروتواسکولکس با ۹/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مخلوط و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با فشار ۵ درصد CO₂ به مدت ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد. هر ۲۴ ساعت یکبار محیط کشت حاوی پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی جمع‌آوری و معادل آن محیط تازه اضافه شد. همزمان درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها برآورد شد. کشت پروتواسکولکس‌ها برای هر محیط به طور جداگانه ۱۰ نوبت با شرایط یکسان تکرار شد. پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی توسط سیستم اولترافیلتراسیون (Amicon® Ultra, UFC900324, Millipore) با نیروی ۵۰۰g به مدت حداکثر ۷۰ دقیقه طبق دستورالعمل شرکت سازنده تغلیظ شدند. غلظت پروتئین‌های تهیه شده به روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفت (۱۶).

شناسایی اجزای پروتئین‌های دفعی - ترش‌شی: به منظور شناسایی اجزای پروتئین‌ها از روش SDS-PAGE استفاده شد. در این روش پروتئین‌های تغلیظ شده تحت شرایط احیا بر روی ژل ۱۲/۵ درصد پلی‌آکریل‌امید الکتروفورز و با روش کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شدند (۱۶). همزمان مایع هیداتیک نیز

جدول ۱: غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی پروتواسکولکس در محیط‌های مختلف بر حسب زمان کشت.

زمان کشت (ساعت)	میانگین $\pm$ خطای معیار غلظت پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		
	RPMI	DMEM	PBS
۲۴	$7/4 \pm 1/1$	$10/3 \pm 1/3$	$16/8 \pm 1/9^*$
۴۸	$3 \pm 1/5$	$6/9 \pm 2/1$	$10/9 \pm 2/5^{**}$
۷۲	$1/7 \pm 0/9$	$3/9 \pm 1/9$	$6/1 \pm 2/3$

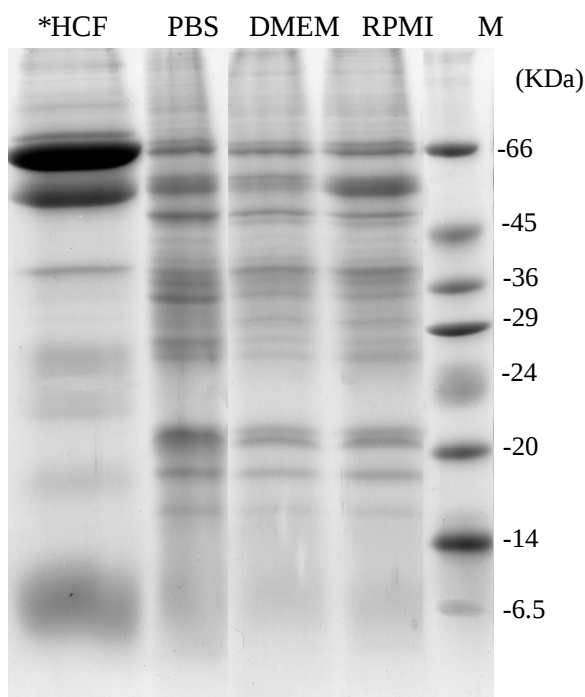
* غلظت پروتئین‌ها در محیط PBS نسبت به دو محیط دیگر به طور معنی‌دار بیشتر است ($P < 0/05$).

** غلظت پروتئین‌ها در محیط PBS نسبت به محیط RPMI به طور معنی‌دار بیشتر است ($P < 0/05$).

در همین محیط کاهش معنی‌داری بین کشت ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته دیده نشد. در محیط RPMI میزان تولید

پروتئین در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعته نسبت به زمان ۲۴ ساعته دارای بیشترین کاهش بود ($P < 0/05$). به طوری که در زمان ۷۲ ساعته‌ی کشت مقدار پروتئین به ۲۲ درصد میزان اولیه‌ی آن کاهش پیدا کرد.

ارزیابی اجزای پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی: نتایج حاصل از تفکیک پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی تهیه شده از سه محیط کشت و ترکیبات پروتئینی موجود در مایع کیست هیداتیک (HCF) نشان‌دهنده‌ی باندهای بارز و مشخص آن‌ها بود. همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی حاصل از محیط PBS غنی شده با گلوکز در شرایط احیای الکتروفورز به ۱۲ باند اصلی و پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی موجود در محیط کشت RPMI و DMEM هر کدام به ۱۴ باند اصلی در دامنه‌ی اوزان ملکولی ۱۶ تا ۶۷ کیلودالتون تفکیک شدند.



شکل ۱: تفکیک پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی پروتواسکولکس و پروتئین‌های مایع هیداتیک (HCF) بر روی ژل ۱۲/۵ درصد آکریل‌آمید در شرایط احیا شده SDS-PAGE. * به ترتیب مقادیر ۳۰ میکروگرم مایع هیداتیک (HCF)، ۲۰ میکروگرم از پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی محیط‌های کشت و ۲۰ میکرولیتر مارکر ($M = \text{Sigma Marker, M3913}$) بارگذاری شده‌اند.

موجود در محیط PBS در دو محیط دیگر مشاهده نگردید. وزن ملکولی اجزای مختلف پروتئین‌های دفعی - ترش‌حی و مایع هیداتیک به تفکیک در جدول ۲ آمده است.

پروتئین‌های دفعی - ترش‌حی حاصل از محیط PBS فاقد باندهای ۲۲، ۳۰ و ۴۸ کیلودالتونی بود و از این نظر با پروتئین‌های دفعی - ترش‌حی حاصل از دو محیط دیگر تفاوت داشتند. از طرف دیگر باند ۳۶ کیلودالتونی

جدول ۲: وزن مولکولی (KDa) اجزای پروتئین‌های دفعی - ترش‌حی در محیط‌های کشت و مایع کیست هیداتیک

مایع کیست هیداتیک (HCF)	محیط کشت		
	PBS	DMEM	RPMI
۶۹	-	-	-
-	۶۷	۶۷	۶۷
۶۶	۶۶	۶۶	۶۶
۵۶	۵۶	۵۶	۵۶
-	۴۹	۴۹	۴۹
-	-	۴۸	۴۸
۳۸	۳۸	۳۸	۳۸
-	۳۶	-	-
-	۳۴	۳۴	۳۴
-	-	۳۰	۳۰
-	۲۸	۲۸	۲۸
-	۲۶	۲۶	۲۶
۲۲	-	۲۲	۲۲
-	۲۱	۲۱	۲۱
۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
-	۱۶	۱۶	۱۶
۱۰	-	-	-

درصد زنده بودن پروتواسکولکس در محیط‌های مختلف در زمان‌های مشابه مشاهده نشد. هم‌چنین میزان درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت گرچه روند نزولی داشته است، اما در هیچ یک از محیط‌ها کاهش معنی‌دار نبوده است.

ارزیابی و سنجش درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها: نتایج آنالیز درصد زنده بودن پروتواسکولکس در زمان‌های صفر (شروع کشت)، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت در محیط‌های PBS، DMEM و RPMI در جدول ۳ جمع‌بندی و ارایه شده است. تفاوت معنی‌داری در میانگین

جدول ۳: درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها در زمان‌های صفر (شروع کشت)، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعته کشت در محیط‌های مختلف

محیط کشت	میانگین $\pm$ خطای معیار درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها			
	زمان صفر	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
PBS	$94/8 \pm 0/9$	$91/6 \pm 1/2$	$90/9 \pm 1/4$	$90/2 \pm 1/5$
DMEM	$94/8 \pm 0/6$	$94/2 \pm 0/9$	$93/4 \pm 1$	$92/4 \pm 1$
RPMI	$95/4 \pm 0/3$	$94/6 \pm 0/5$	$93/9 \pm 0/7$	$93/1 \pm 1$

بحث

پژوهشگران در رویکردی جدید با کشت پروتواسکولکس اکینوкокوس در محیط PBS غنی شده با گلوکز، توانسته‌اند به پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی انگل دسترسی پیدا کنند (۹ و ۱۰) و در مواردی نیز کارآیی آنتی‌ژنیک این پروتئین‌ها را در تشخیص سرولوژیک بیماری ارزیابی کنند (۱۳ و ۴). در مطالعه‌ی ما مشخص شد که از هر سه محیط کشت PBS، DMEM و RPMI می‌توان برای به‌دست آوردن پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی استفاده کرد، اما غلظت این فرآورده‌ها به ویژه در ۲۴ ساعت اول کشت در محیط PBS غنی شده با گلوکز ۱۰ درصد نسبت به دو محیط دیگر به طور معنی‌داری بیشتر می‌باشد، هم‌چنین غلظت این پروتئین‌ها در زمان ۴۸ ساعته کشت، در محیط PBS نسبت به RPMI به طور معنی‌داری بیشتر بود، متابولیسم کربوهیدرات‌ها در کرم بالغ سستوها عمدتاً بی‌هوازی است، گلوکز و گالاکتوز تنها منبع شناخته شده‌ی کربوهیدرات‌ها هستند که توسط سستوها متابولیزه می‌شوند، این قندها از طریق تگومنت سستوها به طور فعال وارد بدن می‌شود و به عنوان یک منبع عمده‌ی انرژی مورد استفاده کرم قرار می‌گیرد (۱۷). در مورد پروتواسکولکس اکینوкокوس جذب گلوکز هم به صورت غیرفعال و هم با واسطه‌ی یون سدیم به صورت فعال می‌باشد (۱۸). بنابراین ترکیبات محیط کشت و درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها می‌تواند از فاکتورهای موثر در متابولیسم و تولید پروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌هی از

پروتواسکولکس تلقی گردند، با توجه به این که درصد زنده‌بودن پروتواسکولکس‌ها در سه محیط مختلف در زمان‌های مشابه اختلاف قابل توجهی نداشتند، به نظر می‌رسد تفاوت مشاهده شده در غلظت پروتئین‌ها و بالا بودن آن در محیط PBS مربوط به غلظت بیشتر گلوکز باشد، در پژوهش‌های دیگری که از محیط PBS غنی‌شده با گلوکز ۱۰ درصد برای کشت کوتاه مدت پروتواسکولکس‌ها استفاده شده است، به مقادیر قابل توجهی (۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر) از فرآورده‌های دفعی ترش‌هی دست پیدا کرده‌اند (۱۰-۸). البته این مقدار بعد از تغلیظ حجم اولیه‌ی محیط کشت به‌دست آمده است و بدیهی است که میزان غلظت متناسب با ضریب تغلیظ افزایش پیدا می‌کند، متأسفانه غلظت اولیه‌ی این آنتی‌ژن‌ها در هیچ یک از این پژوهش‌ها بیان نشده است. بنابر این مبنای یکسانی برای مقایسه‌ی غلظت پروتئین‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر با مطالعات قبلی وجود نداشت، ما نیز در این مطالعه با استفاده از اولترافیلتراسیون با تغلیظ ۱۰ برابر هریک از محیط‌های کشت به مقادیر بالای غلظت فرآورده‌های دفعی - ترش‌هی (حداکثر تا ۰/۲۶ میلی گرم در میلی لیتر) دست پیدا کردیم. نتایج تفکیک پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی تهیه شده از سه محیط کشت بر روی ژل ۱۲/۵ درصد آکریل آمید نشان‌دهنده‌ی باندهای بارز و مشخص آن‌ها می‌باشد (شکل ۱)، به طوری که پروتئین‌های دفعی - ترش‌هی موجود در محیط PBS در شرایط احیای

دیده نشده است. بنابراین به اعتقاد وی این زیرواحد ممکن است در کشت طولانی مدت ترشح شود یا این که امکان دارد منشا اصلی آن پروتواسکولکس ها نباشد و از بخش های دیگر کیست هیداتیک نظیر لایه ی زایا ترشح می شود. با این حال زیرواحدهای دیگر آنتی ژن های اصلی کیست هیداتیک نظیر زیرواحد ۱۶ آنتی ژن B و زیر واحد ۳۸ آنتی ژن ۵ کماکان قابل مشاهده بودند و در هر سه محیط کشت ترشح می شوند.

نتیجه گیری

این پژوهش نشان داد که پروتئین های دفعی - ترشحی در محیط PBS غنی شده با گلوکز ۱۰ درصد نسبت به دو محیط دیگر بیشتر تولید می شود. بنابراین به نظر می رسد که محیط مذکور برای تهیه ی آنتی ژن های دفعی - ترشحی مناسب تر باشد و محیط DMEM به عنوان دومین گزینه به علت پایداری نسبی تولید پروتئین ها تا زمان ۷۲ ساعت به ویژه در شرایطی که دسترسی به پروتواسکولکس محدود باشد، مناسب خواهد بود. پیشنهاد می گردد در پژوهش های بعدی تاثیر غلظت های مختلف گلوکز بر تولید پروتئین های دفعی - ترشحی مورد مطالعه قرار گیرد و برای تعیین و شناسایی اجزای آنتی ژنیک این پروتئین ها مطالعه ای بر روی بیماران مبتلا به کیست هیداتیک با روش ایمونوبلاتینگ انجام شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان به دلیل حمایت های مالی و مساعدت در اجرای پژوهش اعلام می نمایند. لازم به ذکر است که این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد انگل شناسی می باشد.

الکتروفورز به ۱۲ باند اصلی و قابل مشاهده تفکیک شدند. اما پروتئین های دفعی - ترشحی موجود در محیط های RPMI و DMEM به ۱۴ باند تفکیک شدند که وزن ملکولی باندها در سه محیط از ۱۶ تا ۶۷ کیلودالتون برآورد شد. پیش از این، در مطالعه ای به منظور شناسایی آنتی ژن های دفعی - ترشحی و ارزیابی آن ها در تشخیص هیداتیدوز انسانی با کشت پروتواسکولکس های انگل در محیط PBS غنی شده با گلوکز و سپس استفاده از روش SDS-PAGE، ۱۴ قسمت عمده ی پروتئینی با اوزان مولکولی ۱۳، ۱۶، ۲۱، ۲۹، ۳۱، ۳۴، ۳۵، ۳۸، ۴۳، ۴۷، ۵۵، ۶۵، ۶۹ و ۹۰ کیلودالتون شناسایی کردند (۱۳) که باندهای ۱۶، ۲۱، ۳۴ و ۳۸ به طور دقیق با باندهای حاصل از مطالعه ی ما مطابقت دارد و باندهای ۲۹، ۳۱، ۳۵، ۴۷، ۵۵ و ۶۵ به ترتیب با باندهای ۲۸، ۳۰، ۳۶، ۴۸، ۵۶ و ۶۶ کیلودالتون مطالعه ی حاضر هم خوانی دارد. البته اختلاف اندک مشاهده شده در اوزان مولکولی ممکن است به شرایط الکتروفورز و همچنین خطای برآورد وزن مولکولی این زیرواحدها مربوط باشد. در پژوهش دیگری کارمنا و همکارانش ۷ قسمت آنتی ژنیک فرآورده های دفعی - ترشحی در محدوده ی ۴۶ تا ۱۳۳ کیلودالتون را شناسایی کردند که با سرم سگ های آلوده به اکینوкокوس گرانولوزوس واکنش نشان دادند (۸). در مطالعه ی ما باندهای ۲۲، ۳۰ و ۴۸ کیلودالتونی در پروتئین های دفعی - ترشحی محیط DMEM و RPMI مشاهده شد و به طور کلی تعداد و وزن مولکولی باندهای پروتئینی در محیط های DMEM و RPMI یکسان بود. از طرف دیگر باند ۳۶ کیلودالتونی تنها در محیط PBS مشاهده گردید. باند ۸ کیلودالتونی به عنوان کوچکترین و اختصاصی ترین زیر واحد آنتی ژن B (۴) در هیچ یک از محیط های کشت یا تولید نشد یا این که به اندازه ای ترشح شد که با روش رنگ آمیزی کوماسی بلو ژل الکتروفورز قابل مشاهده نبود. البته در مطالعه ی کارمنا و همکارانش (۱۳) که از رنگ آمیزی حساس تر نیترات نقره بهره گرفته اند، کماکان این زیر واحد

References

- 1- Eckert J, Deplazes P. Biological epidemiological and clinical aspects of echinococcosis: A zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 107-35.
- 2- Thompson RCA. Echinococcosis. In: Gillespie SH, Pearson RD, eds. *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. England: John Wiley & Sons; 2000: 585-612.
- 3- Mamuti W, Sako Y, Nakao M, et al. Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int.* 2006; 55: S57-S62.
- 4- Carmena D, Benito A, Eraso E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Act Trop.* 2006; 98: 74-86.
- 5- Haniloo A, Massoud J, Rokni MB. Evaluation and comparison of antigen B-ELISA and antigen B-immunoblotting in immunodiagnosis of cystic hydatid disease. *Pak J Med Sci.* 2005; 21: 352-6.
- 6- Lightowlers MW, Gottstien B. Echinococcosis/Hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, eds. *Echinococcus and Hydatid Disease*. UK, Wallingford: CAB International; 1995: 355-410.
- 7- Rafiei A, Craig PS. The immunodiagnostic potential of protoscoleces antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. *Ann Trop Med parasitol.* 2002; 94: 383-9.
- 8- Carmena D, Benito A, Martinez J, Guisantes JA. Preliminary study of the presence of antibodies against excretory-secretory antigens from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in dogs with intestinal echinococcosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2005; 100: 311-7.
- 9- Carmena D, Martinez J, Benito A, Guisantes JA. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2005; 100: 861-7.
- 10- Carmena D, Benito A, Postigo I, Arteaga J, Martinez J, Guisantes JA. Short term culture of protoscoleces to obtain excretory-secretory proteins of *Echinococcus granulosus*. *Res Rev Parasitol.* 2002; 62: 84-8.
- 11- Gasser RB, Lightowlers MW, Rickard MD. Identification of protein components of *Echinococcus granulosus* protoscoleces antigens for specific serodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs. *Parasite Immunol.* 1989; 11: 279-91.
- 12- Zhang WB, Jones Mk, LI J, McManus DP. *Echinococcus granulosus*: Preculture of protoscoleces in vitro significantly increases development and viability of secondary hydatid cysts in mice. *Exp Parasitol.* 2005; 110: 88-90.
- 13- Carmena D, Martinez J, Benito A, Guisantes JA. Characterization of excretory-secretory products from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitol.* 2004; 129: 371-8.
- 14- Haniloo A, Ghasemi F, sheikhi AK, Ghavami MB. Immunoregulatory cytokine (TGF- β and IL-10) responses in mice inoculated with protoscoleces and major hydatid fluid antigens of

- cystic echinococcosis. *Iranian J parasitol.* 2008; 3: 18-23.
- 15- Rabinson RD, Arme G. *Echinococcus granulosus*: Failure of the eosin exclusion test to demonstrate death of protoscoleces. *Ann Trop Med Parasitol.* 1985; 79: 117-23.
- 16- Bollag DM, Edelstien SJ. Protein methods. New York: Wiley-Liss Inc; 1991.
- 17- Noble ER, Noble GA, Schad GA, MacInnes AJ. Parasitology: The Biology of Animal Parasites. London: Lea and Febiger; 1989.
- 18- Jeffs SA, Arme C. Glucose transport in protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (cestoda). *Comparative biochemistry and physiology.* 1988; 91: 203-7.

***Comparison and Evaluation of Echinococcus granulosus Protoscoleces
Excretory/Secretory Proteins in PBS Complemented with Glucose, DMEM and
RPMI Culture Media***

Haniloo A¹, Najafi F¹, Fazaeli A¹, Nourian A¹

¹Dept. of Parasitology and Entomology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Najafi F, Dept. of Parasitology and Entomology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Email: faezeh_najafi@yahoo.com

Received: 13 Mar 2010 **Accepted:** 17 Aug 2010

Background and Objective: Preparation of proper antigens is an important issue in serology of hydatidosis. Investigators have been able to obtain excretory/secretory antigens (E/S Ags) by short-term culture of protoscoleces in a couple of culture media. However, no data are available about production rate of such antigens in different culture media. The present study was carried out to evaluate the production of E/S Ags (proteins) in PBS complemented with glucose, DMEM and RPMI culture media.

Material and Methods: To obtain E/S proteins, protoscoleces of echinococcus were cultured in PBS complemented with 10% glucose, RPMI and DMEM for 72 hours. Proteins secreted in culture media were concentrated and assayed. To characterize different components, proteins were electrophoresed on SDS-PAGE. Data were analyzed using One-way ANOVA and Tukey HSD tests.

Results: The mean concentration of E/S proteins in PBS medium in 24 hours of culture was significantly higher than DMEM and RPMI ($P<0.05$). However, such a difference was not observed between E/S proteins in DMEM and RPMI media. E/S proteins obtained from PBS medium were separated into 12 major bands and the two other media into 14 major bands within a range of molecular masses of 16 to 67 kDa.

Conclusion: PBS complemented with glucose is more appropriate than the two other media for E/S proteins production. The best time to obtain E/S proteins is the first 48 hours of culture.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, *Protoscoleces*, *Excretory/Secretory antigens*