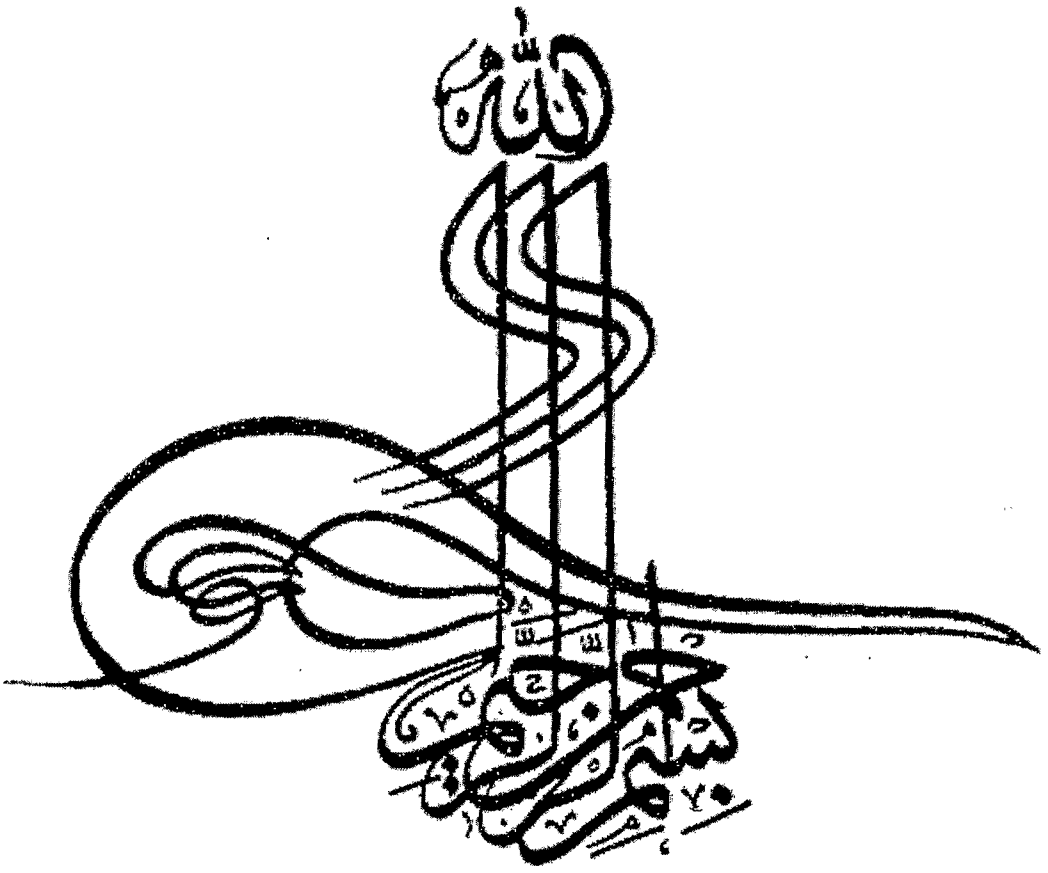


١٢٩١٢٤

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم

گروه بیوشیمی

عنوان پایان نامه:

بررسی امکان جایگزینی شیرخشک انسانی به جای سرم نرمال اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت اختصاصی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم

نگارش:

فضل الدین فهیمی مقدم

استادان راهنما:

دکتر جعفر نویدمهر

دکتر سعید زیبایی

استاد مشاور:

دکتر مسعود صالح مقدم

مرکز اطلاعات مدارک علمی پزشکی
ثبت مدارک

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی

بهمن ۱۳۸۸

۱۳۹۱۲۴

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام نور

تاریخ: ۱۳۸۸/۱۱/۲۹
شماره: ۸۸/۲۶۶۵۱
پیوست: .....

بسمه تعالی

تصویب نامه پایان نامه

پایان نامه تحت عنوان : **بررسی امکان جایگزینی شیرخشک انسانی به جای سرم نرمال اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت اختصاصی اوره آپلاسما اوره آلیتیکیوم** که توسط **فضل الدین فهیمی مقدم** تهیه و به هیأت داوران ارائه گردیده است مورد تایید می باشد.

تاریخ دفاع : ۸۸/۱۱/۱۵ نمره : ۱۹ درجه ارزشیابی : عالی

اعضای هیأت داوران :

نام و نام خانوادگی:	هیأت داوران	مرتبه علمی	امضاء
دکتر جعفر نوید مهر	استاد راهنما	استادیار	
دکتر سعید زیبایی	استاد راهنمای همکار	استادیار	
دکتر مسعود صالح مقدم	استاد مشاور	استادیار	
دکتر محمد همتی	استاد داور	استادیار	
جواد محمدی پور	نماینده گروه آموزشی	مربی	

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام نور

تاریخ: ۱۳۸۸/۱۱/۲۹
شماره: ۸۱/۲۶۶۰
پیوست: .....

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

پایان نامه تحت عنوان : **بررسی امکان جایگزینی شیرخشک انسانی به جای سرم نرمال اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت اختصاصی اوره آپلاسما اوره آلیتیکیوم** که توسط **فضل الدین فهیمی مقدم** تهیه و به هیأت داوران ارائه گردیده است مورد تایید می باشد.

تاریخ دفاع : ۸۸/۱۱/۱۵ نمره : ۱۹ درجه ارزشیابی : عالی

اعضای هیأت داوران :

نام و نام خانوادگی:	هیأت داوران	مرتبه علمی	امضاء
دکتر جعفر نوید مهر	استاد راهنما	استادیار	
دکتر سعید زیبایی	استاد راهنمای همکار	استادیار	
دکتر مسعود صالح مقدم	استاد مشاور	استادیار	
دکتر محمد همتی	استاد داور	استادیار	
جواد محمدی پور	نماینده گروه آموزشی	مربی	

مشهد: خیابان امام خمینی ۴۰ – صندوق پستی ۹۱۹ تلفن : ۸۵۲۸۵۲۸ (۰۵۱۱)
دورنگار: ۸۵۲۸۵۲۰ (۰۵۱۱) پست الکترونیک: mashhad@pnu.ac.ir

تقدیم به:

روح بلند مادرم،

قلب مهربان پدرم

و به:

همسر صبور و مهربانم

و نیز فرزاد عزیزم

به خاطر تمام لحظاتی که از ایشان دریغ کردم...

سپاس و قدر دانی

بر خود لازم می دانم از استادان بزرگوار جناب آقای **دکتر جعفر نوید مهر** و جناب آقای **دکتر سعید زیبایی** که مسؤولیت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفته اند، همچنین از راهنماییهای ارزشمند استاد مشاور گرانقدر جناب آقای **دکتر مسعود صالح مقدم** صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از پرسنل محترم **مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد**، خصوصاً سرکار خانم **رضایی** و آقایان **اسحاقی** و **دلیری** که در طول مراحل مختلف اجرای طرح، همکاری صمیمانه و همه جانبه ای با بنده داشته اند تشکر نمایم.

از سرکار خانم دکتر فاطمه افتخارزاده (متخصص محترم جراحی زنان و زایمان) و سرکار خانمها نسرین نورافشان، زهره مدرسی و عزت فارسیان (کارشناسان محترم مامایی) که در اخذ نمونه های کلینیکی واژینال از بیماران زن مبتلا به NGU در کاشمر اهتمام ویژه ورزیدند کمال سپاسگزاری را دارم.

همکاری صمیمانه مدیران محترم شبکه بهداشت و درمان و بیمارستان حضرت ابوالفضل (ع) شهرستان کاشمر بویژه جناب آقای دکتر مختاری، جناب آقای دکتر غلامی، جناب آقای تقدیسی و جناب آقای دکتر اصغری که بستر مناسب جهت تحصیل بنده و نیز انجام کارهای عملی این پایان نامه را فراهم آوردند و همچنین همیاری صمیمانه پرسنل محترم آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان حضرت ابوالفضل (ع) کاشمر، از سوی این بنده مزید امتنان و سپاس خاضعانه است.

همچنین از جناب آقای **ایران منش**، دوست عزیز و بزرگوارم که بخصوص در طی کمک به انجام آزمایشهای مولکولی این طرح زحمات بسیاری را متحمل گشته اند، تشکر ویژه دارم.

چکیده

باکتریهای خانواده مایکوپلاسماتاسه از عوامل مهم بیماریزا در انسان و جانوران می باشند بطوریکه بیماریزایی آنها در برخی حیوانات، سبب زیانهای اقتصادی نیز میگردد. در انسان نیز تعدادی از جنسها و گونه های این خانواده، توان ایجاد برخی از بیماریها از جمله بیماریهای تنفسی و اختلالات دستگاه ادراری تناسلی را دارند. از جنسهای مهم خانواده مایکوپلاسماتاسه، جنس اوره آپلاسما می باشد که دارای شش گونه است. در این میان، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم یکی از باکتریهایی است که از انسان جدا شده است که به صورت فرصت طلبانه، قادر به ایجاد بیماریهایی چون اورتریت، سقط جنین، سندروم تنفسی در نوزادان و ناباروری در انسان می باشد. راه اصلی تشخیص این باکتری، کشت از نمونه های کلینیکی است. اما به دلیل سخت و پرهزینه بودن کشت این ارگانیزم، آزمایشگاهها چندان راغب به انجام کشت برای تشخیص این باکتری نمی باشند.یکی از دلایل مهم ایجاد مشکل و هزینه بر بودن کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، وجود سرم نرمال اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت این باکتری است. در این مطالعه تلاش گردید تا با معرفی یک جایگزین ارزان و مناسب بجای سرم نرمال اسب از سختی و هزینه بر بودن کشت این باکتری کاسته شود. در این تحقیق، شیرخشک بعنوان این جایگزین معرفی و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محیط حاوی شیرخشک(۱/۲۵ درصد) می تواند جایگزین مناسب برای کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم باشد. برای تأیید اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم جداشده از نمونه واژن از PCR استفاده گردید.

کلیدواژه: اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، مایکوپلاسما، کلسترول، شیرخشک، سرم نرمال اسب.

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱-مقدمه ۱

۱-۲- کلسترول و نقش آن در غشای سلولی..... ۳

۱-۲-۱- ساختمان و بیوسنتز کلسترول..... ۳

۱-۲-۲- بیوسنتز کلسترول ۴

۱-۲-۳- نقش کلسترول در غشای پلاسمایی ۶

۱-۳- شیرخشک و ساختار آن ۷

۱-۴- مایکوپلاسماها ۷

۱-۴-۱- تاریخچه..... ۷

۱-۴-۲- جایگاه مایکوپلاسماها در طبقه بندی موجودات زنده ۸

۱-۴-۳- طبقه بندی بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی..... ۹

۱-۴-۴- طبقه بندی بر اساس قدرت بیماریزایی ۱۰

۱-۴-۵- خصوصیات کلی مایکوپلاسماها ۱۱

۱-۴-۶- مورفولوژی مایکوپلاسماها ۱۱

۱-۴-۷- روش تکثیر مایکوپلاسماها..... ۱۲

۱-۴-۸- متابولیسم مایکوپلاسماها..... ۱۲

۱-۴-۹- کشت و نیازهای غذایی مایکوپلاسما و اوره آپلاسما ۱۳

۱-۴-۱۰- شکل کلونی مایکوپلاسماها منحصربفرد است ۱۳

۱-۴-۱۱- مقاومت و حساسیت به آنتی بیوتیکها و سایر عوامل فیزیکوشیمیایی..... ۱۴
۱-۴-۱۲- خصوصیات ژنومی مایکوپلاسماها..... ۱۴
۱-۴-۱۳- وجود یک اسکلت سلولی اولیه در مایکوپلاسماها..... ۱۵
۱-۴-۱۴- تولید پراکسید توسط مایکوپلاسماها ۱۵
۱-۴-۱۵- تمایل منحصر بفرد مایکوپلاسماها در اتصال به غشای سلولها ۱۶
۱-۴-۱۶- تفاوت مایکوپلاسماها با شکل L باکتریها..... ۱۶
۱-۴-۱۷- اَشکال اِل باکتریها..... ۱۶
۱-۴-۱۸- تأثیرات مایکوپلاسما بر سلولهای زنده..... ۱۷
۱-۴-۱۹- محیطهای کشت قابل استفاده برای کشت مایکوپلاسماها..... ۱۸
۱-۴-۲۰- روشهای تشخیص مایکوپلاسماها..... ۲۱
۱-۴-۲۱- بیماریزایی مایکوپلاسماها ۲۲
۱-۴-۲۲- فاکتورهای بیماریزایی..... ۲۳
۱-۴-۲۳- ایمونوپاتوژنزیس مایکوپلاسماها ۲۵
۱-۴-۲۴- مایکوپلاسماها و بیماریزایی در حیوانات ۲۵
۱-۴-۲۵- مایکوپلاسماها و بیماریزایی در انسان ۲۶
۱-۴-۲۶- درمان بیماریهای ناشی از مایکوپلاسماها ۳۰
۱-۵- اورتریت و تقسیم بندی آن براساس اتیولوژی بیماری ۳۰
۱-۶- اوره آپلاسماها ۳۱
۱-۶-۱- خصوصیات کلی اوره آپلاسماها ۳۱
۱-۶-۲- اوره آپلاسماهای بیماریزا در حیوانات ۳۱
۱-۶-۳- اوره آپلاسماهای انسانی ۳۳

۱-۶-۴- اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و خصوصیات کشت آن..... ۳۳
۱-۶-۵- اهمیت حضور اوره در محیط کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۳۵
۱-۶-۶- کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم به صورت متوالی و مشکلات آن ۳۵
۱-۶-۷- بیماریزایی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۳۶
۱-۶-۸- تشخیص اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۴۰
۱-۶-۹- درمان بیماریهای ناشی از اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۴۱

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- مواد و دستگاهها ۴۲
۲-۲- کارهای عملی ۴۵
۲-۲-۱-تهیه فنل رد ۰/۱ درصد ۴۵
۲-۲-۲- پنی سیلین(۶۰۰ و ۱۰۰۰ واحد در میلی لیتر) ۴۵
۲-۲-۳- تهیه بافر PBS(Phosphate Buffer Saline) ۴۵
۲-۲-۴- تهیه محلول تأیید کلونیهای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۴۶
۲-۲-۵- آماده سازی سرم نرمال اسب برای استفاده در محیط کشت مایکوپلاسما..... ۴۶
۲-۲-۶- تهیه اوره ۱۰ درصد جهت محیط کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۴۶
۲-۲-۷- تهیه اسید کلرهیدریک ۱ نرمال ۴۶
۲-۲-۸-تهیه شیرخشک جهت استفاده در محیط کشت مایکوپلاسما آگالاکتیه و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۴۶
۲-۲-۹- تهیه ژل آگاروز ۱ درصد جهت الکتروفورز محصول PCR ۴۷
۲-۲-۱۰-تهیه اتیدیوم بروماید..... ۴۷

۲-۲-۱۱- طرز تهیه Running Buffer 5X (TBE) جهت ژل الکتروفورزیس ۴۷
۲-۲-۱۲- تهیه محیط کشت مایع پایه (PPLO Broth) ۴۸
۲-۲-۱۳- تهیه محیط کشت مایع (PPLO Broth) جهت مایکوپلاسما آگالاکتیه ۴۸
۲-۲-۱۴- تهیه محیط کشت مایع(PPLO Broth) جهت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۴۸
۲-۲-۱۵- محیط کشت انتقال دهنده یا ترانسپورت برای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۴۹
۲-۲-۱۶- تهیه محیط کشت جامد پایه(PPLO Agar) ۴۹
۲-۲-۱۷- تهیه محیط کشت جامد(PPLO Agar) برای مایکوپلاسما آگالاکتیه ۵۰
۲-۲-۱۸- تهیه محیط کشت جامد(PPLO Agar) برای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۵۰
۲-۲-۱۹- تهیه محیط کشت PPLO Broth حاوی غلظتهای مختلف شیر خشک ۵۰
۲-۲-۲۰- تهیه نمونه باکتری اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۵۱
۲-۲-۲۱- کشت نمونه های کلینیکی بر روی محیط براث مخصوص اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۵۱
۲-۲-۲۲- تلقیح نمونه ها از روی محیط مایع تغییر رنگ یافته بر روی محیط PPLO Agar ۵۲
۲-۲-۲۳- تأیید کلونیهای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۵۳
۲-۲-۲۴- بررسی و تعیین میزان رشد بر روی محیط PPLO Broth با غلظتهای مختلف شیرخشک ۵۳
۲-۲-۲۵- شمارش اجرام مایکوپلاسمایی به روش Miles & Misra ۵۴
۲-۲-۲۶- بررسی رشد اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم بر روی محیط PPLO Broth با غلظتهای مختلف شیرخشک ۵۵
۲-۲-۲۷- PCR و نحوه انجام آن ۵۵
۲-۲-۲۸- استخراج DNA از نمونه ها و مراحل آن ۵۵
۲-۲-۲۹-روش اول استخراج DNA ۵۶
۲-۲-۳۰- روش دوم استخراج DNA ۵۶

۲-۲-۳۱- تهیه پرایمر مخصوص اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۵۹
۲-۲-۳۲- بررسی حضور DNA در نمونه استخراج شده ۵۹
۲-۲-۳۳- انجام PCR ۵۹
۲-۲-۳۴- روش انجام PCR ۶۰
۲-۲-۳۵- شناسایی محصول PCR ۶۰
۲-۲-۳۶- اسکن ژل و تهیه تصویر از نتیجه PCR ۶۱
۲-۲-۳۷- بررسی میزان شیوع اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در زنان بیمار مبتلا به NGU در کاشمر ۶۱

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- نتایج ۶۳
۳-۱-۱- نتایج حاصل از جداسازی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از نمونه های واژینال و تأیید آن توسط شکل کلونی ۶۳
۳-۱-۲- نتایج حاصل از تأیید اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم جداشده از نمونه ها توسطPCR ۶۴
۳-۱-۳- نتایج به دست آمده در مورد مقایسه نحوه ساخت محیط حاوی شیرخشک برای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و مایکوپلاسما آگالاکتیه ۶۶
۳-۱-۴- نتایج حاصل از رشد مایکوپلاسما آگالاکتیه در غلظتهای مختلف شیرخشک و مقایسه آن با محیط حاوی ۲۰درصد سرم نرمال اسب ۶۷
۳-۱-۵- رشد اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم بر روی محیط حاوی شیر خشک ۶۹
۳-۱-۶- نتایج حاصل از مقایسه رشد اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم بر روی محیطهای حاوی شیرخشک در مقایسه با محیط حاوی ۲۰ درصد سرم اسب ۶۹

۳-۱-۷- شمارش کلونی حاصل از کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم بر روی محیطهای شیرخشک دار و مقایسه آنها با محیط حاوی سرم اسب ۷۱

۳-۱-۸- نتایج حاصل از بررسی شیوع اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در زنان مبتلا به NGU در کاشمر ۷۲

۳-۲- بحث ۷۳

۳-۳- نتیجه گیری ۷۹

۳-۴- پیشنهادات ۸۰

فصل چهارم: منابع

منابع..... ۸۱

فهرست جداول

جدول ۳-۱- نتایج کلونی کانت مایکوپلاسما آگالاکتیه در غلظتهای مختلف شیرخشک به روش Miles & Misra.... ۶۸

جدول۳-۲- جدول مقایسه کلونی کانت اوره آپلاسما در محیطهای کشت شیرخشک دار با محیط حاوی سرم اسب در دو نمونه مجزا ۷۱

فهرست نمودارها

نمودار۳-۱- نتایج کلونی کانت مایکوپلاسما آگالاکتیه در غلظتهای مختلف شیرخشک به روش Miles & Misra ۶۸

نمودار۳-۲- نمودار مقایسه نتایج حاصل از کلونی کانت اوره آپلاسما در محیطهای کشت شیرخشک دار با محیط حاوی سرم اسب در دو نمونه جداگانه ۷۲

نمودار۳-۳- نمودار افتراقی نمونه های مثبت و منفی(از لحاظ حضور اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم) و نیز موارد مثبت کاذب، نسبت به کل نمونه های اخذ شده از بیماران مبتلا به NGU در شهرستان کاشمر ۷۳

فهرست اشکال

شکل۱-۱- ساختمان شیمیایی مولکول کلسترول.....۳

شکل ۱-۲- شکل شماتیک سنتز کلسترول ۴

شکل۱-۳- مراحل مختلف سنتز کلسترول با نمایش تغییرات ساختار مولکول.....۵

شکل۱-۴- چگونگی قرار گرفتن کلسترول در غشای سلولی ۶

شکل ۱-۵- رشد کلونی مایکوپلاسما در سطح آگار و ایجاد شکلی شبیه به تخم مرغ نیمرو ۱۴

شکل۱-۶- تصویر جذب اریتروسیتها توسط مایکوپلاسما پنومونیه ۲۸

شکل ۳-۱- عکس از کلونیهای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم با بزرگنمایی ۴۰×(۱) و ۱۰۰×(۲) و ۴۰۰×(۳).....۶۴

شکل ۳-۲- تصویر حاصل از نانودراپ برای استخراج DNA به روش حرارتی ۶۴

شکل ۳-۳- تصویر حاصل از نانودراپ برای استخراج DNA به روش سیناژن.....۶۵

شکل ۳-۴- باندهای حاصل از دو روش مختلف استخراج DNA از یک نمونه ۶۵

تصویر ۳-۵- باندهای حاصل از بررسی رشد اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم بر محیطهای با غلظتهای مختلف شیرخشک.....۶۶

شکل۳-۶- عکس کلونیهای مایکوپلاسما آگالاکتیه با بزرگنمایی ۴۰× ۶۷

بخش اول

کلّیات تحقیق

۱-۱- مقدمه

شاید تا دو دهه پیش کسی فکر نمی کرد که در بحث تشخیص و درمان بیماریها ، بخش پاراکلینیک از جمله آزمایشگاههای تشخیص طبی از ارکان تشخیص و درمان بیماریها قرار گیرند، تا جایی که هم اکنون ، در بسیاری ازموارد، کلینیک بدون در نظر گرفتن تستهای آزمایشگاهی مرتبط با بیماری ، اگر در تشخیص و پیگیری بیماری دچار خطا نگردد ، اقلّ آن این است که دچار تردید یا اطاله زمان در تشخیص و درمان قطعی خواهد شد. اما با تمام این تفاصیل ، گاهی پزشکان با وجود علاقمندی به ارتباط با آزمایشگاههای تشخیص طبی برای تسریع عمل تشخیص و درمان بیماریها ، جواب مناسب از آزمایشگاهها نمی گیرند و یا آنقدر مدت زمان تشخیص یا هزینه های آن بالا می رود که بیمار یا پزشک به دلیل شرایط بیمار از خیر آن می گذرند و به درمانهای کورکورانه(Blind therapy) فقط از روی علایم بالینی بیمار می پردازند. در بررسی این معضل چندین عامل مهمتر به نظر می رسند که عبارتند از :

۱- عدم وجود ابزار و ترکیبات لازم برای انجام تست مزبور در آزمایشگاه .

۲- زمانبری بالای انجام تست .

۳- درخواستهای اندک آزمایش مزبور توسط پزشکان .

۴- نبود نیروی کارآزموده و متخصص برای انجام آن تست .

۵- کم اطلاعی یا بی اطلاعی برخی پزشکان نسبت به وجود تستی خاص یا اندیکاسیون انجام و درخواست آن .

۶- تعرفه پایین اعلام شده توسط وزارتخانه با وجود هزینه بالای تست .

این مثال به روشن تر شدن مطلب کمک خواهد کرد :

کشت ترشحات واژن و ترشحات مجرای ادراری مردان ازجمله تستهایی است که معمولاً در موارد شک پزشک یا ماما به اورتریت غیرگنوکوکی (NGU)[1] یا دیگر بیماریهای عفونی یا التهابی دستگاه تناسلی زنان و یا مردان، از آزمایشگاه درخواست می شود. نکته جالب توجه این است که

[1]- Non Gonococcal Urithritis

اغلب این کشتها با پاسخ مناسب و قابل اعتماد توسط آزمایشگاهها مواجه نمی شوند و علاوه بر سردرگمی پزشکان و کادر درمانی ، بیمار نیز به درمان مناسب دست نمی یابد یا طول دوره درمانش افزایش می یابد.

هرچند که عامل ۵۰ تا ۷۰ درصد از موارد اورتریت غیر گنوکوکی در ایالات متحده ، ناشناخته است اما به نظر می رسد مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از عوامل معمول اورتریت می باشند(۱) .

اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از زیرمجموعه خانواده مایکوپلاسماتاسیه است. این باکتریها برای رشد نیاز به حضور مواد غنی کننده همچون سرم اسب در محیط کشت خود دارند. سرم اسب ماده ای است که استحصال و استریل کردن آن نسبتا سخت و قیمت آن نیز نسبتا بالا است. زمان طولانی رشد، نیاز به فیلترهای خاص و گران قیمت برای جداسازی آن و برخی افزودنی های دیگر مورد نیاز در محیط کشت این باکتری ، بر مشکل کار می افزاید. اما یکی از عمده ترین این مشکلات ، مشکل گرانی و تهیه مشکل سرم اسب است که آزمایشگاهها را با توجه به تعرفه پایین آزمایش کشت واژن یا مجرا چندان راغب به انجام این تستها نمی کند.

در این تحقیق سعی شد تا با بررسی ترکیبی جایگزین برای سرم اسب در تهیه محیط کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، یکی از اصلی ترین مشکلات برای کشت و جداسازی این باکتری در آزمایشگاههای تشخیص طبی مرتفع گردد؛ بطوریکه ماده جدید، در دسترس تر و ارزان تر از سرم اسب بوده و استفاده از آن نیز نتایج قابل قبولی به همراه داشته باشد. از آنجا که شیرخشک حاوی کلسترول و سایر مواد و ترکیبات مهم برای رشد باکتری می باشد، ترکیبی که در این کار به عنوان جایگزین سرم اسب در محیط کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم استفاده گردید، شیرخشک انسانی است که فراوان، ارزان و قابل دسترس برای کلیه آزمایشگاهها می باشد.

جهت تعیین یک میزان پایه برای غلظت شیر خشک، جهت استفاده در محیط کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، ابتدا می بایست بر روی یک باکتری هم خانواده اوره آپلاسما که رشدی آسان تر و سریعتر داشته باشد و نیز در دسترس تر بوده و دارای قابلیت کشتهای مجدد و متوالی باشد، این

بررسی صورت می گرفت تا از صرف وقت و هزینه های اضافی جلوگیری گردد. از بهترین گزینه ها در این زمینه، مایکوپلاسما آگالاکتیه می باشد. درهمین راستا و با توجه به توضیحات فوق، در این مطالعه علاوه بر کار بر روی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، کشت و بررسی مایکوپلاسما آگالاکتیه نیز در حاشیه کار، انجام گرفت.

۱-۲- کلسترول و نقش آن در غشای سلولی

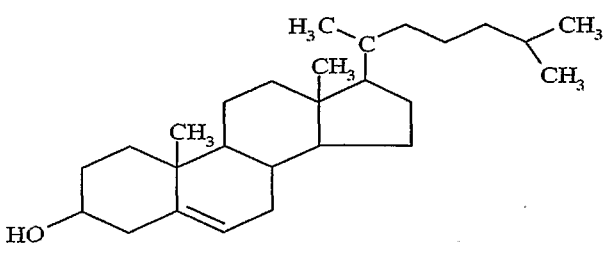
یکی از لیپیدهای موجود در غشای پلاسمایی اغلب مایکوپلاسماتالها، استرول است که این مسأله از وجوه تمایز این باکتریها با سایر پروکاریوتها می باشد. این باکتریها فاقد سل وال بوده و بوسیله یک غشای سه لایه ای احاطه شده اند. این غشا حاوی استرول می باشد و لذا این باکتریها برای سنتز غشای خود نیاز به کلسترول و دیگر استرولها دارند. این ماده با افزودن سرم نرمال اسب، مایع آسیت یا سرم خرگوش در محیط کشت باکتریهای این خانواده تأمین می گردد(۱).

با توجه به موضوع تحقیق، ابتدا مختصری در مورد کلسترول و نقش آن در غشای پلاسمایی بحث می گردد.

۱-۲-۱- ساختمان و بیوسنتز کلسترول

کلسترول از مشتقات هسته استروئیدی(سیکلوپنتانوپرهیدروفنانترن) می باشد. این هسته استروئیدی شامل یک هسته حلقوی به نام فنانترن(۳ حلقه شش ضلعی) و یک حلقه ۵ ضلعی به نام سیکلوپنتان است.کلسترول دارای یک عامل هیدروکسیلی برروی کربن۳ هسته فنانترن می باشد(۱۰).

در واقع کلسترول دارای یک هسته استروئیدی حجیم است که در یک انتهای آن یک گروه هیدروکسیل و در انتهای دیگر آن یک دنباله هیدروکربنی انعطاف پذیر قرار گرفته است(۲).



شکل ۱-۱: ساختمان شیمیایی مولکول کلسترول

۱-۲-۲- بیوسنتز کلسترول

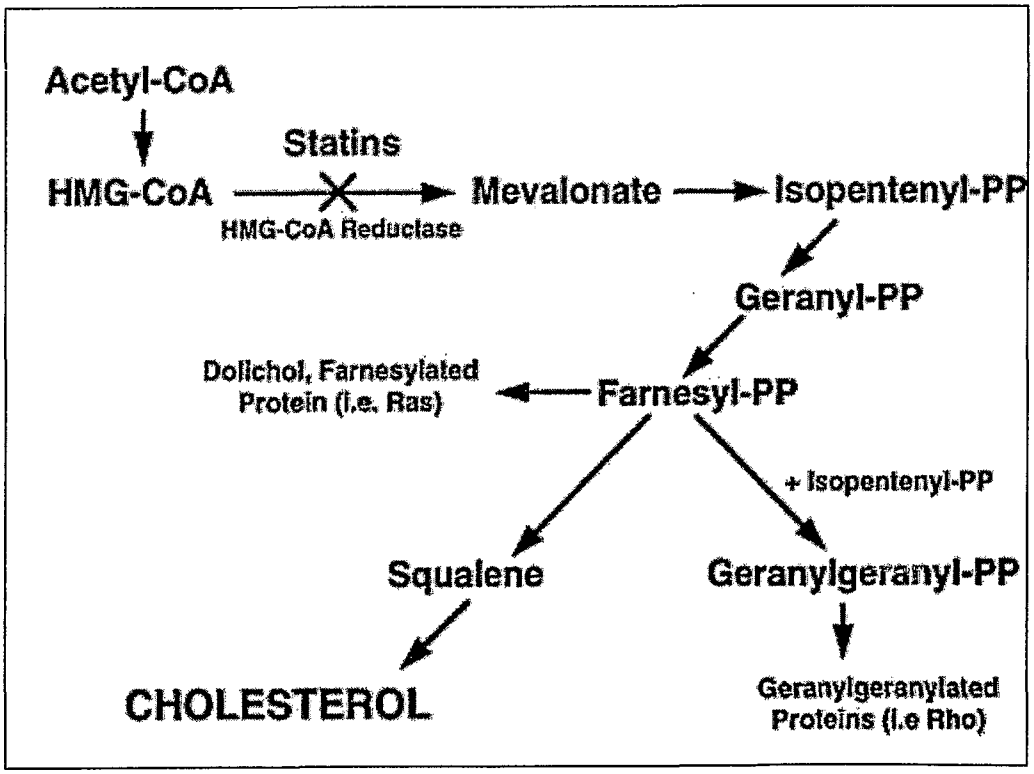
کلسترول در سه مرحله از استیل کوآنزیم A سنتز می گردد.

بدین معنا که تمامی ۲۷ اتم کربن کلسترول در طی یک فرایند سنتزی سه مرحله ای از استیل CoA مشتق می شوند:

۱- مرحله اول سنتز ایزوپنتنیل فسفات می باشد. این ماده یک واحد فعال شده ایزوپرن است که واحد ساختاری کلیدی کلسترول محسوب می شود.

۲- مرحله دوم متراکم شدن شش مولکول ایزوپنتنیل پیروفسفات برای تشکیل اسکوالن می باشد.

۳- در مرحله سوم، اسکوالن در اثر واکنشی شگفت آور به صورت حلقوی در آمده و در ادامه، محصول چهار حلقه ای به کلسترول تبدیل می شود(۳).



شکل ۱-۲- شکل شماتیک سنتز کلسترول