

## ارزیابی ایمنولوژیک اثر عصاره میسلومی، کونیدی و آنزیم کاتالاز قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس بر میزان تولید نیتریک اکساید در مدل موشی

شهلا رودبار محمدی<sup>۱</sup>، احمد زواران حسینی<sup>۲\*</sup>، علیرضا خسروی<sup>۳\*</sup>  
محمدحسین یادگاری<sup>۴\*</sup>، محمدرضا شکوه امیری<sup>۵\*\*\*</sup>، فاطمه غفاری<sup>۶\*\*\*\*</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** اسپرژیلوس مهاجم (IA) یکی از بیماریهای مهلک و پراهمیت قارچی در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی، دیابتیک، گیرندگان مغز استخوان و بیماران مبتلا به ایدز می باشد. نیتریک اکساید یکی از فراورده های ضد میکروبی سلول های فاگوسیتی است که در دفاع غیر اختصاصی دارای اهمیت ویژه ای است. از آنجاییکه سیستم دفاعی فرد مبتلا به اسپرژیلوس با اشکال میسلومی و کونیدی و فراورده های قارچ مواجه می باشد، لذا در این تحقیق اثر تحریکی عصاره میسلومی، کونیدی و آنزیم کاتالاز قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس بر میزان تولید نیتریک اکساید (No) از نوتروفیل ها و ماکروفاژهای مدل موش بررسی گردید.

**مواد و روش ها:** ابتدا آنزیم کاتالاز براساس تکنیک کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص گردید. سپس سوسپانسیون قارچی حاوی  $1 \times 10^3$  کونیدی آماده و ۴۰ سر موش Balb/c، به چهار گروه تقسیم و با  $300 \mu\text{g}$  از آنزیم کاتالاز، عصاره میسلومی، کونیدی و ادجوانت به طور مجزا و به طرز داخل صفاقی تلقیح شدند. ماکروفاژهای صفاقی و همچنین نوتروفیل های هر گروه تحت شرایط استریل جدا و در معرض آنزیم کاتالاز تخلیص شده به مقدار  $0.5 \text{ mg/ml}$  قرار گرفتند. میزان تولید نیتریک اکساید این سلولها با استفاده از روش گریس و در مایع رویی محیط کشت سلولی اندازه گیری شد.

**نتایج و یافته ها:** آنالیز یافته ها با تست آنوا (Anova) نشان داد میزان تولید نیتریک اکساید نوتروفیل ها و ماکروفاژهای گروه حساس شده با کاتالاز به طور معناداری بیش از سایر گروهها بود ( $P \leq 0.05$ ) کاتالاز با افزایش تولید نیتریک اکساید و در نتیجه افزایش توان کشتندگی ماکروفاژها و نوتروفیل ها می تواند در تحریک سیستم ایمنی میزبان علیه عفونتهای قارچی از جمله اسپرژیلوس فومیگاتوس میتواند موثر باشد و در طراحی یک مدل واکنس استفاده گردد. در حالیکه فرم کونیدی، عصاره میسلومی چنین تأثیری نداشت.

**کلید واژه ها:** اسپرژیلوس فومیگاتوس، نیتریک اکساید، عصاره میسلومی، آنزیم کاتالاز

ک: نویسنده مسئول: گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران  
\* گروه آموزشی ایمنی شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران  
\*\* گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران  
\*\*\* گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران  
\*\*\*\* فارغ التحصیل قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران  
\*\*\*\*\* گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

## مقدمه

آسپرژیلوز مهاجم (IA) یکی از بیماری‌های مهلک و پراهمیت قارچی در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی، دیابتیک، گیرندگان مغز استخوان و بیماران مبتلا به ایدز می‌باشد. مکانیسم دفاعی میزبان علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس عمدتاً از دفاع غیراختصاصی بهره می‌برد [۱۱، ۱۲، ۱۳]. ماکروفاژهای آلوئولار نخستین خط دفاعی میزبان در کنار سایر اجزای سیستم ایمنی ذاتی می‌باشد که چنانچه به دلیل ضعف سیستم ایمنی، قادر به هضم کونیدی نباشند، سایر سلولهای فاگوسیت کننده از قبیل ماکروفاژهای صفاقی و نوتروفیل‌ها درصدد هضم عناصر قارچی برمی‌آیند [۱۵، ۱۶]. ماکروفاژها فعالیت ضد میکروبی خود را عمدتاً از دو طریق وابسته و غیروابسته به اکسیژن آغاز می‌کنند نیتریک اکساید یکی از فراورده‌های ضد میکروبی و ضد التهابی وابسته به اکسیژن ماکروفاژهاست. ماکروفاژها بسیاری از عملکردهای اجرائی خود را فقط هنگامی که با میکروب و سایتوکاین‌ها و یا سایر محرک‌ها فعال شوند بروز می‌دهند یک نوع از این فعالیت‌ها مانند تولید نیتریک اکساید به دنبال محرک خارجی پس از القا صورت می‌گیرد. چنانچه هر عاملی بتواند در تحریک تولید نیتریک اکساید و افزایش توان ضد پاتوژنی ماکروفاژهای آلوئولار و صفاقی مؤثر باشد دفاع میزبان را علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس تقویت می‌نماید [۶، ۷، ۸]. از آنجائیکه سیستم دفاعی میزبان با اشکال مختلف کونیدی، میسلوم و آنزیم‌های مختلف قارچ مواجه می‌باشد لذا در این بررسی اثر کونیدی، عصاره میسلومی و آنزیم کاتالاز به‌طور مجزا به روی میزان تولید نیتریک اکساید در سلولهای فاگوسیت کننده سنجش شد [۹، ۱۰].

## روش بررسی

### تهیه سوسپانسیون حاوی کونیدی

قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس در محیط کشت جامد چابکس کشت داده شد. پس از گذشت یک هفته، ۱۰۰ ml نرمال سالین استریل به همراه تووین ۲۰ (Tween 20) روی محیط کشت ریخته و محتوای سوسپانسیون حاصل از گاز استریل عبور داده شد. سپس به مدت ده دقیقه در دور  $1300 \times g$  در دمای  $4^\circ C$  سانتریفوژ و از

رسوب حاصل میزان  $1 \times 10^6$  کونیدی قارچ در هر میلی‌لیتر برداشت شد. از کونیدی قارچ جهت تزریق به حیوان استفاده گردید.

### مدل حیوانی

۴۰ سر موش Balb/c ماده ۸-۶ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵-۲۳ گرم به‌طور تصادفی و غیرانتخابی به گروه‌های پنج تایی تقسیم، و هر گروه به‌طور مجزا با مقدار  $300 \mu g$  از آنزیم کاتالاز، کونیدی، عصاره میسلومی و ادجوانت تلقیح شدند.

تزریق داخل صفاقی مدل حیوانی طی سه مرحله دوره بیست روزه ابتدا به همراه ادجوانت کامل فروند و سپس با ادجوانت ناقص فروند انجام پذیرفت.

جهت بررسی میزان تولید نیتریک اکساید نیاز به جداسازی ماکروفاژهای صفاقی و نوتروفیل‌ها از هر گروه مورد آزمایش بود.

### مراحل جداسازی ماکروفاژهای صفاقی

موش‌های هر گروه ابتدا توسط اتر بی‌هوش شده پوست شکم را تحت شرایط استریل باز کرده، حدود ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر RPMI را به صفاق موش تزریق نموده، سپس مایع تزریق شده را جمع‌آوری کرده و در لوله‌های درپنج‌دار استریل که قبلاً به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی ۵ واحد هپارین ریخته بودیم اضافه گردید.

لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور  $200 \times g$  سانتریفوژ و دو بار با بافر هنکس و در آخر سلولها با محیط RPMI-1640، شستشو داده شد. سلولهای شسته شده را به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و تعداد آنها توسط لام نئوبار شمارش شد. تعداد سلولها به  $2 \times 10^5$  در هر میلی‌لیتر رسانده با استفاده از رنگ تریپان بلو  $0.2\%$  تعداد و درصد سلولهای زنده کنترل گردید.

### مراحل کشت ماکروفاژ و جمع‌آوری مایع رویی

ابتدا چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلول ماکروفاژ به تعداد  $2 \times 10^5$  پر شد. میکروپلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور  $CO_2$  دار و در دمای  $37^\circ C$  قرار گرفت در این حالت ماکروفاژها به کف پلیت چسبیده و سلولهای غیرچسبنده در مایع رویی چاهک قرار می‌گیرند که بدور ریخته می‌شوند. سپس ماکروفاژهای جدا شده از گروه‌های مختلف مدل

کاتالاز قرار گرفته، سپس پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور Co2 دار در دمای ۳۷°C قرار گرفته و بعد از آن مایع رویی هر چاهک به طور مجزا در میکروتیوپ‌های ۰/۵ ml جمع‌آوری و جهت سنجش میزان نیتریک اکساید تولید شده در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

### اندازه‌گیری نیتریک اکساید

نیتریک اکساید بسیار ناپایدار بوده و نیمه عمری بین ۱۰-۶ ثانیه داشته و به سرعت در حضور اکسیژن به نیتريت (NO2) تبدیل می‌شود. غلظت نیتريت در مایع رویی کشت سلول به‌عنوان شاخص تولید نیتریک اکساید در نظر گرفته می‌شود و میزان آن با واکنش رنگ سنجی گریس تعیین می‌گردد.

مایع رویی کشتهای سلولی ماکروفازی و نوتروفیلی که در برودت ۷۰°C- نگهداری شده بود در دمای اتاق قرار گرفته به مدت یک دقیقه در دور (۶۰۰-۷۰۰ RPM) سانتریفوژ شد. سپس جهت تهیه منحنی استاندارد غلظت‌های مختلفی از نیتريت سدیم آماده گشت ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس همزمان به غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم و مایع رویی جمع‌آوری شده از کشت ماکروفازها و نوتروفیل‌ها به‌طور مجزا اضافه گردید. پس از ده دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، طیفی از رنگ‌های ارغوانی با شدت‌های مختلف براساس میزان نیتريت موجود در آنها ایجاد شد که با طول موج ۵۴۰ نانومتر و فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر میزان جذب (OD) خوانده شد. سپس منحنی استاندارد براساس غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم ترسیم گردید و با استفاده از خط رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ها با استفاده از عدد جذب (OD) آنها محاسبه و به‌صورت میکرومولار نیتريت بیان گردید.

### یافته‌ها

#### نتایج حاصل از اندازه‌گیری نیتریک اکساید

تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون پارامتری آنالیز واریانس یک طرفه (LSD) و غیرپارامتری آنوا (ANOVA) و بسته نرم‌افزاری SPSS انجام شد.

حیوانی در معرض ۰/۵ mg/ml کاتالاز قرار گرفته و چاهک کنترل مثبت و کنترل منفی نیز در کنار چاهک تست به قرار زیر تعیین می‌گردد. چاهک کنترل مثبت حاوی ۲×۱۰۵ سلول ماکروفاژ، ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و ۵۰ میکرولیتر لیپوپلی‌ساکارید (۱۰۰ ng/ml) بود و چاهک کنترل منفی حاوی ۲×۱۰۵ سلول ماکروفاژ، ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و ۵۰ میکرولیتر مهارکننده نیتریک اکساید NMMA (N-monomethyl-arginine) بود. سپس میکروپلیت ۲۴ ساعت در انکوباتور Co2 دار در دمای ۳۷°C نگهدارش شده و مایع رویی هر چاهک به‌طور جداگانه جهت اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید تولید شده در میکروتیوب ۰/۵ ml جمع‌آوری و در ۷۰°C- نگهداری شد.

#### مراحل جداسازی نوتروفیل‌ها

موشها توسط اتر بیهوش شده و سپس تمام خون قلب جمع‌آوری گردید. خون به نسبت یک به یک به محلول ۶٪ هیدروکسی اتیل استارچ اضافه گردید. این مخلوط به مدت زمانی ۳۰-۲۵ دقیقه ساکن مانده، سپس مایع رویی با سمپلر جدا شده و به نسبت یک به یک به فایکولی که در دمای اتاق قرار گرفته اضافه گشت. آنگاه بیست دقیقه با دور ۲۰۰ RPM سانتریفوژ شد، رسوب سلولی جهت حذف گلبولهای قرمز دوبار با آمونیوم کلراید ۰/۸٪ و یکبار با RPMI شستشو داده شد. تعداد ۲×۱۰۵ نوتروفیل‌های زنده پس از شمارش و رنگ‌آمیزی با تریپان بلو به چاهک‌های محیط کشت سلولی وارد شد.

#### روشن کشت نوتروفیل‌ها

ابتدا ۲×۱۰۵ نوتروفیل به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید سپس دو چاهک اول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد که حاوی ۲×۱۰۵ نوتروفیل، ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و پنجاه میکرولیتر لیپوپلی‌ساکارید (۱۰۰ ng/ml) بود.

دو چاهک بعدی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد که حاوی ۲×۱۰۵ نوتروفیل و ۲۵ میکرولیتر اینترفرون گاما (۱۰۰ Iu/ml) و ۵۰ میکرولیتر مهارکننده نیتریک اکساید (NMMA) بود. در چاهک‌های بعدی ۲×۱۰۵ نوتروفیل در معرض ۰/۵ mg/ml

جدول ۱. میانگین تولید NO توسط ماکروفاژهای صفاقی موشهای حساس شده در گروههای مختلف پس از آخرین تزریق در شرایط *in vitro* که در مجاورت القا کننده کاتالاز

گروههای حساس شده با	القا کننده		
	کاتالاز (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)	کنترل منفی (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)	کنترل مثبت (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)
ادجوانت	۷/۴۹ $\pm$ ۰/۲۶	۶/۸۶ $\pm$ ۰/۲۵	۲۰/۱۴ $\pm$ ۱/۵۱
کاتالاز	۱۸/۷۷ $\pm$ ۰/۸۸	۷/۵۶ $\pm$ ۰/۶۱	۲۰/۳۳ $\pm$ ۱/۵۱
کونیدی	۸/۳۵ $\pm$ ۰/۲۲	۶/۹۵ $\pm$ ۰/۱۸	۱۸/۵۳ $\pm$ ۱/۰۶
عصاره	۱۷/۶۳ $\pm$ ۳۸۰	۶/۶۴ $\pm$ ۰/۳۱	۱۸/۲۱ $\pm$ ۱/۳۰

جدول ۲. میانگین تولید NO توسط نوتروفیل‌های موشهای حساس شده در گروههای مختلف که پس از آخرین تزریق، در شرایط *in vitro* در مجاورت القا کننده‌های کاتالاز

گروههای حساس شده با	القا کننده		
	کاتالاز (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)	کنترل منفی (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)	کنترل مثبت (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)
ادجوانت	۳/۳۰ $\pm$ ۰/۲۰	۲/۲۱ $\pm$ ۰/۲۴	۱۳/۲۸ $\pm$ ۱/۱۷
کاتالاز	۲۴/۴۵ $\pm$ ۵/۲۱	۲/۶۵ $\pm$ ۰/۵۸	۱۴/۳۹ $\pm$ ۱/۷۴
کونیدی	۱۲/۱۴ $\pm$ ۳/۲۸	۳/۴۲ $\pm$ ۰/۴۹	۲۱/۶۰ $\pm$ ۱/۸۸
عصاره	۳/۸۴ $\pm$ ۰/۲۶	۵/۰۲ $\pm$ ۱/۷۷	۱۳/۶۳ $\pm$ ۱/۲۵

کاتالاز نیتریک اکساید بیشتری  $۱۷/۶۳ \pm ۳۸۰$  نسبت به گروه حساس شده با کونیدی داشتند که این تفاوت از لحاظ آماری معناداری بوده است ( $P \leq ۰/۰۵$ ).

#### میزان نیتریک اکساید تولید شده در نوتروفیل‌ها از گروه حساس شده با کاتالاز

نوتروفیل‌های این گروه نیز پس در معرض قرار گرفتن با القا کننده کاتالاز دارای میزان نیتریک اکساید بیشتری ( $۲۴/۴۵ \pm ۵/۲۱ \mu M$ ) نسبت به اثر گروهها بوده‌اند ( $P \leq ۰/۰۵$ ).

#### میزان نیتریک اکساید تولید شده در ماکروفاژهای صفاقی از گروه حساس شده با کاتالاز

در این گروه ماکروفاژها زمانیکه در معرض القا کننده کاتالاز قرار گرفتند نیتریک اکساید بیشتری  $۱۸/۷۷ \pm ۰/۸۸ \mu M$  نسبت به سایر گروهها تولید کرده بودند این تفاوت از لحاظ آماری معنادار بوده است ( $P \leq ۰/۰۵$ ).

#### میزان نیتریک اکساید تولید شده در ماکروفاژهای صفاقی از گروه حساس شده عصاره میسلومی

در این گروه نیز ماکروفاژها پس از قرار گرفتن در مقابل القا کننده

## بحث

مختلف که تحت القاء عصاره میلیسومی قرار گرفته‌اند به لحاظ تولید نیتریک اکساید نسبت به سلولهایی که تحت اثر کونیدی قرار گرفته‌اند، اختلاف آماری معناداری نداشت احتمالاً بتوان وجود عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی را در عصاره میلیسومی نیز حدس زد.

از آنجایی که میزان تولید نیتریک اکساید ماکروفاژهای صفاقی و نوتروفیل‌ها پس از در معرض قرار گرفتن با آنزیم کاتالاز افزایش یافت. لذا می‌توان از منظر تحریک و افزایش دهنده فعالیت سلولهای عملگر ایمنی می‌توان در تحریک و در یک از این آنزیم جهت طراحی یک مدل واکنش استفاده کرد با توجه به تأکید سازمان بهداشت جهانی (WHO) و انسیتیتو عفونت و آلرژی NIAID در ایجاد طراحی واکنش در خصوص عفونتهای مرتبط با کاندیدا، اسپریژیلوس و کریپتوکوکوس<sup>[۲,۳,۵]</sup>، در مطالعه بعدی از این آنتی‌ژن جهت ایجاد یک مدل واکنش بهره گرفته شد.

## References

- 1- Hearn, V. Wilson, E and Mackenzie, D.W.R (1992). Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity. *J. Med. Micro.* 36: 61-67.
- 2- Albina J., Reichner J. (1998) Role of Nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer. Metas. Rev.* 17, P: 35-53.
- 3- Cenci E., Mencacci A., Bacci A., Kurup VP. (2000) Cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol.* 195(1): 381-385.
- 4- Chiller T., Farrokshad K., Brummer E., Stenens D. (2001) The interaction of Human monocytes, monocyte-derived macrophages, and polymorphonuclear neutrophils with caspofungin (MK-0991), and echinocandin, for antigungal activity against *Aspergillus fumigatus*. *Diag. Mic. Infect. Dis.*

نیتریک اکساید عامل مؤثری بر علیه بسیاری از عفونتهای قارچی مانند هیستوپلاسموزیس و پنی‌سیلیوزیس مارنفتی می‌باشد، مطالعه Bellosi و همکاران نشان داد که شکل میلیسومی قارچ کاندیدا آلبیکنس نیز نسبت به عمل نیتریک اکساید حساس بوده و نیتریک اکساید در توقف رشد کاندیدا چه به صورت مستقیم و چه از طریق همراهی با سایر عوامل، مؤثر است<sup>[۱,۴]</sup>. نتایج در مطالعه حاضر نشان داد زمانی که سلولهای ماکروفاژ و نوتروفیل از موشهای حساس شده در گروههای مختلف با القا کننده کاتالاز انکوبه گشتند افزایشی در میزان تولید نیتریک اکساید نسبت به گروه کنترل ایجاد شد ( $24/45 \pm 5/21$  و  $18/77 \pm 0/88$ ).

استفاده از مهارکننده نیتریک اکساید (N- NMMA (monomethyl-arginine) به همراه کونژوگه و اینترفرون گاما در چاهک‌های کنترل، مقدار تولید نیتریک اکساید را تا سطح حدود ۵ میکرومول کاهش داد. از چنین کاهش سطح نیتریک اکساید می‌توان نتیجه گرفت تولید معنادار NO در گروههای حساس شده به دلیل فعالیت مسیر تولید NO از راه L-argenie بوده است.

مقدار کم نیتریک اکساید تولید شده از گروه موشهای تزریق شده با کونیدی احتمالاً به دلیل وجود برخی از مولکولهایی با وزن مولکولی پایین و دارای خواص ساپرسیو می‌باشد که از فاز کونیدال قارچ اسپریژیلوس تولید شده و بر ارتشاح آنیون سوپراکسید، هیدروژن پراکسید اثر مهاری دارد. اینگونه مولکولها به گرما مقاوم بوده و قبل از جوانه زدن کونیدی ترشح شده و با میکروفیبریل‌های قابل انقباض سیتوپلاسمی وارد واکنش شده، توانایی فاگوسیتوز را کاهش می‌دهد. از سوی دیگر نیز تولید IFN- $\gamma$  و IL-6 را و با استفاده از فاکتورهای AP1 و NF-KB مهار می‌کند<sup>[۴,۱۷,۱۸]</sup>.

گرچه مطالعات بسیار محدودی بر روی نقش کونیدی قارچ اسپریژیلوس بر تحریک سنتز نیتریک اکساید صورت گرفته ولی در مطالعه سال ۲۰۰۳ Latge و همکاران نشان می‌دهد، مدت انکوباسیون و نوع استرین کونیدی اسپریژیلوس به کار رفته نوع و محل ماکروفاژها و گونه میزبان در مقدار تحریک نیتریک اکساید مؤثر می‌باشد<sup>[۱۵]</sup>. از آنجایی که سلولهای مورد آزمون گروههای

- Aspergillus fumigatus*. Trends in Mic. 9(8).
- 13- Mehrad, B., Strieter, RM., Standiford, TJ. (1999) Role of TNF- $\alpha$  in pulmonary Host Defense in Murine Invasive Aspergillosis. J. Immunol. 162: 1633-1640.
- 14- Miles, AM. (1995) Nitric oxide synthase in circulating on polymorphonuclear leukocytes. J. Leukocyte Biol. 58: 616-622.
- 15- Philippe, Granet, I., Perez, MS., Meeren, AV., Latge, JP. (2003) Killing of *Aspergillus fumigatus* by Alveolar Macrophages Is Mediated by Reactive Oxidant Intermediates. Infect. Immun. June, P. 3034-3042.
- 16- Roilides, E., Dimitriadou Georgiadou, A. (1998) Tumor necrosis factors enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. 99: 5999-6003.
- 17- Roilides, ET., Sein, A., Holmes, S. (1995) Effects of macrophage colonystimulating recetor on antifungal activity of monounuclear phagocytes against *aspergillus fumigatus*. J. Infect Dis. 172: 1028-1038.
- 18- Waid, A., Leisenring, W., Burik, J., Bowden, R. (2002) Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergiong bone marrow transplanation. Clin. Infect. Dis. 34: 909-917.
- 39: 99-103.
- 5- DeePe, GS. (1997) Prospects for the development of fungal vaccines. Clin. Mic. Rev. Oct, 585-596.
- 6- Didier, PJ., Paradis, Gladue, RP. (1999) The C-C chemokine MIP-1 induces a selective monocyte infiltration following intradermal injection in to non human primates. Inflamm. 23: 75-90.
- 7- Dixon DM., Casadevall A., Kiein B. (1998) Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. Med. Mycol. 39: 57-67.
- 8- Fuchs, D., Murr, C., Reibnegger, G. (1994) Nitric oxide synthase and antimicrobial a nature of human macrophages. J. Infect Dis. 169: 224-229.
- 9- Gonzalez, A., Gregori, W., Velez, D., Restrepo, A., Cano, L. (2000) Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidiodes brasiliensis* conidia. Infect. Immu. P. 2546-2552.
- 10- Granet, OI., Philoppe, B., Boleti, H., Latge JP. (2000) Phagocytosis and Intracellular Fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in Alveolar Macrophages. Infect. Immu. feb, P. 891-903.
- 11- Latge, JP. (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin. Mic. Rev. Apr, P. 310-350.
- 12- Latge, JP. (2001) The pathobiology of