بررسی بعضی از خصوصیات آنزیمی اسید فسفاتاز در مراحل لگاریتمی و ایستای پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

امیر نوابی[۱]، سیمین دخت سلیمانی فرد[۲*]

۱) گروه انگل شناسی پزشکی، مرکز پزشکی الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲) گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۴

چکیده

مقدمه: لیشمانیا انگل درون سلولی اجباری بوده که طیف وسیعی از بیماری ها را ایجاد کرده و توسط پشه خاکی آلوده منتقل می گردد. این انگل در بدن پشه خاکی به فرم پروماستیگوت می باشد. رشد پروماستیگوت ها دارای دو مرحله لگاریتمیک غیر عفونت زا و ایستای عفونت زا است. با توجه به تجمع اسید فسفاتاز در مرحله ایستا و نقش آن در شدت بیماری زایی انگل در این مطالعه خصوصیات آنزیمی و میزان فعالیت اسید فسفاتاز، Vmax و Km آن در دو مرحله لگاریتمی و ایستا با یکدیگر مقایسه گردید.

مواد و روش ها: این مطالعه یک مطالعه مقطعی بوده و برای رسیدن به اهداف از پیش تعیین شده انگلLeishmania major(MRHO/IR/75/ER) از موش های Balb/c از قبل آلوده شده به محیط کشت منتقل و به شکل پروماستگوت رشد داده شد سپس با رسم منحنی رشد و بر اساس آن، پروماستیگوت های مراحل لگاریتمیک و ایستا از یکدیگر جدا شدند. نمونه های جمع آوری شده از هر مرحله از رشد پس از انجماد، همراه با بافر سدیم استات و Triton-X-100 هموژنیزه شده و پس از سانتریفیوژ، اسید فسفاتاز مایع رویی به روش کالریمتری اندازه گیری شد.

یافته های پژوهش: انگل های مرحله لگاریتمیک در روز چهارم و انگل های مرحله متاسیکلیک یا ایستا در روز هفتم رشد جمع آوری شدند. میزان فعالیت اسید فسفاتاز در پروماستیگوت های لگاریتمیک ۰/۹±۰/۰۳ و پروماستیگوت های ایستا ۱/۱۸±۰/۰۱ میکرومول به ازاء هر میلی گرم پروتئین در دقیقه اندازه گیری شد. هم چنین Vmax آنزیم اسید فسفاتاز در مرحله لگاریتمی ۷۵/۷۶±۰/۵۷ و در مرحله ایستا ۹۸/۰۴±۰/۹۶ μ_M/min/mgprotein و Km آن در مرحله لگاریتمی ۱۴۲/۹۳±۴/۰۸ μ_M و در مرحله ایستا ۱۰۶/۳۹±۱/۱۴ μ_M تعیین گردید.($P<0.05$)

بحث و نتیجه گیری: میزان فعالیت اسید فسفاتاز در پروماستیگوت های مرحله ایستا ۲۳ درصد نسبت به پروماستیگوت های لگاریتمی افزایش نشان داد. هم چنین Vmax مرحله ایستا نسبت به لگاریتمی ۲۳ درصد افزایش و Km آن ۲۸ درصد کاهش نشان داد. تغییرات در خصوصیات آنزیم اسید فسفاتاز طی مرحله رشد پروماستیگوت ها احتمالاً موجب مهیا شدن یکی از عوامل ضروری جهت مورد تهاجم قرار دادن ماکروفاژها توسط انگل است و این تغییرات از عوامل موثر در عفونی شدن پروماستیگوت ها می باشد.

واژه های کلیدی: لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت، اسید فسفاتاز، بیماری زایی

*نویسنده مسئول: گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

Email: S-Soleimanifard@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]

مقدمه

لیشمانیازیس به مجموعه ایی از بیماری ها اطلاق می شود که توسط گونه های مختلف انگل لیشمانیا که یک انگل درون سلولی اجباری است ایجاد شده و توسط نیش پشه خاکی آلوده منتقل می شود،(۱). سالیانه بیش از ۱۲ میلیون نفر از مردم جهان به این انگل آلوده می شوند،(۲). فرم پروماستیگوت انگل در دستگاه گوارش پشه خاکی آلوده مستقر بوده و در آن جا رشد و تکثیر می یابد. هم چنین در طی مراحل رشد، میزان عفونت زایی انگل تغییر می کند.(۳)

رشد و تکثیر پروماستیگوت ها دارای دو مرحله رشد سریع یا Logaritmic و ایستا یا Stationary می باشد. انگل در مرحله Logaritmic غیر عفونت زا و در مرحله Stationary عفونت زا بوده و قادر به نفوذ و استقرار در سلول های ماکروفاژ می باشد،(۴). پروماستیگوت های مرحله لگاریتمیک را اصطلاحاً پروسیکلیک و مرحله ایستا را متاسیکلیک گویند.

این دو مرحله دارای اختلافات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی می باشند از جمله، در لیشمانیا ماژور پروماستیگوت های مرحله لگاریتمی دارای یک پوشش سلولی نازک، تاژک کوتاه، کیسه تاژکی خالی می باشد در صورتی که پروماستیگوت های مرحله ایستا یا متاسیکلیک دارای پوشش سلولی ضخیم، تاژک هایی به طول ۱/۸ برابر طول تاژک در مرحله لگاریتمی همراه با کیسه تاژکی پر از مواد ترشحی و تعداد بسیار کمی ارگان های سلولی می باشد،(۵). از نظر ایمنولوژیکی نیز فرم متاسیکلیک مقاومت بیشتری در مقابل سرم انسانی و درجه حرارت های مختلف دارد.(۶)

علاوه بر موارد ذکر شده، بین سایر خصوصیات این دو مرحله از انگل نیز تفاوت هایی وجود دارد، از جمله می توان به تحرک بیشتر, پروتئین بیشتر و کربوهیدرات کمتر در مرحله متاسیکلیک اشاره کرد. هم چنین متاسیکلوژنز پروماستیگوت های لیشمانیا با تغییرات سطحی آنتی ژن های آن ها همراه می باشد. این تغییرات در مراحل مختلف رشد اختصاصی است،(۶). به عنوان مثال، دو پلی پپتید ۵۱ و ۱۱۴ کیلودالتون در فاز لگاریتمی L.major و L.donovani شناسایی شده اند که در حین ترانسفورماسیون به مرحله ایستا به پلی پپتید های ۳۸ و ۲۲ کیلو دالتونی تغییر یافته یا کلاً ناپدید می شوند. علاوه بر این یک پلی پپتید ۷۵ کیلودالتونی فقط در فاز متاسیکلیک لیشمانیا ماژور مشاهده شده است.(۶)

هم چنین در مرحله متاسیکلیک ظهور سطحی GP63 افزایش می یابد. GP63 نقش تسهیل کننده در پروسه ورود پروماستیگوت به ماکروفاژهارا دارد،(۷). همان طور که گفته شد حفره تاژکی همه تریپانوزوماتیده ها و از جمله لیشمانیا، ناحیه ای تخصص یافته و واسطه آندوسیتوز و ترشح اسید فسفاتاز می باشد،(۷). اسید فسفاتاز فراوان ترین پروتئین ترشحی لیشمانیا است،(۸). این آنزیم نخستین بار در سال ۱۹۲۵ شناسایی شد که در زنده ماندن انگل در بدن پشه خاکی، شکل گیری و تکامل واکوئل پارازیتوفوروس نقش داشته و با دفسفریله کردن غشاء و ممانعت از تولید H_2O_2 توسط ماکروفاژ در زنده ماندن انگل درون ماکروفاژ بسیار حائز اهمیت است،(۹). آنزیم اسید فسفاتاز از تولید آنیون های سوپر اکساید(O_2^-) توسط نوتروفیل ها و ماکروفاژها جلوگیری می کند و این به معنی تغییر جهت دادن دفاع سلول میزبان و خلع سلاح کردن آن است،(۹). یکی از عواملی که تصور می شود در حفظ و بقای انگل در داخل سلول های بدن میزبان مهره دار نقش دارد همین ملکول اسید فسفاتاز است.(۱۰،۱۱)

با توجه به مطالعات موجود و غیر عفونت زا بودن مرحله لگاریتمیک و عفونت زا بودن مرحله ایستا و تجمع اسید فسفاتاز در حفره تاژکی انگل در این مرحله به نظر می رسد اسید فسفاتاز یکی از عوامل موثر در شدت بیماری زایی انگل باشد بنا بر این در بررسی حاضر خصوصیات آنزیمی و میزان فعالیت اسید فسفاتاز در دو مرحله لگاریتمیک و ایستای انگل با یکدیگر مقایسه گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مقطعی بوده و در ابتدا برای حصول اهداف پیش بینی شده نیاز به تولید انبوه انگل لیشمانیا بود. به این منظور ابتدا (MRHO/IR/75/ER) Leishmania.major موجود در گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به قاعده دم موش Balb/c تلقیح شد. پس از گذشت مدت مناسب(حدود ۴ هفته) در محل تلقیح زخم لیشمانیوز ایجاد شد که منبع اماستیگوت مورد نیاز برای کشت بود. این کار برای اجتناب از استفاده از انگلی بود که پاساژ زیاد داده شده است. با اتوپسی موش های آلوده و تلقیح بافت های در گیر مثل غدد لنفاوی، کبد و طحال به داخل محیط کشت(Novy-MacNeal-Nicolle) NNN اصلاح شده، عمل کشت انجام گرفت. پس از رشد، پروماستیگوت ها از این محیط به محیط کشت، RPMI-1640 غنی شده با ۱۰ درصد(Fetal calf serum (FCS انتقال داده شد. با شمارش روزانه انگل های کشت داده شده منحنی رشد آن ها رسم گردید و با توجه به منحنی رشد و هم چنین

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]

مرفولوژی انگل های رشد یافته، روز مناسب جهت جمع آوری پروماستیگوت های مرحله لگاریتمی و مرحله ایستا تعیین گردید.

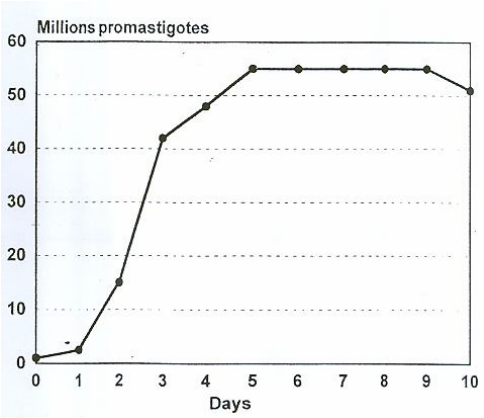
تهیه نمونه: پروماستیگوت های هر مرحله به تعداد ۵×۱۰^{۶} در میلی لیتر، پس از سه بار شستشو با PBS به طور جداگانه در ویال های اپندورف جمع آوری شد. سپس ۱ml بافر سدیم استات ۱/. M (PH۵/۲) و Triton-X-100 ۰/۱ درصد به پروماستیگوت های منجمد شده اضافه شد و به وسیله هموژنایزر تفلون، هموژنیزه و در ۱۸۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی برای اندازه گیری اسید فسفاتاز جمع آوری گردید.(۱۲)

اندازه گیری فعالیت اسید فسفاتاز: جهت اندازه گیری اسید فسفاتاز از سوبسترای پارانیتروفنل فسفات استفاده شد،(۱۳). طبق روش مذکور به ۲ میلی لیتر محلول بافری استات ۱۰۰ میلی مولار pH=4.5 مقدار یک میلی لیتر از سوبسترای تهیه شده در قسمت قبل افزوده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۲۷ درجه سانتی گراد با افزایش ۳۰۰ میکرو لیتر پارا نیترو فنل فسفات ۱۲۵ میلی مولار واکنش شروع و پس از مدت ۱۰ دقیقه میزان جذب پارا نیترو فنل حاصل در ۴۰۵ نانومتر اندزه گیری شد و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول سوبسترای هیدرولیز شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش گردید. جهت تائید فعالیت اسید فسفاتاز از مهار کننده تارتارات استفاده شد و از سرم کنترل راندوکس به عنوان شاهد استفاده گردید. همه مراحل آزمایش ۵ بار تکرار شده و نقطه میانگین به عنوان نتیجه نهایی در نظر گرفته شد.

محاسبه ضریب ثابت میکائیلیس منتون(Km) و سرعت ماکزیمم(Vmax) آنزیم اسید فسفاتاز: به این منظور با استفاده از کیت اسید فسفاتاز(زیست شیمی) و طبق پروتکل موجود در آن غلظت های سریالی از سوبسترا تهیه شد به این ترتیب غلظت های ۱۲۰۰ و ۶۰۰ و ۳۰۰ و ۱۵۰ به دست آمد. سپس فعالیت آنزیم در غلظت های متفاوت تهیه شده، محاسبه و با رسم منحنی میکائیلیس منتون و لینووربرگ Km و Vmax محاسبه شد،(۹). نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آماری wilcoxon و نرم افزار SPSS vol.16 تجزیه و تحلیل شد.

یافته های پژوهش

در این تحقیق نیاز به جداسازی مرحله لگاریتمی و ایستای انگل بود که علاوه بر مشخصات مرفولوژیکی بر پایه منحنی رشد انگل صورت گرفت. منحنی رشد پروماستیگوت ها در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. با توجه به منحنی رشد، مرحله لگاریتمی انگل از روز دوم تا روز پنجم ادامه داشته و سپس از روز پنجم مرحله ایستا شروع و تا روز نهم ادامه داشت. تعداد انگل ها در مرحله اخیر ثابت است. از روز نهم کاهش تدریجی در تعداد پروماستیگوت ها مشاهده شد. با توجه به این منحنی، پروماستیگوت های مرحله لگاریتمی و ایستا در روز چهارم و هفتم رشد جدا شدند.

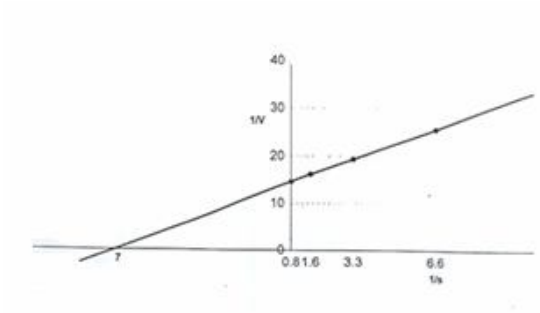


نمودار شماره ۱. منحنی رشد پروماستیگوت ها در محیط مصنوعی RPMI-1640

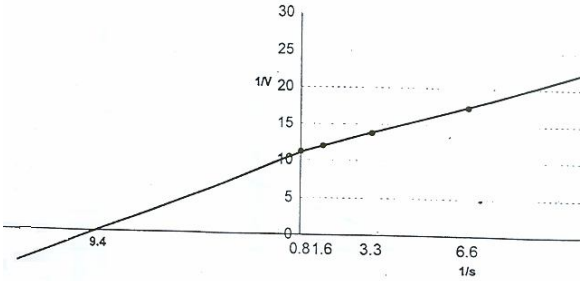
میزان فعالیت اسید فسفاتاز در پروماستیگوت های به دست آمده در دو مرحله در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می گرد میزان فعالیت آن در مرحله ایستا اختلاف معنی داری با مرحله لگاریتمی داشته($P<0.05$) و مقدار آن در مرحله ایستا حدود ۲۳ درصد نسبت به مرحله لگاریتمی افزایش نشان داده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]

تفاوت سرعت حداکثر آنزیم Vmax در دو مرحله لگاریتمی و ایستا با توجه به نمودارهای شماره ۲ و شماره ۳ به دست آمده و در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.($P<0.05$)

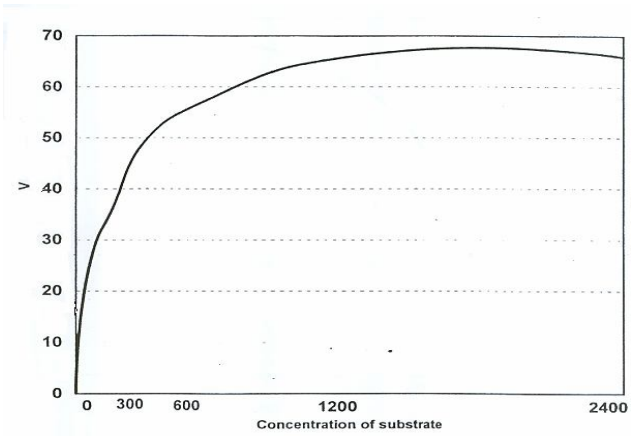


نمودار شماره ۲. منحنی لینووربرگ اسید فسفاتاز در مرحله لگاریتمی در محیط RPMI-1640



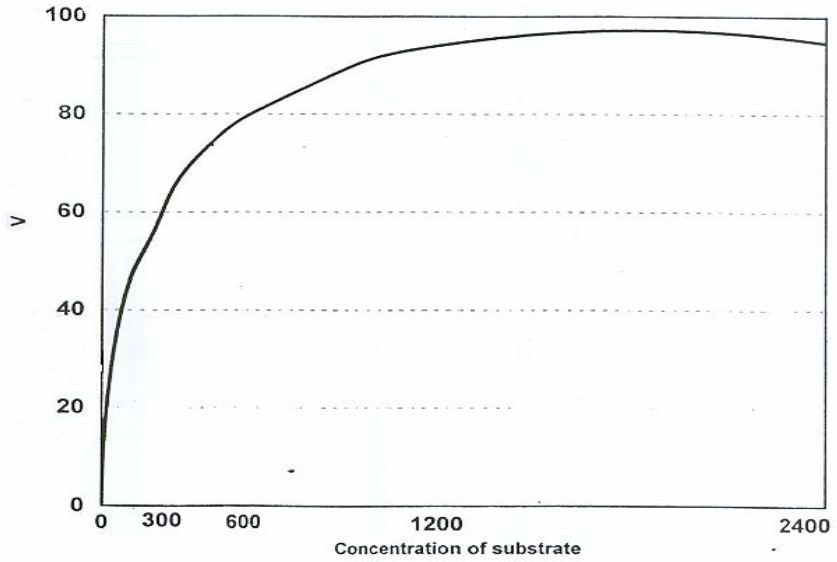
نمودار شماره ۳. منحنی لینووربرگ اسید فسفاتاز در مرحله ایستا در محیط RPMI-1640

میزان Km اسید فسفاتاز در پروماستیگوت های به دست آمده در دو مرحله لگاریتمی و ایستای منحنی رشد نیز در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان طور که در نمودار شماره ۴، Km اسید فسفاتاز در مرحله لگاریتمی و نمودار شماره ۵، Km اسید فسفاتاز در مرحله ایستا مشاهده می شود، میزان Km در پروماستیگوت های ایستا نسبت به پروماستیگوت های لگاریتمی کاهش نشان داده و اختلاف معنی داری بین آن دو دیده می شود.($P<0.05$)



نمودار شماره ٤. منحنی میکائیلیس منتون آنزیم اسید فسفاتاز در مرحله لگاریتمی در محیط RPMI-1640

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]



نمودارشماره ۵. منحنی میکائیلیس منتون آنزیم اسید فسفاتاز در مرحله ایستا در محیط RPMI-1640

جدول شماره ۱. فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز و خصوصیات آن درمحیط مصنوعی RPMI-1640 در دو مرحله رشد

مرحله رشد	Logarithmic	Stationary
فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز(IU)	0.9±0.03	1.8±0.01
μ_M/min/mgprotein Vmax	75.76±0.57	98.04±0.96
KmμM (μmolPNPP)	142.93±4.08	106.39±1.14

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر مطالعات مرتبط با لیشمانیوز چه از نظر فیزیولوزی و چه درمانی و تهیه واکسن حجم زیادی از تحقیقات را به خود اختصاص داده است. یکی از راه های موثر در مبارزه موفقیت آمیز با یک بیماری که شیوع زیادی را در مناطق وسیعی از کره زمین دارد، شناسایی ارگانیسم عامل بیماری از جوانب مختلف می باشد.

در این تحقیق قصد بررسی خصوصیات اسید فسفاتاز و اندازه گیری Vmax و Km در دو مرحله لگاریتمی و ایستای پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور بود. مرحله ایستا، مرحله ایی است عفونت زا که در آن انگل قادر به نفوذ درون ماکروفاژهای میزبان مهره دار می باشد. برای مدت ها تصور می شد ملکول لیپوفسفوگلیکان(LPG) یکی از ملکول های موثر در شدت بیماری زایی انگل است ولی گزارشات اخیر نقش این ملکول را در نفوذ و استقرار در ماکروفاژها و شدت بیماری زایی زیر سوال برده است.(۱۴)

بعضی از عوامل دیگر که تصور می شود احتمالا در حفظ و بقای انگل در داخل سلول های بدن میزبان نقش دارند عبارتند از: پمپ هیدروژنی انگل که مانع کاهش pH شدید محیط می گردد، تولید انواع پروتئازها و سوپراکسید دیسموتازها توسط انگل، مهار انفجار تنفسی، خنثی سازی رادیکال های سمی اکسیژن و غیر فعال کردن آنزیم های لیزوزومی توسط gp63 و هم چنین وجود اسید فسفاتاز.(۱۵)

از بین عوامل فوق نقش اسید فسفاتاز با دفسفریله کردن غشاء و ممانعت از تولید H_2O_2 توسط ماکروفاژها در زنده ماندن انگل درون ماکروفاژ بسیار حائز اهمیت است. پروماستیگوت های در حال رشد و تکثیر در اصل در حال آماده شدن برای مورد تهاجم قرار دادن ماکروفاژهای میزبان مهره دار می باشند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]

در این تحقیق فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور بدون پاساژ زیاد در محیط کشت، در دو شکل لگاریتمی و ایستا ارزیابی شد. نتایج، اختلاف معنی داری را بین فعالیت این آنزیم در دو مرحله پروماستیگوت ها نشان داد به طوری که فعالیت آن در مرحله ایستا ۲۳ درصد نسبت به مرحله لگاریتمی افزایش نشان داد. هم چنین ۲۳ درصد افزایش Vmax اسید فسفاتاز در پروماستیگوت های مرحله ایستا نسبت به لگاریتمی مشاهده شد و میزان Km در پروماستیگوت های ایستا ۲۸ درصد نسبت به پروماستیگوت های لگاریتمی کاهش نشان داد.

کاهش Km و افزایش Vm اسید فسفاتاز در مرحله متاسیکلیک یا ایستا نسبت به مرحله لگاریتمی یا پرو سیکلیک نشان دهنده فعالیت بیشتر این آنزیم در مرحله متاسیکلیک می باشد. زیرا فعالیت انزیم با Vm نسبت مستقیم و با Km نسبت عکس دارد.

در مطالعات گذشته، مشخص شده است که تعادل بین کینازها و فسفاتازها برای پاسخ اپتیمم ماکروفاژ و کنترل عفونت لیشمانیایی ضروری است،(۱۶)، هم چنین نشان داده شده است در مدت کوتاهی که عمل نفوذ انگل در ماکروفاژها صورت می گیرد پروماستیگوت ها نیاز به مقدار زیادی اسید فسفاتاز دارند چرا که پروماستیگوت در زمان ورود، از جهت تاژک به سطح ماکروفاژ می چسبد و با از دست دادن تاژک، مقدار زیادی اسید فسفاتاز رهامی کند و به این ترتیب، برای مدت کوتاهی تولید یون سوپر اکساید توسط ماکروفاژ به میزان ۵۰ درصد کاهش می یابد،(۱۷). با تاکید بر نکته ذکر شده، عدم توانایی نفوذ پروماستیگوت های پروسیکلیک در ماکروفاژها به اثبات رسیده است،(۴). نتایج این تحقیق که مبین افزایش فعالیت این آنزیم طی تغییر مرحله انگل می باشد احتمالاً نشان دهنده آن است که این آنزیم طی رشد پروماستیگوت ها سنتز و ذخیره سازی شده و هنگام تهاجم پروماستیگوت، توسط انگل مورد استفاده قرار می گیرد لذا می توان به این نتیجه رسید که تغییرات در خصوصیات آنزیم اسید فسفاتاز طی مرحله رشد پروماستیگوت ها احتمالاً موجب مهیا شدن یکی از عوامل ضروری جهت مورد تهاجم قرار دادن و نفوذ در ماکروفاژها است.

میزان فسفاتازها در گونه های مختلف لیشمانیا متفاوت گزارش شده است،(۱۸). هم چنین فسفاتازها عمده ترین گلیکوپروتئین ترشح شده توسط انگل در محیط کشت می باشند،(۱۸). طی مطالعات گذشته ثابت شده است که در لیشمانیا دونووانی شدت بیماری زایی به نحوی می تواند تحت تاثیر فعالیت اسید فسفاتاز باشد،(۱۹). هم چنین طی مطالعه و ارزیابی فعالیت sACP(اسید فسفاتاز ترشحی) در لیشمانیا آمازوننسیس مشخص شده است که این آنزیم هم فعالیت های اسیدی و هم قلیایی از خود نشان داده و در بالغ شدن واکوئل پارازیتوفوروس و هم چنین بقای اماستیگوت در بدن میزبان مهره دار نقش دارد.(۸)

نتایج تحقیقی که توسط بقایی و همکاران روی اشکال بالینی مختلف لیشمانیوز پوستی ناشی از لیشمانیا ماژور صورت گرفته، تفاوت قابل توجهی را در میزان Km و Vm و مهارکننده های ACP تعیین شده در بین گروه های مورد آزمایش نشان داده و در واقع این نتیجه حاصل شده است که نوع زخم ایجاد شده تحت تاثیر میزان فعالیت اسید فسفاتاز می باشد،(۹). مهرانی و همکاران نیز در تحقیق روی مواد دفعی، ترشحی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور، آنزیم اسید فسفاتاز را شناسایی کرده و نشان داده اند فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز تا ۷۲ ساعت پس از کشت افزایش می یابد ولی فعالیت ویژه آن نسبت به زمان کاهش دارد.(۲۰)

اسید فسفاتاز در تغذیه پروماستیگوت ها نیز نقش دارد. نتایج به دست آمده در بررسی حاضر که مبین افزایش فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز طی رشد پروماستیگوت ها می باشد نشان دهنده آن است که اسید فسفاتاز طی رشد پروماستیگوت ها سنتز و ذخیره سازی شده تا در هنگام تهاجم پروماستیگوت ها هم برای تغذیه و هم برای نفوذ به درون ماکروفاژها و غلبه بر موانع موجود مورد استفاده قرار گیرد.

از نتایج حاصل از این تحقیق چنین به نظر می رسد که با توجه به این که اسید فسفاتاز یکی از ملکول های مهم و موثر در قدرت نفوذ و استقرار پروماستیگوت ها در ماکروفاژها گزارش شده،(۲۱،۲۲)، تغییرات در خصوصیات و افزایش فعالیت این آنزیم طی تبدیل پروماستیگوت پروسیکلیک غیر عفونی به پروماستیگوت های متاسیکلیک عفونی احتمالاً یکی از عوامل موثر در عفونت زا شدن پروماستیگوت ها می باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت های مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت انجام این تحقیق قدردانی می شود. هم چنین لازم است در این جا از پیشنهادات و راهنمایی های آقایان دکتر مهدی بقایی و دکتر منوچهر مصری پور در طول تحقیق و نیز تهیه این مقاله صمیمانه تشکر و قدر دانی شود.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]

Reference

1-Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE 2012; 7: e35671.

2-Do Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Legare D. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in leishmania amazonensis. PLoS Negl Trop Dis 2011;5: e1167.

3-Rogers ME, Chance M L, Bates P A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. Parasitol 2002; 124: 495-507.

4-Mojtahedi Z, Clos J, Kamali-Sarvestani E. Leishmania major:Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. Exp Parasitol 2008; 119: 422-9.

5-Pimento P, aravia EB, Sacks D. The comparative fine structure and surface glycolconjugate expression of three life stages of Leishmania major. EXP Parasitol 1991; 72: 191-204.

6-Bandyopadhyay P, Ghosh DK, De A, Ghosh KN, Chaudhuri PP, Das P, et al. Metacyclogenesis of Leishmania SPP: species specific in vitro transformation , complement resistance and cell surface carbohydrate and protein profiles. J Parasitol 1991; 77:411-6.

7-Amandine I, Marina T, Shio O, Martin O. Impact of Leishmania metalloprotease GP-63 on macrophage signaling. Front Cell Infect Microbiol 2012;72:1-9.

8-Anne CS, Fernandes DC, Soares JR, Meyer F. Different secreted phosphatase activeities in Leishmania amazonensis. FEMS Microbiol Lett 2013 ;340:117-28.

9-Baghaei M, Mesripour M. Characterization of acid phosphatase in the promastigotes of three isolates of Leishmania major . Iran J Med Sci 2003 ; 28:1-8.

10-Mesripour M, Baghaii M. The role of energy metabolism enzymes in physiopathology of Cutaneous Leishmaniasis. Thirteen congress of physiology & pharmacology Iran , Isfahan; 1997.P.763.

11-Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response of parasite control and evasion. Int J parasitol 1998 ; 25:121-34.

12-Rezazadeh MF, Shakeri R, Kaboudanian AS, Tahghighi A, Foroumadi A. In vitro immunobiological studies of novel 5-(5-nitrofuran-2-yl)-1, 3, 4-Thiadiazoles with piperazinyl-linked benzamidine substituents against Leishmania Major. Iran J Allergy Asthma Immunol 2013; 12:368-76.

13-Sarkari B, Chance M, Hommel M. Antigenuria in visceral Leishmaniasis : detection and partial characterization of a carbohydrate antigen . Acta Tropica 2002; 82: 339-48.

14-Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by Leishmania Mexicana. EMBOJ 2000; 19: 1953-962.

15-Ghosh S, Goswami S, Adhya S. Role of superoxide dismutase in survival of Leishmania within the macrophage . Biochem J 2003; 369: 447-52.

16-Tiemi SM, Olivier M. Leishmania survival mechanisms: the role of host phosphatases. J Leukocyte Biol 2010; 88:1-3.

17-Pau A. Golgi-mediated post translational processing of secretory acid phosphatase by Leishmania donovani promastigotes . Mol Biochem Parasitol 1990 ;39:247-56.

18-Salvatore J, Turco GF, Späth SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania Species . Trends Parasitol 2001; 17:223-6.

19-Martiny A, Jose´ R, Meyer FB, Wanderley de S, Marcos A, Vannier S. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by Leishmania amastigotes . Mol Biochem Parasitol 1999 ;102: 1-12.

20-Mehrani HA, Mahmood Zadeh A, Shir BS, Mahvash J. [Evaluation of deferent enzymes activity in excretory and secretory (E/S) products of Leishmania Major Promastigotes.] J Shahed Uni 2005;12 :63-57.(Persian)

21-Baghaei M, Mesripour M. Leishmania enzyme activity in the promastigote of L.tropica and L.major. Irn J Med Sci 1996; 21:11-5.

22-Baghaei M, Mesripour M. Differences in enzyme activity and biology behavior of three leishmania promastigotes isolated from patient with zoonotic cutaneous leishmaniasis. Irn J Med Sci 1974; 22: 7-14

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]

.

Some enzymatic properties of Acid phosphatase in the logarithmic and stationary phase of Leishmania major

*Navabi A[1], Soleimanifard S[2] **

(Accepted: December 25, 2013 Recived: September 8, 2013)

Abstract

Introduction: Leishmania is an obligate intracellular parasite that causes a wide range of disease. This parasite is transmitted via the bite of infected sandfly. The parasite lives in the body of sandfly as promastigote form. Growth of promastigote comprised of two phases: none virulence logarithmic and virulence stationary phases. Given to the accumulation of acid phosphatase (ACP) in the stationary phase and its role in the virulence of the parasite, in this study the properties, K_m and V_m of ACP enzyme were measured in the logarithmic and stationary phases.

Materials & Methods: The present study was a cross-sectional study. To culture promastigotes, Leishmania major (L.major) (MRHO/IR/75/ER) from previously infected Balb/c mice were transferred to medium. Growth curve was generated by daily counting of the parasites and based on this curve logarithmic and stationary phases were divided. Frozen promastigotes of each stage with sodium acetate and Triton-X-100 were homogenized and centrifuged and ACP was measured in the supernatant by calorimetric assay.

Findings: Logarithmic and stationary parasites were collected in the fourth and seventh days, respectively. The amount of ACP activity was determined as 0.9 ± 0.03 in logarithmic and 1.18 ± 0.01 μ_M/min/mg protein in stationary phases. Also V_m of this enzyme was 75.76 ± 0.57 in logarithmic and 98.04 ± 0.96 in stationary phases and Km was determined 142.93 ± 4.08 µM and 106.39± 1.14 µM in logarithmic and stationary phases, respectively ($P<0.05$).

Discussion & Conclusion: In stationary promastigotes the rate of ACP activity and V_m were 23% higher and K_m was 28% lower than in logarithmic phase. Changes in the properties of ACP are probably one of the essential factors for parasites to attack the macrophages and these variations are very important parameters in pathology of the promastigotes.

Keyword: Leishmania major, promastigote , acid phosphatase , virulence

1. Dept of Medical Parasitology, Alzahra Medical Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Dept of Medical Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
* (corresponding author)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-26]