

## تأثیر محیط کشت بر فعالیت اسید فسفاتاز و خصوصیات این آنزیم در شکل عفونی پروماسیگوت‌های انگل لیشمانیا

امیر نوابی<sup>۱</sup>، دکتر سیمین دخت سلیمانی فرد<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** لیشمانیوز جلدی مرطوب ناشی از آلودگی با لیشمانیا ماژور، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی پوست در بسیاری از مناطق جهان می‌باشد. گزارش‌های موجود حاکی از آن است که بعضی از خصوصیات پروماستیگوت‌های لیشمانیا از جمله زمان عفونی شدن پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط کشت مصنوعی، تحت تأثیر نوع محیط کشت می‌باشد. با توجه به ضرورت استفاده از محیط کشت مصنوعی در اکثر مطالعاتی که روی لیشمانیا صورت می‌گیرد و همچنین نقش اسید فسفاتاز در عفونت‌زایی پروماستیگوت‌ها، در این مطالعه تأثیر محیط کشت بر زمان عفونی شدن و خصوصیات آنزیمی اسید فسفاتاز در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور بررسی گردید.

**روش‌ها:** این مطالعه یک مطالعه‌ی مقایسه‌ی بی‌درمانی بود. برای رسیدن به اهداف از پیش تعیین شده، انگل L.major (MRHO/IR/۷۵/ER) از موش‌های Balb/c از قبل آلوده شده به دو محیط کشت (Novy-MacNeal-Nicolle) NNN و RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute) منتقل و به شکل پروماستیگوت رشد داده شد. سپس با رسم مایع‌های رشد، پروماستیگوت‌های مرحله‌ی ایستا جدا گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر یک از محیط کشت‌ها پس از انجام، همراه با بافر سدیم استات Triton-X-۱۰۰ هموژنیزه شدند و پس از سانتریفیوژ، میزان فعالیت اسید فسفاتاز در مایع رویی به روش کالیمتری اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** پروماستیگوت‌های کشت داده شده در دو محیط NNN و RPMI۱۶۴۰ به ترتیب پس از گذشت ۷ و ۵ روز از شروع کشت، وارد مرحله‌ی ایستا شدند. میزان فعالیت اسید فسفاتاز در محیط NNN  $1/02 \pm 0/08$  و در محیط RPMI  $1/80 \pm 0/01$  به دست آمد. همچنین (Michaelis-Menten) Km و (Maximum velocity) Vmax اسید فسفاتاز در مرحله‌ی ایستا در پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط NNN به ترتیب  $1/11 \mu\text{M}$  و  $1/05/26 \pm 1/11$  و در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ به ترتیب  $1/14 \mu\text{M}$  و  $1/06/39 \pm 1/14$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$  و  $98/07 \pm 1/11$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$  بود.

**نتیجه‌گیری:** با وجود تفاوت در زمان عفونی شدن پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط‌های NNN و RPMI۱۶۴۰ و همچنین تفاوت‌های گزارش شده در میزان آگلوتینه شدن پروماستیگوت‌ها، میزان سنتز آنزیم کیناز و قدرت عفونت‌زایی پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط کشت‌های متفاوت، به نظر می‌رسد تفاوت قابل توجهی در خصوصیات آنزیمی اسید فسفاتاز پروماستیگوت‌های کشت داده شده در دو محیط کشت وجود ندارد.

**واژگان کلیدی:** لیشمانیا ماژور، محیط کشت، اسید فسفاتاز

**ارجاع:** نوابی امیر، سلیمانی فرد سیمین دخت. تأثیر محیط کشت بر فعالیت اسید فسفاتاز و خصوصیات این آنزیم در شکل عفونی

پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۵): ??

۱- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، بیمارستان الزهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- گروه فارغ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: s\_soleimanifard@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سیمین دخت سلیمانی فرد

## مقدمه

انگل لیشمانیا تک یاخته‌ای از خانواده‌ی تریپانوزماتیده می‌باشد که گروهی از بیماری‌ها تحت عنوان لیشمانیوز را ایجاد می‌کند. این بیماری یکی از بیماری‌های شایع عفونی پوست در بسیاری از مناطق جهان است. سالیانه بیش از ۱۲ میلیون نفر از مردم جهان به این انگل آلوده می‌شوند (۱).

این انگل توسط نیش پشه‌ی خاکی آلوده به میزبان مهره‌دار منتقل می‌شود و در داخل سلول‌های بیگانه‌خوار تک هسته‌ای به شکل بدون تاژک به نام اماستیگوت زندگی می‌کند و تکثیر می‌یابد (۲). فرمی از انگل که درون روده‌ی پشه‌ی خاکی رشد می‌یابد و تکثیر می‌شود، فرم پروماستیگوت نام دارد، بلاژل‌دار و متحرک است و به صورت اجسام دومی تاژک‌دار به طول  $15-25 \mu$  و عرض  $2-3 \mu$  می‌باشد. شکلی از پروماستیگوت‌ها که در مرحله‌ی رشد قرار دارند، شکل لگاریتمیک نامیده می‌شوند. این فرم از انگل پس از تکثیر در روده‌ی پشه‌ی خاکی، وارد مرحله‌ی ایستای رشد می‌شود و قدرت تکثیر خود را از دست می‌دهد و به صورت عفونت‌زا در می‌آید، سپس به حلق و حفره‌ی دهانی پشه مهاجرت می‌کند و آماده‌ی تلقیح به پوست میزبان مهره‌دار می‌شود که به آن فرم متاسیکلیک گفته می‌شود (۳).

در واقع، در طول مرحله‌ی رشد و تکثیر پروماستیگوت‌ها در دستگاه گوارش پشه‌ی خاکی، میزان عفونت‌زایی انگل تغییر می‌کند و از فرم غیر عفونی یا لگاریتمیک به فرم عفونت‌زا یا متاسیکلیک تبدیل می‌شود (۴).

فرم متاسیکلیک از نظر بسیاری از خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی با فرم لگاریتمیک غیر

عفونت‌زا متفاوت می‌باشد. از جمله در مرحله‌ی متاسیکلیک تغییراتی در حفره‌ی تاژکی انگل ایجاد می‌شود. حفره‌ی تاژکی همه‌ی تریپانوزماتیده‌ها، ناحیه‌ای تخصص یافته است که واسطه‌ی آندوسیتوز و ترشح اسید فسفاتاز است (۵). اسید فسفاتاز ترش‌حی، فراوان‌ترین پروتئین ترش‌حی لیشمانیا است (۶). همچنین در غشای سطحی لیشمانیا نیز وجود دارد (۷). این آنزیم با دفسفریله کردن غشا و ممانعت از تولید  $H_2O_2$  توسط ماکروفاژ، در زنده ماندن انگل درون ماکروفاژ بسیار حایز اهمیت است (۸).

اسید فسفاتاز باعث کاهش فعالیت ایمنی میزبان در ضایعات ناشی از لیشمانیوز جلدی می‌شود و به طور مستقیم در ویرولانسی انگل نقش دارد (۹). علاوه بر آن اسید فسفاتاز ترش‌حی در زنده ماندن انگل در بدن پشه‌ی خاکی، شکل‌گیری و تکامل واکوئل پارازیت‌پوروس و زنده ماندن اماستیگوت در آن نیز اثری بس می‌کند (۶). بنابراین چنین به نظر می‌رسد که اسید فسفاتاز یکی از ملکول‌های مؤثر در ایجاد قدرت بیماری‌زایی انگل می‌باشد.

انگل لیشمانیا در محیط کشت مصنوعی نیز به فرم پروماستیگوت رشد می‌کند. کشت انگل (In vitro culture) به معنای فراهم آوردن مجموعه‌ی شرایطی در محیط آزمایشگاه است که در آن شرایط، انگل تمام یا قسمتی از چرخه‌ی زندگی خود را خارج از بدن میزبان مناسب کامل کند. به طور معمول، این شرایط با استفاده از محیط‌های سنتتیک همراه با افزودنی‌های لازم در یک فلاسک کشت همراه می‌گردد. به این ترتیب، امکان دستیابی به تولید انبوه انگل فراهم می‌شود. دسترسی آسان به انگل

موجود باشد.

پس از گذشت ۳-۴ هفته در محل تلقیح، زخم ایجاد شد و انگل‌های به دست آمده از زخم و همچنین طحال موش به محیط کشت NNN اصلاح شده منتقل گردید (۱۲). این کار برای اجتناب از استفاده از انگل‌هایی که پاساژ زیاد داده شدند، انجام گرفت.

پس از گذشت ۳-۴ روز با ازدیاد تعداد انگل‌های کشت داده شده، بخشی از این ارگانیس‌ها به محیط کشت RPMI۱۶۴۰ غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FCS یا Fetal calf serum) انتقال داده شد و در دمای  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  اینکوبه گردید.

با شمارش روزانه‌ی انگل‌های کشت داده شده در هر دو محیط، منحنی رشد آن‌ها رسم شد و با توجه به منحنی رشد و همچنین مورفولوژی انگل‌ها، روز مناسب جهت جمع‌آوری پروماستیگوت‌های مرحله‌ی ایستا تعیین گردید.

#### تعیین غلظت

پروماستیگوت‌های مرحله‌ی ایستا در هر یک از دو محیط کشت، اینکوبه شدند. به این منظور تعداد  $10^6$   $5 \times$  پروماستیگوت در  $1\text{ ml}$  به روش گفته شده در قسمت قبل شمارش شد و به طور جداگانه در ویال‌های اپندورف جمع‌آوری گردید و پس از سه بار شستشو با  $1\text{ ml}$  PBS، بافر سدیم استات  $0.1\text{ M}$  ( $\text{pH} = 5.2$ ) و  $100 \times$  Triton - x -  $0.1$  درصد به پروماستیگوت‌های منجمد شده اضافه شد و به وسیله‌ی هموژنایزر تفلون، هموژنیزه و در  $18000$  به مدت ۲۰ دقیقه در  $4^\circ\text{C}$  سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برای اندازه‌گیری اسید فسفاتاز جمع‌آوری گردید (۱۳).

می‌تواند به انجام تحقیقات موفقیت‌آمیز در خصوص روش‌های درمانی قاطع، بررسی واکنش‌های متقابل میزبان و انگل، بررسی‌های بیوشیمیایی و ایمنولوژیکی و نیز تهیه‌ی واکسن کمک شایانی نماید (۱۰).

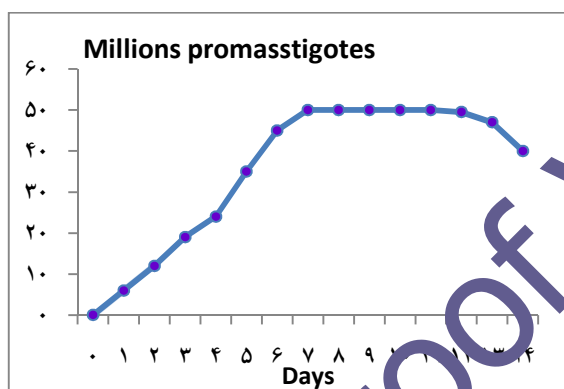
گزارش‌های موجود حاکی از آن است که بعضی از خصوصیات پروماستیگوت‌های لیشمانیا از جمله زمان عفونی شدن در محیط کشت، تحت تأثیر نوع محیط کشت می‌باشد (۱۱). از این رو، با توجه به ضرورت استفاده از محیط کشت جهت هر گونه مطالعه‌ی عامل بیماری از یک سو و از سوی دیگر، نقش اسید فسفاتاز در بروز اشکال عفونی، در بررسی حاضر تأثیر محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ (Novy-MacNeal-Nicolle) و RPMI-۱۶۴۰ (Poswell Park memorial institute) بر بیان عفونی شدن و خصوصیات آنزیمی اسید فسفاتاز پروماستیگوت‌های L.major مورد مطالعه قرار گرفت.

#### روش‌ها

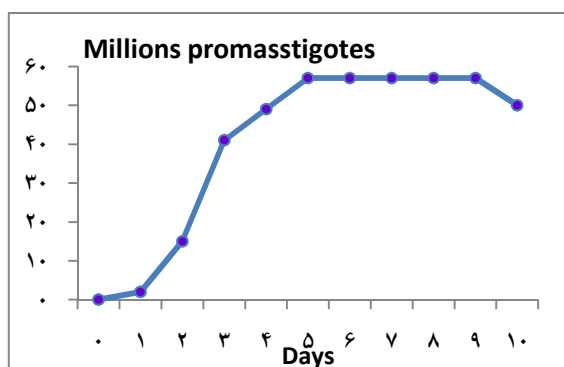
این مطالعه از نوع مقطعی بود و در ابتدا برای حصول اهداف پیش‌بینی شده،  $0.1\text{ ml}$  PBS (Phosphate buffered saline) حاوی  $10^6 \times 2$  انگل L.major (MRHO/IR/۷۵/ER) موجود در گروه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به قاعده‌ی دم موش‌های Balb/c به صورت زیر جلدی تلقیح شد. شمارش انگل‌ها با استفاده از لام نئوبار (Neobar) و در ناحیه‌ی شمارش گلبول‌های سفید انجام شد و تعداد انگل شمارش شده در  $10^4$  ضرب شد تا تعداد انگل در  $\text{ml}$  به دست آید. سپس غلظت آن به نحوی تنظیم شد که تعداد مورد نیاز ذکر شده در بالا در  $0.1\text{ ml}$  آن

## یافته‌ها

در این تحقیق نیاز به جداسازی مرحله‌ی ایستای انگل بود. این کار علاوه بر تکیه بر مشخصات مورفولوژی، بر پایه‌ی منحنی رشد انگل صورت گرفت. منحنی رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت NNN در شکل ۱ و در محیط RPMI۱۶۴۰ در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به منحنی رشد، پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط NNN پس از ۷ روز وارد مرحله‌ی ایستا شدند و سپس از روز ۷ تا روز ۱۱ به مدت ۵ روز با ثابت ماندن تعداد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت، مرحله‌ی ایستا ادامه داشت.



شکل ۱. منحنی رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت NNN (Novy-MacNeal-Nicolle)



شکل ۲. منحنی رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute ۱۶۴۰)

## اندازه‌گیری اسید فسفاتاز

جهت اندازه‌گیری اسید فسفاتاز از سوبسترای پارانیتروفنل فسفات استفاده شد (۱۲). طبق این روش، به ۲ ml محلول بافری استات ۱۰۰ mM با pH ۴/۵، مقدار ۱ ml از سوبسترای تهیه شده در قسمت قبل افزوده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۲۷ °C با افزودن ۳۰۰ μl پارانیتروفنل فسفات ۱۲۵ mM واکنش شروع و پس از مدت ۱۰ دقیقه میزان جذب پارانیتروفنل حاصل در ۴۰۵ nm اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم بر اساس μmol سوبسترای هیدرولیز شده در دقیقه در mg پروتئین (μM/min/mg protein) گزارش گردید. از سرم کنترل راندوکس به عنوان شاهد استفاده گردید. تمام مراحل آزمایش ۵ بار تکرار شد و نقطه‌ی میانگین به عنوان نتیجه‌ی نهایی در نظر گرفته شد.

## محاسبه‌ی ضریب ثابت Michaelis-Menten (Km)

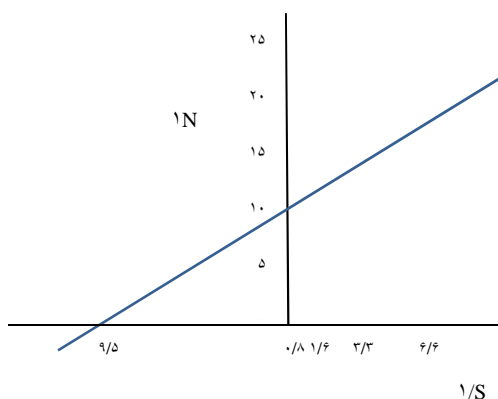
## و سرعت بیشینه‌ی (Vmax) آنزیم اسید فسفاتاز

به این منظور، با استفاده از کیت اسید فسفاتاز (زیست شیمی) و طبق پروتکل موجود در آن، غلظت‌های سریالی از سوبسترای هر مرحله تهیه شد. به این صورت که غلظت‌های ۱۲۰۰ تا ۶۰۰، ۳۰۰ و ۱۵۰ به دست آمد. سپس فعالیت آنزیم در غلظت‌های متفاوت محاسبه و با رسم منحنی Michaelis-Menten مقدار Km و با رسم منحنی Lineweaver burk سرعت بیشینه یا Vmax (Maximum velocity) محاسبه گردید. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آماری Wilcoxon و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل شد.

جدول ۱. میزان فعالیت، Km و Vmax آنزیم اسید فسفاتاز در دو محیط کشت

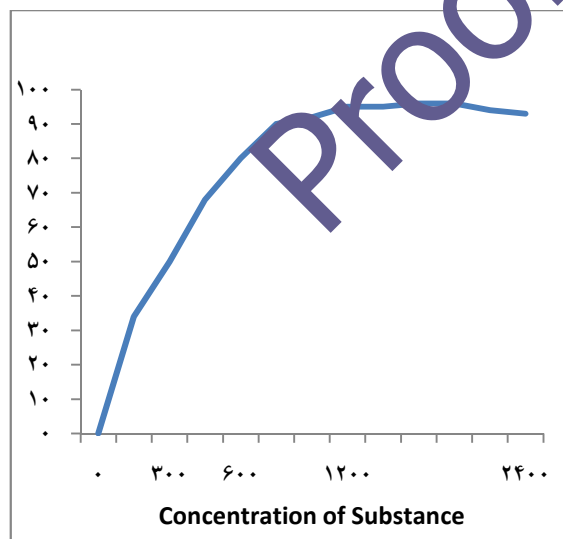
محیط کشت	NNN	RPMI ۱۶۴۰
فعالیت اسید فسفاتاز (IU)	۱/۲۰ ± ۰/۰۸	۱/۸۰ ± ۰/۱۰
Km (μM)	۱۰۵/۲۶ ± ۱/۱۱	۱۰۶/۳۹ ± ۱/۱۴
Vmax (Mmol/min/mg protein)	۹۸/۳۷ ± ۱/۴۸	۹۸/۰۴ ± ۰/۹۶

NNN: Novy-MacNeal-Nicolle; RPMI ۱۶۴۰: Roswell Park memorial institute



شکل ۴. منحنی لینووربرگ اسید فسفاتاز در مرحله ایستا در محیط NNN (Novy-MacNeal-Nicolle)

میزان Km آنزیم با توجه به شکل‌های ۵ و ۶ به دست آمد که در جدول ۱ آمده است.

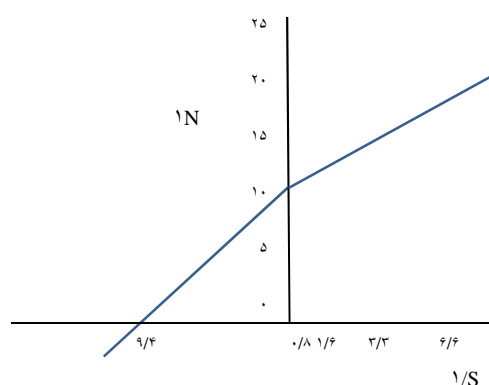


شکل ۵. منحنی Michaelis-Menten آنزیم اسید فسفاتاز در مرحله ایستا در محیط RPMI ۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute)

منحنی رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ نشان می‌دهد که پروماستیگوت‌ها از روز ۵ پس از شروع کشت وارد مرحله ایستا شدند و تا روز ۹ با ثابت بودن تعداد، در این مرحله باقی ماندند. سپس از روز ۹ شاهد تدریجی در تعداد پروماستیگوت‌ها مشاهده شد. با توجه به منحنی‌های رشد، پروماستیگوت‌های مرحله ایستا محیط NNN در روز ۸ و در محیط RPMI ۱۶۴۰ در روز ۶ پس از کشت، جمع‌آوری شدند.

میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در پروماستیگوت‌های مرحله ایستا حاصل از دو محیط کشت، در جدول ۱ نشان داده شده است.

سرعت بیشینه (Vmax) آنزیم در دو محیط کشت با توجه به شکل‌های ۳ و ۴ به دست آمد که نتایج در جدول ۱ آمده است.



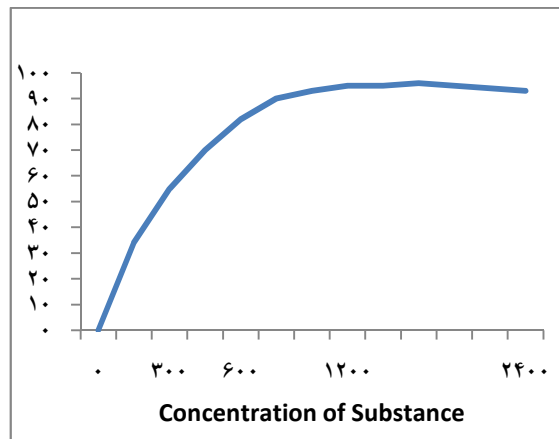
شکل ۳. منحنی لینووربرگ اسید فسفاتاز در مرحله ایستا در محیط RPMI ۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute)

ترتیب روز ۵ و ۷ پس از شروع کشت آغاز می‌شود و طول مرحله‌ی ایستا در پروماستیگوت‌های کشت داده در محیط RPMI ۱۶۴۰، ۴ روز و در محیط NNN، ۵ روز می‌باشد، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین خصوصیات آن‌ها وجود ندارد.

محیط کشت دو مرحله‌ای NNN حاوی خون دفیبرینه‌ی خرگوش می‌باشد. طبق گزارش‌های موجود، هموگلوبین موجود در خون موجب کاهش فعالیت آنزیم کیتیناز و کاهش رشد در بعضی سوش‌های L.major می‌شود (۱۴). همچنین وجود هموگلوبین در محیط کشت، موجب به تأخیر افتادن روند عفونی شدن پروماستیگوت‌ها می‌گردد (۱۵).

Schlein و Jacobson گزارش نموده‌اند که عفونی شدن پروماستیگوت‌ها در دستگاه گوارش پشه‌ی خاکی، همزمان با فعال شدن آنزیم کیتیناز انگل می‌باشد و این زمانی است که خون خورده شده به وسیله‌ی پشه‌ی خاکی به طور کامل هضم شده باشد (۱۵).

در روند مرحله‌ی ایستا که حاصل آن پروماستیگوت‌های متاسیکلیک می‌باشد، در پروماستیگوت‌های ساکن دستگاه گوارش پشه‌ی خاکی به اثبات رسیده است. اما پایان مشخصی برای این مرحله به طور طبیعی در دستگاه گوارش پشه‌ی خاکی نشان داده نشده است. احتمال می‌رود وجود پایان مشخص برای این مرحله در محیط کشت مصنوعی، از کاهش تقسیم سلولی پروماستیگوت‌ها به طور طبیعی و همچنین لیز شدن تعدادی از آن‌ها به دلیل نامناسب بودن شرایط محیط کشت در اثر گذشت زمان باشد. به علاوه ورود مواد حاصل از متابولیسم انگل به داخل محیط کشت، می‌تواند اثر کشنده بر روی پروماستیگوت‌ها داشته باشد و ترشح



شکل ۶. منحنی Michaelis-Menten آنزیم اسید فسفاتاز در مرحله‌ی ایستا در محیط NNN (Novy-MacNeal-Nicolle)

### بحث

در سال‌های اخیر با توجه به شروع بیماری لیشمانیوز در بسیاری از مناطق و از سوی دیگر افزایش تعداد بیماران مبتلا به سندرم‌های نقص ایمنی، نیاز به تحقیقات و مطالعات در خصوص لیشمانیوز افزایش یافته و حجم زیادی از مطالعات، به جنبه‌های گوناگون لیشمانیوز اختصاص یافته است.

بخشی از مطالعات، شناسایی ارگانیسم عامل بیماری از زوایای گوناگون می‌باشد. با توجه به این که انگل لیشمانیا در بدن میزبان بی‌مهره و همچنین محیط کشت به فرم پروماستیگوت رشد می‌کند، استفاده از محیط کشت‌های مختلف در مورد این انگل نقش بزرگی در انجام تحقیقات گوناگون دارد؛ چرا که با استفاده از محیط کشت می‌توان به حجم انبوهی از انگل دست یافت.

در بررسی حاضر، تأثیر احتمالی محیط بر مراحل رشد انگل و خصوصیات اسید فسفاتاز انگل L.major مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اگر چه مرحله‌ی ایستا در پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط‌های RPMI ۱۶۴۰ و NNN به

می‌باشد؛ اما تفاوت قابل توجهی در میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و نیز  $K_m$  و  $V_{max}$  این آنزیم در پروماستیگوت‌های رشد یافته در دو محیط کشت وجود ندارد ( $P < 0/050$ ) و به نظر می‌رسد محیط کشت تأثیری بر فعالیت اسید فسفاتاز نداشته باشد.

نتیجه‌ی نهایی این که طول مرحله‌ی ایستا و همچنین زمان شروع این مرحله در پروماستیگوت‌های رشد یافته در دو محیط کشت با یکدیگر تفاوت اندکی دارد که از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین بین میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و نیز  $K_m$  و  $V_{max}$  آن نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین از آن جا که لیشمانیا یک انگل پیچیده و ناشناخته می‌باشد و تحقیقات در زمینه‌های مختلف روی آن الزامی به نظر می‌رسد، با توجه به نتایج این تحقیق، استفاده از هر یک از دو محیط کشت NNN و RPMI۱۶۴۰ که محیط کشت‌های در دسترس می‌باشند، در خصوص تعیین‌کنندگی خصوصیت اسید فسفاتاز و نقش آن در فیرسازگی انگل میسر می‌باشد.

### شکره‌ قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۸۱۱۰۶ مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است و هزینه‌ی اجرای آن، توسط این معاونت تأمین شده است. بدین وسیله از حمایت‌های مالی این دانشگاه طی انجام این تحقیق قدردانی می‌شود. همچنین لازم است از پیشنهادها و راهنمایی‌های آقایان دکتر مهدی بقایی و دکتر منوچهر مصری‌پور در طول اجرای مطالعه و نیز تهیه و تنظیم این مقاله صمیمانه تشکر و قدردانی شود.

بعضی از مواد موجب تغییر pH محیط شود و ادامه‌ی حیات پروماستیگوت‌ها را غیر ممکن سازد.

بنابراین همان‌گونه که در نتایج حاصل از این تحقیق مشاهده شد، به نظر می‌رسد که چون به پایان رسیدن مرحله‌ی ایستا در محیط کشت مصنوعی، ناشی از فعالیت خود انگل می‌باشد، نوع محیط کشت تأثیر چشمگیری بر طول دوره‌ی ایستا در منحنی رشد پروماستیگوت‌ها ندارد. البته خون موجود در NNN تفاوت اندکی را بین این دو محیط کشت از نظر زمان شروع و طول مرحله‌ی ایستا ایجاد کرده است.

Sacks و همکاران گزارش نمودند که ساختمان لیپو فسفو گلیکان (LPG یا Lipo phospho glycan) در پروماستیگوت‌ها تا حدودی تحت تأثیر محیط کشت مصنوعی و شرایط حاکم بر آن می‌باشد (۱۶). شرایط محیط کشت می‌تواند توانایی پروماستیگوت‌های متاسیکلیک را برای عدم آگلوتینه شدن به وسیله‌ی لکتین بادام کوهی - که از ویژگی‌های پروماستیگوت‌های مرحله‌ی ایستا می‌باشد- تحت تأثیر قرار دهد (۱۷).

همچنین بعضی از گزارش‌ها حاکی از آن است که محیط کشت می‌تواند بر میزان قدرت عفونت‌زایی پروماستیگوت‌ها تأثیر بگذارد؛ به طوری که پروماستیگوت‌های رشد یافته در بعضی از محیط کشت‌ها از جمله NNN دارای قدرت آلوده‌کنندگی کمتری در مقایسه با محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) می‌باشد (۱۸).

با وجود گزارش‌های پیش‌گفته، نتایج به دست آمده در این بررسی نمایانگر آن است که اگر چه زمان عفونی شدن پروماستیگوت‌ها در دو محیط کشت متفاوت

## References

1. do Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Legare D, Corbeil J, Melo MN, et al. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(5): e1167.
2. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(10): e313.
3. Wilson R, Bates MD, Dostalova A, Jecna L, Dillon RJ, Volf P, et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(9).
4. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 2002; 124(Pt 5): 495-507.
5. Bates PA, Hermes I, Dwyer DM. *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Exp Parasitol* 1989; 68(3): 335-46.
6. Fernandes AC, Soares DC, Saraiva EM, Meyer-Fernandes JR, Souto-Padron T. Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2013; 340(2): 117-28.
7. Dutra PM, Dias FA, Rodrigues CO, Comerio A, Attias M, De SW, et al. Platelet activating factor modulates a secreted phosphatase activity of the trypanosomatid parasite *Herpetomonas muscarum muscarum*. *Fun Microbiol* 2001; 43(4): 288-92.
8. Baghaei M, Mesripour M. Characterization of acid phosphatase in the promastigotes of three isolates of *leishmania major*. *Iran J Med Sci* 2003; 28(1): 1-8.
9. el-On J, Sneier R, Elias E. *Leishmania major*: bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. *Isr J Med Sci* 1992; 28(12): 847-51.
10. Soleimanifard S, Arjmand R, Hejazi SH. Investigation and comparison of *Leishmania major* promastigote and amastigote protein content by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2013; 20 (1): 1-8. [Persian].
11. Dey T, Afrin F, Anam K, Ali N. Infectivity and virulence of *Leishmania donovani* promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *J Eukaryot Microbiol* 2002; 49(4): 270-4.
12. Sarkari B, Chance M, Hommel M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Trop* 2002; 82(3): 339-48.
13. Rezazadeh MF, Shakeri R, Kaboudanian AS, Tahghighi A, Roumadi A. In vitro immunobiological studies of novel 5-(5-nitrofuranyl)-1,3,4-thiadiazoles with piperazinyl linked benzamidine substituents against *Leishmania major*. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2013; 12(4): 368-76.
14. Sant'anna MR, Nascimento A, Alexander B, Balger L, Cavalcante RR, Diaz-Albiter HM, et al. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasit Vectors* 2010; 3(1): 3.
15. Schlein Y, Jacobson RL. Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. *Parasitology* 1994; 109 (Pt 1): 23-8.
16. Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(1): 406-11.
17. Kbaier-Hachemi H, Guerbouj S, Turki-Mannoubi L, Kaabi B, Guizani I. In vitro growth kinetics, differentiation and morphological characterisation of Tunisian *Leishmania infantum* parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106(1): 20-5.
18. Sysoev VV. A comparison of the growth of *Leishmania major*, *L. turanica* and *L. gerbilli* on NNN medium. *Med Parazitol (Mosk)* 1995; (1): 13-7. [In Russian].



## Effect of Medium in Properties and Activity of ACP in the Infective Form of Leishmania Major Promastigotes

Amir Navabi MSc<sup>1</sup>, Simindokht Soleimanifard PhD<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** The wet cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* infection is one of the common skin disease in many parts of the world. Reports indicate that some properties of *Leishmania* such as time of infection is affected of medium. With respect to use to artificial medium in the majority of the studies on *Leishmania* and the role of acid phosphatase in the pathogenesis of promastigotes, in this research, were studied effects of medium in properties of ACP and time of infecting in *L. major* promastigotes.

**Methods:** The present study is a cross sectional study. To culture promastigotes, *L. major* (MRHO/IR/75/ER) from previously infected Balb/c mice was transferred to NNN and RPMI1640 medium. Growth curve was generated and stationary stages were divided. Frozen promastigotes of each medium with sodium acetate and Triton-X-100 were homogenized and ACP was measured by calorimetric assay.

**Findings:** Stationary parasites were collected in NNN and RPMI 1640 medium in seventh and fifth day respectively. The rate of ACP activity was determined  $1.02 \pm 0.08$  in NNN and  $1.8 \pm 0.01$  in RPMI-1640. Also Km and Vmax of this enzyme was  $105.26 \pm 1.11 \mu\text{M}$  and  $98.37 \pm 1.48 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein in NNN and  $106.39 \pm 1.14 \mu\text{M}$  and  $98.04 \pm 0.96 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein in RPMI1640.

**Conclusion:** Despite the infecting time in promastigotes, rate of agglutination, rate of kinase synthesis and virulent are different in two medium, it seems there are no significant differences in properties of acid phosphatase in stationary promastigotes in two medium.

**Keywords:** *Leishmania major*, Media culture, Acid phosphatase, Virulence

**Citation:** Navabi A, Soleimanifard S. Effect of Medium in Properties and Activity of ACP in the Infective Form of *Leishmania Major* Promastigotes. J Isfahan Med Sch 2014; 32(295): ??.

1- Department of Parasitology and Mycology, Alzahra Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Simindokht Soleimanifard PhD, Email: s\_soleimanifard@yahoo.com