Archive of SID

تأثیر تغییرات pH و حرارت در محیط کشت آکسنیک پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا

دکتر سیدحسین حجازی*، سیمین‌دخت سلیمانی‌فرد**، جواهر چعباوی‌زاده**

چکیده مقاله

مقدمه. فرم تاژکدار یا پروماستیگوت انگل لیشمانیا که عامل بیماری لیشمانیوز می‌باشد از طریق نیش پشه خاکی آلوده به میزبان مهره‌دار از جمله انسان منتقل شده و در داخل سلولهای بیگانه خوار تک هسته‌ای به فرم غیر متحرک و بدون تاژک اماستیگوت تبدیل می‌گردد. کشت و تکثیر پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا در محیطهای کشت نیمه جامد و دو فازی انجام می‌شوند منتهی با توجه به تفاوتهای متابولیکی، بیوشیمیایی، آنزیمی و غیره که این فرم انگل با فرم اماستیگوت دارد، یافتن راه آسانی برای دسترسی به اشکال اماستیگوت که شکل مربوط به بدن انسان است از نظر کنترل موفقیت آمیز آلودگی حاصل از ارگانیسم و بخصوص طراحی روشهای جدید درمانی مفید می‌باشد.

روشها. ابتدا L. major (MRHO/IR/75/ER) از موشهای Balb/c از قبل آلوده شده از طریق اتوپسی موشها و تلقیح غدد لنفاوی آنها به داخل محیط کشت N.N.N اصلاح شده جدا شد. سپس اشکال پروماستیگوت انگل به فلاسکهای حاوی محیط کشت سلولی RPMI 1640 با pH، ۷/۲ کامل شده با ٪۲۰ FCS و دمای نگهداری ۲۵ċ انتقال داده شد تا انگلها به تولید انبوه برسند. محیط کشتهای RPMI 1640 با شرایط pHهای ۳/۵، ۴/۵ و ۵/۵ (۰/۱±) تهیه شد و تعداد 5×10^{6}/ml انگل در چند سری از محیط کشتهای فوق بررسی شد. تمامی محیطها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱ċ±۲۶ و سپس در دماهای ۲۸ċ، ۳۲°c و ۳۷ċ جهت رشد و تکثیر اینکوبه گردید.

نتایج. پس از گذشت مدت زمان لازم مناسب‌ترین محیط از نظر بیشترین میزان بازده اماستیگوت در محیط کشتی که ۷۲ ساعت قبل در ۱ċ±۲۶ اینکوبه بوده است با 5/5pH و دمای ۳۷ مشاهده گردید ($P<0/05$). تا زمان خارج نمودن محیط کشتها از درجه حرارت اینکوباسیون حضور اماستیگوتها در محیط کشت قابل مشاهده بود.

بحث. پس از ۷۲ ساعت اینکوبه بودن در ۱ċ±۲۶، پروماستیگوتها به فاز متاسیکلیک که همان فاز عفونی زا است وارد شده و با شرایط pH و درجه حرارت تغییر فرم پروماستیگوتها به اشکال اماستیگوت آغاز می‌گردد. وجود درصد بالایی از اشکال متاسیکلیک به عنوان یک عامل مهم برای تغییر شکل موفقیت آمیز پروماستیگوت به اماستیگوت تحت شرایط آکسنیک لازم است. همچنین به دنبال شوک حرارتی اشکال پروماستیگوت با میزان درصد بالایی به فرم اماستیگوت تغییر حالت می‌یابند و رشد خوب اماستیگوت در 5/5pH نشان دهنده اسیدوفیل بودن فرم اماستیگوت لیشمانیا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی. پروماستیگوت، آماستیگوت، آکسنیک، کشت، لیشمانیا

مقدمه

لیشمانیوز به گروهی از بیماریها اطلاق می‌شود که توسط تک یاخته‌های جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. ارگانیسم ایجاد کننده بیماری در قاره قدیم L.aethiopica, L. tropica, L.major می‌باشد. اشکال قابل مشاهده انگل دو شکل پروماستیگوت و اماستیگوت می‌باشد (۱).

اماستیگوت که در انسان و مهره‌داران دیگر دیده می‌شود اجسام گرد یا بیضی شکل با اندازه ۲/۵μ هستند و فاقد تاژک آزاد می‌باشند. این شکل از انگل در میزبان پستاندار عمدتاً در مارکروفاژها زندگی می‌کند و در آنجا به صورت تقسیم دوتایی تکثیر یافته و با پاره شدن ماکروفاژ، ماکروفاژهای مجاور را آلوده می‌نماید (۲).

زندگی این مرحله از انگل در داخل فاگولیزوزومها توسط Vikerman, Alexander (۱۹۷۵) برای L.mexicana توضیح داده شد (۳). فرم پروماستیگوت به صورت اجسام دوکی تاژکدار به طول ۲۵-۱۵μ و عرض ۳-۲μ در روده پشه ناقل تکثیر می‌یابد و بعداً به قسمت فوقانی دستگاه گوارش پشه مهاجرت می‌کند و خود را به حلق و غدد بزاقی می‌رساند. انگلهایی که توسط نیش پشه در پوست تلقیح شده‌اند بوسیله ماکروفاژها بلع شده و از فرم پروماستیگوت به فرم اماستیگوت تبدیل و شروع به تکثیر می‌کنند (۲). اماستیگوت از نظر خصوصیاتی مثل پروتئینهای سطحی، آنزیمهای گوناگون و مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیکی با پروماستیگوت

* استادیار گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
** کارشناس ارشد گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

انگل تفاوت دارد. کشت (In vitro Culture) انگل به معنای فراهم آوردن مجموعه شرایطی در محیط آزمایشگاه است که در آن شرایط انگل تمام یا قسمتی از چرخه زندگی خود را در خارج از بدن میزبان مناسب کامل کند. معمولاً این شرایط با استفاده از محیطهای کشت سنتتیک همراه با افزودنیهای لازم در یک فلاسک کشت فراهم می‌گردد. کشت و تکثیر پروماستیگوتها در In vitro به سادگی در محیطهای کشت نیمه جامد دو فازی مایع انجام می‌شود (Evans, ۱۹۸۹) ولی تکثیر اشکال اماستیگوت انگل یعنی شکل مربوط به میزبانان خونگرم در شرایط آزمایشگاهی بسیار مشکل و وقت گیر است (۲، ۴).

دسترسی آسان به این شکل از انگل می‌تواند کمک شایانی از نظر مبارزه موفقیت‌آمیز با آلودگی حاصل از این ارگانیسم و بخصوص طراحی روشهای درمانی قاطع، بررسی واکنشهای متقابل میزبان و انگل و بررسیهای بیوشیمیایی، ایمنولوژیکی بنماید.

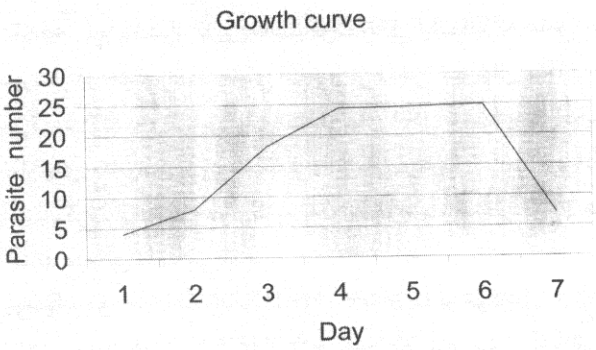
کشت مرحله آماستیگوت انگل در ماکروفاژهای پریتوان موش و هامستر توسط Dwyer, Chang در ۱۹۷۸ انجام شده است (۵). همچنین Changدر ۱۹۸۰ (۶)، Giannini و همکاران در ۱۹۸۱ (۷)، Nonsy و Diggs، در ۱۹۸۱ (۸)، Sacks و همکاران در ۱۹۸۳ (۹) نیز در انجام چنین عملی موفق گردیده‌اند.

تحقیقات فوق با استفاده از ماکروفاژهای آلوده کشت داده شده در In vitro و نیز ماکروفاژهای مشتق شده از انسان و یا سلولهای جنینی بوده است. از معایب این روشها صرف وقت زیاد، آلودگی با مواد مشتق از میزبان، استفاده از تجهیزات پیچیده و صرف هزینه‌های بالا می‌باشد. علاوه بر آن ماکروفاژهایی که از حفره صفاق بدست آمده‌اند تقسیم شونده نیستند و کشت انبوه نیازمند یک نسل سلولی ماکروفاژهای تقسیم شونده است. با توجه به این امر تولید آماستیگوت در محیطهای کشت آکسنیک می‌تواند منبع مطمئنی به منظور فراهم نمودن این شکل از انگل در مطالعات مختلف باشد.

لذا در این مطالعه یک روش نسبتاً آسان و ارزان مثل تغییر فاکتورهای دما و pH امکان دسترسی به اماستیگوتهای انگل لیشمانیا در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

روشها

در ابتدا برای حصول اهداف پیش‌بینی شده نیاز به تولید انبوه انگل لیشمانیا بود. به این منظور ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر PBS حاوی ۲×۱۰^{۶} انگل L. major (MRHO/IR/75/ER) تهیه شده از انستیتو پاستور به قاعده دم موشهای Balb/c به صورت زیر جلدی تلقیح شد. پس از گذشت ۳ الی ۴ هفته در محل تلقیح زخم ایجاد شد و انگلهای بدست آمده از زخم و همچنین طحال موش به محیط کشت NNN اصلاح شده انتقال داده شد (۱۰). پس از مدت سه الی چهار روز با زیاد شدن تعداد انگلهای کشت داده شده، ارگانیسمها از این محیط به محیط کشت سلولی RPMI 1640 تکمیل شده با سرم جنین گوساله (FCS) به میزان ۱۰٪ انتقال یافت و در دمای ۱۶±۲۶ انکوبه گردید (محیط کشت اولیه) همچنین محیط کشت جداگانه‌ای نیز با شرایط مشابه فوق تهیه شد و با شمارش پروماستیگوتهای آن در روزهای متوالی منحنی رشد انگل رسم گردید (نمودار ۱). سپس برای ادامه مراحل بعدی آزمایش به کمک اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم ۱ نرمال محیط کشت RPMI 1640 با pH های ۳/۵، ۴/۵ و ۵/۵ تهیه شد و ۲۰٪ سرم جنین گوساله (FCS) نیز به عنوان مکمل به آن اضافه گردید.



نمودار ۱. منحنی رشد انگل leishmania major **در محیط کشت** RPMI 1640 **در شرایط، اپتیمم: (pH=۲/۷ و دمای ۱۶±۲۶)**

محیط کشت اولیه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۶±۲۶ اینکوبه گردید و سپس تعداد ۵×۱۰^{۶} انگل از این محیط به هر یک از محیط کشتهای با pH ۳/۵ ، ۴/۵ و ۵/۵ ساخته شده منتقل گردید به طوری که از هر pH سه محیط کشت مجزا تهیه شد و سپس همگی آنها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۶±۲۶ قرار داده شد و بعد هر سری سه تایی این فلاسکها به دمای ۳۲،۲۸، ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل گردید. به این ترتیب که در هر یک از دماهای ذکر شده یک سری سه تایی کشت انگل با سه pH متفاوت وجود داشت. سپس در سه روز متوالی تعداد انگلهای رشد کرده از نظر مرفولوژی و تعداد، بررسی و بوسیله لام نئوبائر شمارش گردید.

آزمایش مجدداً با تغییر زمانی انکوباسیون اولیه تکرار گردید به این ترتیب که پس از ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت انکوباسیون محیط کشت اولیه در دمای ۱۶±۲۶ مطابق روش ذکر شده تعداد ۵×۱۰^{۶} انگل از محیط کشت مذکور به فلاسکهای کشت با pH های ۳/۵ ، ۴/۵ و ۵/۵ منتقل و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۱۶±۲۶ قرار گرفتن به دماهای ۲۸، ۳۲، ۳۷ منتقل گردید و فلاسکهای کشت در روزهای متوالی از نظر تعداد و شکل پروماستیگوت و آماستیگوت بررسی و شمارش شده و نسبت تعداد آماستیگوت به پروماستیگوت در مراحل مختلف ثبت شد.

نتایج

ابتدا تک یاخته‌های ایزوله شده از موش به محیط کشت NNN و سپس

www.SID.ir

Archive of SID

RPMI 1640 منتقل گردیده و در دمای ۱۶±۲۶ اینکوبه شد. با شمارش پروماستیگوتهای رشد یافته در محیط کشت در روزها متوالی منحنی رشد انگل رسم گردید (نمودار ۱).

به منظور تعیین شرایط رشد اماستیگوت نسبت تعداد اماستیگوت به پروماستیگوت رشد یافته در هر یک از محیط کشتها مشخص شد که نتایج حاصل در جدولهای ۱، ۲ و ۳ ذکر شده است.

جدول ۱. نسبت تعداد اماستیگوت به پروماستیگوت تولید شده در یک فلاسک کشت در دمای ^{oc}۲۸

pH	زمان انکوباسیون محیط کشت اولیه در ^{oc}۱±۲۶			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
	نسبت تعداد آماستیگوت به پروماستیگوت			
۳/۵	۰/۴۷	۰/۴۹	۰/۳۳	۰/۷۳
۴/۵	۰/۶۴	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۶۴
۵/۵	۰/۷	۰/۷۳	۰/۸	۰/۱۱

جدول ۲. نسبت تعداد اماستیگوت به پروماستیگوت تولید شده در یک فلاسک کشت در دمای ^{oc}۳۲

pH	زمان انکوباسیون محیط کشت اولیه در ^{oc}۱±۲۶			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
	نسبت تعداد آماستیگوت به پروماستیگوت			
۳/۵	۰/۹	۲/۳۵	۳/۷	۰/۴۷
۴/۵	۰/۸۴	۱/۴	۰/۸	۱/۷
۵/۵	۲/۲۱	۱/۲۵	۰/۹	۰/۵۲

جدول ۳. نسبت تعداد اماستیگوت به پروماستیگوت تولید شده در یک فلاسک کشت در دمای ^{oc}۳۷

pH	زمان انکوباسیون محیط کشت اولیه در ^{oc}۱±۲۶			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
	نسبت تعداد آماستیگوت به پروماستیگوت			
۳/۵	۶/۸	۳/۵۴	۴/۳	۳/۹۴
۴/۵	۶/۷	۳/۲۷	۴/۲	۷/۵
۵/۵	۵/۳	۱/۳	۸/۷	۲/۴

بر طبق نتایج بدست آمده فوق می‌توان اینگونه استنباط کرد که افزایش دما تا ۳۷ درجه سانتیگراد در تغییر شکل پروماستیگوت به اماستیگوت بسیار حائز اهمیت است هر چند که کاهش pH نیز در انجام این عمل دخیل می‌باشد چرا که pHهای مورد استفاده همگی زیر pH قلیایی و متمایل به اسیدی می‌باشند. حضور اماستیگوتها تا زمان حذف محیط کشت از شرایط انکوباسیون قابل رویت بوده است.

بحث

در این تحقیق تلاش گردید که میزان رشد و تبدیل به فرم اماستیگوت در فازهای مختلف تکثیر انگل در مرحله پروماستیگوت بررسی گردد. به همین منظور همانگونه که در قسمت مواد و روشها توضیح داده شده است، محیط کشت اولیه سه الی چهار روز در شرایط اپتیمم ۱۶±۲۶ نگهداری شد تا مراحل تکثیر انگل از فاز لگاریتمی تا فاز ایستا طی گردد. علاوه بر این همانگونه که ذکر شد جهت جلوگیری از مرگ تک یاخته در اثر افزایش یکباره دما، تمام محیط کشتها به مدت ۲۴ ساعت در ۱۶±۲۶ انکوبه شدن و سپس به دمای مورد نظر انتقال یافت. رعایت شرایط فوق به منظور جلوگیری از تأثیر سایر عوامل در تبدیل به فرم اماستیگوت انجام شده‌است.

بررسی نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بیشترین نسبت تعداد آماستیگوت به پروماستیگوت بدست آمده در کشت مربوط به کشت پروماستیگوت ۳ روزه (پروماستیگوتهایی که ۷۲ ساعت قبل از کشت در دمای ۱۶±۲۶ اینکوبه بوده است) در pH، ۵/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد (جدول ۳). چنانچه در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود پایان فاز لگاریتمی انگلها روز سوم می‌باشد در این حالت نسبت بیشتری از پروماستیگوتها در فاز متاسیکلیک، فرم پروماستیگوتهای باریک، کوچک، با فلاژلهای نسبتاً طویل هستند که در محیط In Vitro به تعداد زیاد در فاز سکون رشد انگلها ایجاد می‌شود (۲). کشت طولانی مدت انگل به عنوان یک کشت اماستیگوت خالص نیاز به درصد بالایی از اشکال متاسیکلیک دارد. وجود درصد بالایی از اشکال متاسیکلیک به عنوان یک عامل مهم برای تغییر شکل موفقیت آمیز تحت شرایط آکسینیک معرفی شده است (۲).

با تأکید بر مطالب فوق مبنی بر اهمیت فاز متاسیکلیک در تغییر شکل اشکال پروماستیگوت به اماستیگوت باید توجه داشت که افزایش دما تا ۳۷ درجه سانتیگراد نیز در این تغییر شکل بسیار حائز اهمیت است. افزایش حرارت در زندگی عادی انگل به عنوان بخش مهمی از چرخه زندگی ارگانیسم مطرح می‌باشد بطوری که اثبات شده است که سنتز گروهی از پروتئینهای با وزن ملکولی پایین (۱۷-۴۰KD) در درجه حرارتهای بالا در پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا القاء می‌گردد (۱۱).

در این بررسی مشخص شد که به دنبال شوک حرارتی (heat Shock)، اشکال پروماستیگوت موجود در محیط کشت به فرم اماستیگوت تغییر حالت می‌یابند.

در آزمایشاتی که در سال ۱۹۸۴ توسط Pan بر روی L. mexicana نیز انجام شد، تأثیر دما بر تغییر شکل انگل از پروماستیگوت به اماستیگوت در محیط کشت به اثبات رسید (۱۲).

طیف pH محیط زندگی انگل در محیط خارج سلولی در روده میانی پشه خاکی با pH>۸، تا واکوئلهای فاگولیزوزومی ماکروفاژهای پستانداران با pH<۶ متغیر است. تک یاخته امکان زیست در pHهای متغیر را با تغییر شرایط بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خود جبران می‌نماید که در نهایت منجر

www.SID.ir

Archive of SID

به تغییر شکل انگل از فرم آماستیگوت به پروماستیگوت و یا بالعکس می‌گردد و در حقیقت با تغییر pH محیط، ژنهای افتراقی جهت عملکرد بیوشیمیایی انگل بروز می‌نمایند که مناسب زیست در محیط کشت و یا انسان می‌باشد (۱۳).

pH انتخاب شده در این مطالعه به ترتیب از pH=۷/۲ که در محیط کشت نرمال (کشت پروماستیگوت) انگل مورد استفاده قرار می‌گیرد تا شیب به طرف وضعیت اسیدی دارای تغییر بود. همانطور که Bates و همکاران در ۱۹۹۲ توانستند بهترین تغییر شکل پروماستیگوت به اماستیگوت را در محیط کشت Drosophila Schneiders' Insect Medium با pH ۵/۴ بدست آوردند و طبق نظر آنها این نکته نشان دهنده اسید و فیل بودن فرم اماستیگوت لیشمانیا است (۱۴).

همچنین Hodgkinson و همکاران در ۱۹۹۶ توانستند تغییر شکل پروماستیگوت به اماستیگوت را در pH ۴/۶ بدست آوردند (۱۵) که نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر تقریباً یکسان بوده است.

در یک جمع بندی کلی می‌توان گفت که تغییر شرایط کشت به صورت افت pH و ارتقاء درجه حرارت مجموعاً اثرات مضاعفی را در تغییر حالت انگل از شکل پروماستیگوت به اماستیگوت ایجاد می‌نماید.

مقایسه ساختمان اماستیگوتهای تهیه شده در In vitro نشان داده است که از نظر بسیاری از خصوصیات آنتی‌ژنی، مرفولوژی، بیوشیمیایی و بیولوژی مشابه همان فرم اماستیگوت موجود در ماکروفاژهای میزبان مهره دار (In vivo) بوده و از پروماستیگوت متفاوت می‌باشد (۱۶).

لذا چنین روشی در آینده به پژوهشگران در مورد بررسیهای درمانی، واکسیناسیون، خصوصیات ایمنولوژیکی و بیوشیمیایی انگل کمکهای شایانی می‌نماید.

تقدیر و تشکر

با تشکر از مرکز تحقیقات بیماریهای پوستی و سالک اصفهان که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند.

منابع

۱ـ اورمزدی ه. انگل شناسی پزشکی، جلد اول تک یاخته شناسی. مؤسسه انتشارات جهاد دانشگاهی ماجد، ص ۲۰۱.

2. Lea Cysne F, Rosane MT, Fabioa A et al. Leishmania amazonensis long term cultivation of axenic amastigotes is associated metacyclogenesis of promastigotes. Experimental Parasitology. 1998; 89: 58-62.

3. Alexander J, Vickerman K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of leishmania mexicana- infected macrophages. Journal of Protozoology 1975: 22: 502-508.

4. Evans AT, Croft SL, Peters W, Neal RA. Antileishmanial effects of clofazimine and other antimycobacterial agents. Ann Trop Med Parasitol 1989; 83 (5): 447-54.

5. Chang KP, Dwyer DM. Leishmania donovani hamster macrophage interaction in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. Journal of Experimental Medicine 1978; 147, 515-530.

6. Chang KP. Human cutaneous leishmania in a mouse macrophage line : Propagation and isolation of intracellular parasite. Science 1980; 209, 1240-1242.

7. Giannini MSH, D'Alesandro PA & et al. Failure of hamster macrophages to discriminate between infective and noninfective promastigotes of leishmania donovani during attachment in vitro. Infection and Immunity 1981; 34, 629-632.

8. Nancy CA, Diggs CL. Intracellular replication of leishmania tropica in mouse peritoneal macrophages: comparison of amastigote replication in adherent and nonadherent macrophages. Infection and Immunity 1981; 34, 310-313.

9. Sacks DL, Barral A, Neva FA. Thermosensitivity patterns of old versus new world cutaneous strains of leishmania growing within mouse peritoneal macrophages in vitro. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1983; 32, 300-304.

۱۰ـ کاووسی، افسانه ـ بررسی اثر Brain heart infusion بر رشد انگل مکمل عصاره قلبی ـ مغزی پایان‌نامه جهت اخذ دکترای علوم آزمایشگاهی لیشمانیا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (۱۳۷۷).

11. Pinelli E, shapica M. Temperature induced expression of proteins in Leishmania Mexicana amazonensis. A 22-kDa protein is possibly localized in the mitochondrian. Eur-J Biochem 1990; 144(2): 685-691.

12. Pan AA. Leishmania mexicana: Serial cultivation of interacellular stages in cell-free medium. Experimental parasitology 1984; 58: 79-80.

13. Garlapati S, Daham E, Shapira M. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in Leishmania. Mol. Biochem. Parasitol 1991; (100)7: 95-101.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Bates PA, Robertson CD, Tetley L and Coombs GH. Axenic cultivation and characterization of Leishmania mexicana amastigote- like forms. parasitotogy 1992; 105: 193-202.

15. Hodgkinson VH, Soong L & et al. Leishmania amazonensis. Cultivation and characterization of axenic amastigote- like organisms. Experimental parasitology, 1996; 83: 44-105.

16. Patricia SD, Juanc E, Paulo FP, et al. Leishmania donovani: long- term culture of axenic amastigote at 37. Experimental parasitology 1991; 73: 320-334.

www.SID.ir