مقاله پژوهشی

تاثیر قندهای مونوساکاریدی بر شدت بیماریزایی آکانتامبای جدا شده از بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبائی درمحیط کشت سلولی

یحیی معروفی* ، دکتر عبدالحسین دلیمی اصل** ، دکتر فاطمه غفاری فر*** ، دکتر فریبا خوش زبان**** مهدی دلاوری*

دریافت : ۸۵/۲/۱۳ ، پذیرش : ۸۵/۸/۱

چکیده:

مقدمه و هدف: آکانتامبا آمیبی با زندگی آزاد است. که در آب، خاک، هوا و حتی بینی و حلق انسان یافت می شود. آکانتامبا در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و بیماران ایدزی می تواند باعث انسفالیت گرانولوماتوزی و در افراد استفاده کننده از لنز باعث ایجاد کراتیت شود. گونه های بیماریزای آکانتامبا دارای گیرنده های پروتئینی بنام MBP (Mannose binding protein) هستند که از طریق آنها به گلیکو پروتئین های حاوی مانوز در غشاء سلول های هدف می چسبند. اتصال آکانتامبا به سلول های هدف باعث تحریک ترشح پروتئازهایی می شود که اصلی ترین آنها پروتئینی بنام MIP-133 (Mannose induced protein 133) است. مانوز اگزوژن در شرایط in vitro اتصال آکانتامبا را مهار می کند ولی با تحریک ترشح MIP-133 بیماریزائی آکانتامبا را افزایش می دهد. هدف از این مطالعه تعیین تاثیر غلظت های مختلف قندهای مونوساکاریدی بر شدت بیماریزایی آکانتامبای جدا شده از بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبایی در محیط کشت سلولی هلا در زمان های مختلف می باشد.

روش کار: در این مطالعه که از نوع مطالعات تجربی است ، ایزوله آکانتامبا در محیط کشت سلولی هلا کشت داده شد و قندهای گلوکز، مانوز و گالاکتوز با غلظت های نهایی ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ و۰/۱ میلی مولار به پلیت ها افزوده شد. پلیتها پس از گذشت ۸، ۱۶، ۳۲، ٤٨ و۷۲ ساعت از کشت انگل در سلول با میکروسکوب معکوس بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که مانوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار بیشترین تاثیر را در افزایش اثرات سایتوپاتیک آکانتامبا دارد، همچنین گالاکتوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۳۲ ساعت از کشت اثرات سایتوپاتیک آکانتامبا را افزایش داد.

نتیجه نهایی: اضافه کردن قند های مانوز و گالاکتوز به محیط کشت سلولی هلای حاوی آکانتامبا بیماری زایی انگل را بصورت چشمگیر افزایش می دهد.

کلید واژه ها : آکانتامبا / سلول هلا / شدت بیماریزایی / کراتیت / مونوساکاریدها

مقدمه :

آکانتامبا (Acanthamoeba) آمیبی است با زندگی آزاد که در خاک، آب، هوا، فاضلاب و حتی حلق و بینی افراد یافت می شود. در شرایط طبیعی انگل به فرم تروفوزوئیت دیده می شود که دارای پاهای خاری شکل بنام آکانتوپودیا(Acanthopodia) است و از باکتری ها تغذیه می کند، ولی در شرایط نامساعد به فرم کیستی در می آید و نسبت به عوامل شیمیایی، مواد ضد عفونی

* کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

** استاد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس(dalimi4@yahoo.com)

*** استادیار گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

**** استادیار گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID

www.SID.ir

کننده، عوامل فیزیکی، حرارت و خشکی، مقاوم است. ساختمان کیست از مدتها قبل اساس شناسایی و طبقه بندی گونه ها بوده است(۱).

تمام گونه های آکانتامبا در محیط کشت آگار غیر مغذی (Non-Nutrient Agar) N.N.A ، همراه یک باکتری مناسب مثل اشرشیا کلی (Eschershia coli) بعنوان منبع غذایی در دمای۲۵ درجه سانتیگراد رشد می کنند. گونه های جدا شده از بیماران در دمای۳۷ درجه سانتیگراد و بالاتر رشد می کنند(۲).

انسان دائما در معرض این انگل قرار دارد. راههای ورود انگل به داخل بدن متفاوت است؛ از راه پوست آسیب دیده که در تماس با انگل می باشد، یا از طریق مجاری تنفسی بصورت کیست موجود در هوا یا باد وارد بدن می شود و از طریق دستگاه گردش خون خود را به سیستم عصبی و اندام های دیگر میرساند. انگل دو نوع آلودگی می دهد: در افراد با نقص سیستم ایمنی و ایدزی، عامل گرانولوماتوز انسفالیت آمیبی (Granulomatose Amoebic Encephalitis) GAE است و نوع دیگر آلودگی کراتیت آمیبی است که ممکن است در افراد سالم بوجود آید. لنزهای تماسی اصلی ترین ریسک فاکتور در ایجاد کراتیت آمیبی است. علائم شامل؛ درد شدید چشم، ترس از نور و التهاب حلقوی شکل قرنیه است(۳).

اولین مرحله در بیماریزائی آکانتامبا چسبیدن به سطح سلول است. مطالعات نشان داده که در سطح انگل گیرنده هایی پروتئینی بنام (Mannose Binding Protein) MBP با وزن ۱۳۶ کیلو دالتون وجود دارد که به گلیکو پروتئین های حاوی مانوز (Mannose) در سطح سلولهای هدف متصل می شود(۷-۳).

همچنین مشاهده شده است که MBP در چسبندگی به سطوح اجسام نقش دارد. مانوز اگزوژن میزان چسبندگی انگل به سطح را کاهش می دهد(۸). MBP در بیماریزائی آکانتامبا نقش دارد و اتصال آن به مانوز باعث القاء ترشح پروتئینی با وزن ۱۳۳ کیلو دالتون در آکانتامبا می شود و آن را (Mannose-Induced Protein) MIP-133 می نامند. این پروتئین در محیط کشت باعث تخریب کلاژن I و IV انسان می شود(۹،۱۰).

اضافه کردن مانوز به محیط کشت سلولی سلول های اپیتلیال قرنیه انسان باعث افزایش اثر سایتوتوکسیک آکانتامبا می شود(۱۰). مانوز از طریق افزایش ترشح پروتئازهای آمیب، اثرات سایتوپاتیک (Cytopathic effect) CPE را در سلولهای اپیتلیال قرنیه تقویت می کند(۱۰، ۶). هدف از انجام این مطالعه تعیین تاثیر غلظت های مختلف قندهای مونوساکاریدی بر پاتوژنیسیته آکانتامبای جدا شده از بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبایی در محیط کشت سلولی هلا در زمانهای مختلف می باشد.

روش کار:

نمونه برداری از بیماران: در این مطالعه تجربی به کمک چشم پزشک برش هایی از قرنیه افراد مبتلا به کراتیت آکانتامبائی داده شد. نمونه ها در بافر Page's Saline به آزمایشگاه منتقل شدند. در این مطالعه از سه ایزوله بیماریزا استفاده شد.

کشت آکانتامبا: نمونه ها در محیط کشت آگار غیر مغذی NNA به همراه باکتری اشرشیا کلی، بعنوان منبع غذایی، کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس تعدادی از نمونه ها در محیط کشت اگزنیک P.Y.G (Glucose Yeast Peptone) کشت داده شدند. در کشت اگزنیک برای جدا کردن کیست های آکانتامبا ، سطوح پلیت حاوی محیط NNA با استفاده از PBS شستشو داده شد. به منظور حذف سایر میکروارگانیزم های همراه آمیب، رسوب حاصل سه بار با اسید کلریدریک ۳٪ شستشو داده شد. تعداد 10^4 کیست از هر ایزوله به فلاسک حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط اگزنیک افزوده شد و نمونه ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۱).

کشت سلول هلا : سلول هلا از موسسه پاستور ایران در تهران تهیه شد و در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) به همراه FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰٪ در فلاسک های جنس پلی استیرن (شرکت NUNC دانمارک) کشت داده شد. فلاسک های حاوی سلول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و 5٪ CO2 انکوبه شدند.

قندهای مونوساکاریدی : در این تحقیق از قندهای مانوز، گالاکتوز و گلوکز با غلظتهای نهایی ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ . ۰/۱ میلی مولار استفاده شد.

اضافه کردن انگل و قند به سلول : سلول در پلیت های ۲۴ خانه ایی کشت داده شد و پس از آنکه تبدیل به مونولایر شد به هر کدام از چاهک ها یک میلی لیتر DMEM حاوی 10^4 انگل اضافه شد. سپس به هر چاهک بطور

Archive of SID

www.SID.ir

جداگانه یک میلی لیتر از قندهای مانوز، گلوکز یا گالاکتوز با دو برابر غلظت قند افزوده شد تا غلظت نهایی ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ ، ۰/۱ میلی مولار گردد . بـرای هـر غلظـت ۱۰ بـار تکرار در نظر گرفته شد. تعداد ده چاهک نیز تنهـا حـاوی سلول و انگل بودند که بعنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

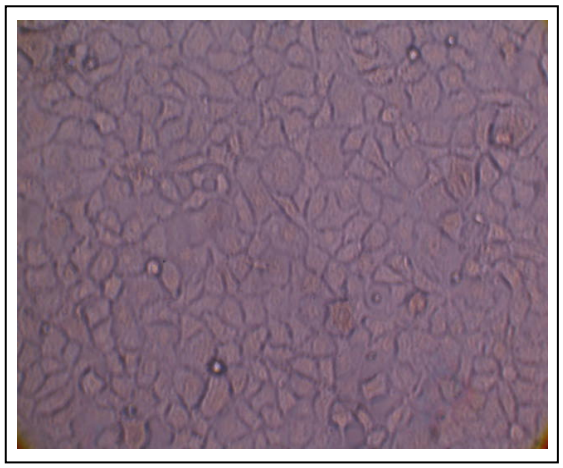
بررسی پلیت ها : پلیت ها پس از گذشـت زمانهـای ۸، ۱۶، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ سـاعت بـا میکروسـکوب معکـوس بررسـی شدند. معیار بررسی CPE مشاهده پلاک در بین سـلولهای مونولایر بوده است تعداد پلاک های هـشت منطقـه از هـر چاهک بررسی و شمارش شد.

آنالیز داده ها: آنالیز داده ها با استفاده از روش من ویتنی یو برای مقایسه هر گروه با کنترل و روش آنوا یک طرفه برای مقایسه گروه ها با یکدیگر انجام شد.

نتایج :

میانگین و انحراف معیار تعداد پلاک های ایجاد شـده در کشت سـلولی هـلای آلـوده بـه آکانتامبـا در مجـاورت قندهای مونوساکاریدی در جدول ۱ آورده شده است.

این حالت درهر سه ایزوله مشابه بـوده اسـت. پـس از گذشت ۸ ساعت از کشت آکانتامبا در کشت سـلولی هـیچ پلاکی مشاهده نشد (تصویر ۱).



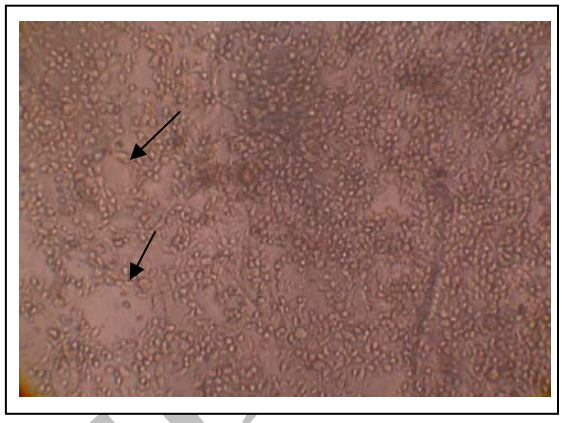
تصویر۱ : سلول هلا در محیط کشت و بدون انگل؛ سلولها کاملا چسبیده به هم هستند و هیچ پلاکی دیده نمی شود

جدول ۱ : میانگین و انحراف معیار تعداد پلاک های تشکیل شده بر حسب غلظت های مختلف قندهای مونوساکاریدی در محیط کشت سلولی هلا حاوی آکانتامبا پس از گذشت ۱۶، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ ساعت

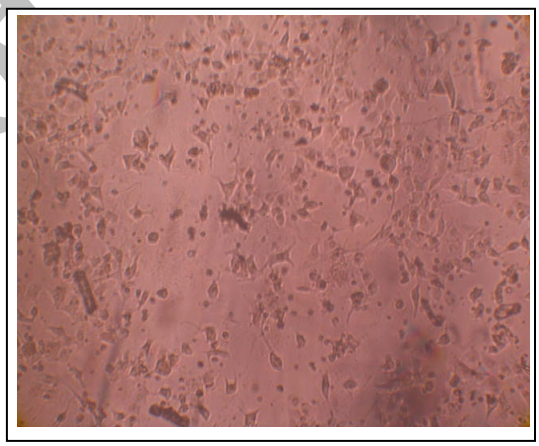
	غلظت (مینی مولار)					زمان
	۱۰۰	۵۰	۱۰	۱	۰/۱	(ساعت)
	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین± انحراف‌معیار	
مانوز						
	۴/۳۷±۲/۷۷	۲±۱/۱۹	۱/۱۲۵±۰/۸۳	۰/۸۷±۰/۶۴	۰/۸۷±۰/۸۳	۱۶
	۵/۰±۰/۷۵	۳/۱۲±۱/۶۴	۲/۶۲±۱/۰۶	۲/۲۵±۰/۷	۲/۰±۰/۷۵	۳۲
	۷/۵۰±۱/۳	۶/۲۵±۲/۲۵	۴/۷۵±۲/۱۲	۴/۱۲±۱/۲۴	۴/۰±۰/۹۲	۴۸
	۳۸/۵±۳/۰۷	۳۵/۷۵±۵/۳۱	۲۹/۷۵±۱/۴۸	۲۴/۳۷±۲/۵	۲۱/۷۵±۲/۸۱	۷۲
گلوکز						
	۱/۵±۱/۴۱	۱/۰±۱/۰۶	۱/۰±۱/۰۶	--	--	۱۶
	۲/۱۲±۱/۷۲	۲/۰±۰/۷۵	۱/۸۷±۱/۲۴	--	--	۳۲
	۴/۱۲±۱/۶۴	۴/۲۵±۱/۹	۴/۱۲±۱/۸	--	--	۴۸
	۱۸/۲۵±۴/۷۷	۱۸/۷۵±۲/۳۱	۲۰/۵±۲/۹۷	--	--	۷۲
گالاکتوز						
	۲/۰±۱/۱۹	۱/۰±۰/۹۲	۰/۸۷±۰/۶۴	--	--	۱۶
	۳/۷۵±۱/۲۸	۲/۰±۱/۰۶	۲/۲۵±۱/۰۳	--	--	۳۲
	۶/۰±۲/۱	۴/۳۷±۲/۱	۴/۱۲±۱/۳	--	--	۴۸
	۲۷/۷۵±۲/۲۵	۱۹/۲۵±۲/۰۵	۱۹/۲۵±۲/۸۱	--	--	۷۲
کنترل (بدون قند)			۱/۵±۰/۵۹			۱۶
			۲/۲۵±۰/۴۱			۳۲
			۴/۲۵±۰/۴۱			۴۸
			۲۰±۰/۹۲			۷۲

www.SID.ir

ولی با گذشت زمان بیشتر بتدریج پلاک ها ظاهر و تعداد آنها افزایش یافت (تصویر ۲) بنحوی که بیشترین تعداد پلاک در چاهکهای حاوی مانوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۷۲ ساعت بوده است(تصویر ۳).



تصویر۲ : چاهک حاوی گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۳۲ ساعت از کشت آکانتامبا در سلول هلا؛ پلاکها با پیکان نشان داده شده اند.



تصویر۳ : چاهک حاوی مانوز ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت آکانتامبا در سلول هلا؛ تخریب گسترده سلولها مشاهده می شود.

بررسی پلیت ها پس از گذشت ۱۶ ساعت نشان داد که تنها میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با کنترل دارای اختلاف معنی دار بود ($P<0.05$) . پس از گذشت ۳۲ ساعت از کشت انگل میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز و گالاکتوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بودند ($P<0.05$) . در ساعت ۴۸ میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز ۱۰۰، ۵۰ و گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بودند ($P<0.05$) و در ساعت ۷۲ از کشت میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ و گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بودند ($P<0.05$).

بحث:

در این مطالعه ملاک بیماری زا بودن آمیب این است که از قرنیه بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبائی جدا شده و در محیط های کشت سلولی قادر به ایجاد پلاک است. چسبندگی آکانتامبا به سلولهای میزبان، مرحله ای مهم و حیاتی برای بیماری زا بودن آمیب است. مطالعات نشان داده است که چسبندگی آمیب آنتامبا هیستولتیکا از طریق گیرندهایی برای گلیکوپروتئینهای سطح غشاء سلولهای میزبان صورت می گیرد. همچنین مشخص شده که گالاکتوز مانع چسبندگی آنتامبا هیستولتیکا می شود(۴). آکانتامبا پس از چسبیدن شروع به ترشح پروتئازهایی می کند که باعث تخریب سلولهای هدف می شود. مهمترین این پروتئازها پروتئینی بنام MIP-133 است که در شرایط آزمایشگاهی باعث تخریب کلاژن I, IV می شود. چسبیدن آکانتامبا به گلیکوپروتئینهای سطح غشاء سلول های هدف باعث تحریک ترشح MIP-133 می شود و آن هم منجر به افزایش اثرات سایتوپاتیک انگل می شود. تمام مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته اثرات مانوز در افزایش شدت بیماریزائی آکانتامبا را در محیط های کشت سلولی مختلف، نشان می دهند (۱۰-۴). نتایج این مطالعه نیز موید همین مطلب است. بدین ترتیب که از بین قندهای مونوساکاریدی مانوز تاثیر قابل ملاحظه ای بر افزایش بیماریزایی آکانتامبا در سلولهای هلا داشته است. از طرفی میزان تاثیرمانوز به غلظت قند و زمان انکوباسیون بستگی داشته است بدین ترتیب که با افزایش غلظت و یا زمان انکوباسیون بیماری زایی انگل افزایش می یابد.

همچنین طبق نتایج این مطالعه گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار شدت بیماریزائی آکانتامبا را افزایش می دهد این افزایش در ساعت ۳۲ و ساعت های بعد از ۳۲ مشاهده شد. در هیچ مطالعه ایی اثر گالاکتوز در افزایش بیماریزائی آکانتامبا تاکنون گزارش نشده است.

ممکن است ملکولهای سطحی مختلفی در چسبیدن تروفوزوئیت های آکانتامبا به سلولهای اپیتلیال نقش داشته باشند. در این مطالعه از سلول هلا استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

سلول هلا سلولی انسانی است و می توان نتـایج حاصـل از آن را تا حدودی به سـایر سـلول هـای انـسان تعمـیم داد. شناسائی مکانیسم های دخیل در چسبندگی آکانتامبا بـه سلول ها و تعیین اهمیت آن می تواند به شناخت بیمـاری زائی آکانتامبا و درمان آن کمک کند. البته برای شناسـائی ملکول های سطحی دخیل در چسبندگی نیاز به مطالعات بیشتری هست لذا پیشنهاد می شـود کـه تـاثیر قنـدهای دیگر با غلظـت هـای مختلـف و در محـیط کـشت هـای مختلف سلولی، بر شدت بیمـاریزائی آکانتامبـا نیـز تحـت مطالعه قرار گیرد.

نتیجه نهایی:

بطور کلی از این مطالعه می توان چنین نتیجه گرفـت که اضافه کردن قند های مانوز و گالاکتوز به محیط کشت سلولی هلای حاوی آکانتامبا بیماری زایی انگل را بـصورت چشمگیر افزایش می دهـد. ایـن نتیجـه در ارزیـابی هـای بالینی بیماری های ناشی از آکانتامبا نیز مـی توانـد مـورد توجه قرار گیرد.

منابع :

1. Shuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. J Parasitol 2004; 34 1001-1027.
2. Jonckheere J. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. Appl Environ Microbial 1980; 39(4): 681-685.
3. Martinz AJ. Free-living Amoeba: natural history, prevention, diagnosis, pathology, and treatment of disease. Florida : CRC Press, Boca Raton, 1985: 156.
4. Khan N. A. Role of mannose binding protein in the pathogenesis of *Acanthamoeba.* J Euk Microbiol 2002; 50: 8-10.
5. Kennett MJ, Hook RR, Craig Jr, Franklin L, Riley LK. *Acanthamoeba castellanii:* characterization of adhesion molecule. Exp Parasitol 1999; 92:161-169.
6. Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanism of *Acanthamoeba*. J Biol Chem 1998; 273, 15838-15845.
7. Allen PH, Dawidowicz E. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: a mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. J Cell Physiol 1990;145(3):508-513.
8. Bouyer SI, Merlaud A, Imbert C, Daniault G, Rodier MH. A mannose binding protein is involved in the adherence of *Acanthamoeba* species to inert surfaces. Microbial. Letter. 2004; 238: 207-211
9. Hurt M, Neelam S, Niederkorn J, Alizadeh H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. J Infect Immun 2003;71(11):6243-6255.
10. Leher H, Silvany R, Alizadeh H, Huang J, Niederkorn JY. Mannose induced the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. Infect Immun 1998; 66:5-10.
11. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4th ed. Washington D.C: ASM, 2001:850-872.

Archive of SID

www.SID.ir