مقایسه سه نوع کشت سلولی برای تکثیر و نگهداری توکسوپلاسما گوندی در آزمایشگاه و تولید *DNA*

دکتر اصغر فضائلی*

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی

چکیده

زمینه و هدف: توکسوپلاسما گوندی یکی از شایعترین تک یاخته های انگلی انسان و حیوان در تمام کشورهای دنیا است که به موازات اشاعه بیماری ایدز در دو دهه اخیر مورد توجه بیشتری قرار گرفته و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. برای مطالعات سلولی مولکولی این تک یاخته کشت سلولی مناسب مورد نیاز ضروری است و این مطالعه به منظور انتخاب کشت سلولی مناسب انجام شد.

مواد و روش کار: تعداد ۳ رده سلولی مختلف *HEL*، *MRC5* و *HFF* به طور مقایسه ای با کشت ۲ استرین از فنوتیپهای مختلف یعنی *RH* و *Beverley* در شرایط یکسان مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته ها: بر اساس نتایج، میزان زنده بودن تاکی زوئیت های استرین *RH* حاصل از کشت *HFF* بیشتر از محصول کشتهای دو نوع کشت سلولی دیگر بود. *pH* محیط در فلاسکهای کشت *HFF* در مورد هر دو استرین انگل پایدار تر از کشتهای آنها در محیطهای کشت سلولی *HEL* و *MRC5* بود و کمتر تمایل به اسیدی شدن داشت. تعداد انگل بدست آمده از کشت استرین *RH* نسبت به استرین *Beverley* در هر سه نوع کشت سلولی بیشتر بود. تکثیر استرین *Beverley* در کشت سلولی *HFF* تعداد انگل بیشتری را در مقایسه با دو نوع کشت دیگر حاصل نمود. مقدار کل *DNA* بدست آمده از انگل های حاصل از فلاسکهای کشت *RH* ۳۱ تا ۳۳ میکروگرم به ازای هر فلاسک کشت سلولی و در مورد استرین *Beverley*، ۲۰ تا ۲۵ میکروگرم بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که در مجموع کشت سلولی *HFF* برای استفاده در آزمایشگاههای تشخیصی و تحقیقاتی و برای مطالعات سلولی مولکولی فنوتیپهای مختلف توکسوپلاسما گوندی مناسبتر از دو نوع کشت دیگر است. **(مجله طبیب شرق، سال ششم، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۸۳، ص ۱۰۵ تا ۱۱۳)**

گل‌واژه ها: توکسوپلاسما گوندی، کشت سلولی، تولید DNA، بیولوژی سلولی مولکولی، HFF، HEL، MRC5.

مقدمه

در سال ۱۹۷۳، *Kean* تخمین زد که حدود یک سوم مردم جهان در سرم خون خود دارای آنتی بادی ضد توکسوپلاسما گوندی هستند، بدین معنی که با انگل توکسوپلاسما آلوده شده‌اند.[۱] به نظر می رسد که این نسبت بالای آلودگی کم و بیش همچنان باقی است. اگرچه میزان آلودگی به این انگل در بعضی مناطق بسیار پائین می باشد، اما در مناطقی دیگر حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد مردم آلودگی را تجربه کرده اند. در ایران در یک مطالعه سرواپیدمیولوژی در ۱۲ استان کشور با استفاده از روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (*IFA*)، مشخص گردید که به طور متوسط ۵۱/۸ درصد افراد دارای سرم مثبت در مقابل آنتی ژن توکسوپلاسما بودند.[۲] عفونت توکسوپلاسموز به موازات اشاعه گسترده بیماری ایدز در دنیا در طول دو دهه اخیر مورد توجه مجدد و ویژه ای قرار گرفته و این بدلیل ایجاد بیماری حاد و کشنده‌ای است که در افراد مبتلا به نقص ایمنی در اثر باز فعال شدن *(reactivation)* انگل ایجاد می نماید. این شرایط جدید سبب جلب محققین و انجام تحقیقات زیاد و در نتیجه

www.SID.ir

دستاوردهای جالب و با ارزشی به خصوص در زمینه بیولوژی مولکولی این انگل گردیده است.

در افراد دارای سیستم ایمنی کارآمد بیشتر آلودگی های توکسوپلاسما به صورت مزمن و بدون علامت اتفاق می افتد، در این افراد انگل از فرم فعال (تاکی زوئیت) به فرم غیر مهاجم به نام برادی زوئیت و سپس به کیست نسجی تبدیل می شود و به مدت طولانی و شاید تا پایان عمر در نسوج میزبان از جمله نسج مغز باقی می ماند.[۳] این منبع مخفی عفونت همواره به عنوان خطری محسوب می گردد که قادر است به یک عفونت فعال و بیماری از جمله آنسفالیت توکسوپلاسمیک در اثر پاره شدن کیست نسجی و تبدیل برادی زوئیت به تاکی زوئیت گردد. *Luft* و *Remington* دریافتند که حدود ۹۵ درصد از آنسفالیتهای توکسوپلاسمیک به علت بازفعال شدن انگل اتفاق می افتد. [۴] تمام این پدیده های بیولوژیک که به عوامل متعددی بستگی دارند، نیاز به بررسی دارند و این بررسی در اغلب موارد نیاز به استفاده از شرایط آزمایشگاهی و کشت سلولی دارد که بتوان به راحتی رفتار انگل را در آن مورد مطالعه و کنکاش قرار داد، البته این تنها یک جنبه استفاده از کشت سلولی است.

یکی از مراحل دشوار و مهم در مطالعات بیولوژی مولکولی تک یاخته ها از جمله توکسوپلاسما گوندی بدست آوردن انگل به میزان کافی و عاری از آلودگی به سلولهای میزبان می باشد. کشت *in vivo* نیاز به نگهداری حیوان آزمایشگاهی و امکانات مخصوص دارد که همیشه و همه جا در دسترس نیست. به علاوه، کشت استرینهای آویرولانت (*avirulent*) و کند رشد در حیوان منجر به تولید کیست نسجی گردیده و خالص سازی آن از بافتهای میزبان آسان نیست، اگر چه روشهایی برای خالص سازی کیستهای نسجی و برادی زوئیتها معرفی گردیده است.[۵و۶] کشت سلولی توکسوپلاسما از سالها پیش مورد استفاده قرار گرفته است[۷-۱۱] و به نظر می رسد روش آسان و مفیدی برای تولید انگل به منظور تهیه *DNA* برای مطالعات مولکولی است. همینطور برای بررسی حساسیت دارویی[۱۲]، تولید موتانهای انگل[۱۳و۱۴] و تولید تاکی زوئیت برای کاربرد در دای تست (*Dye test*).[۱۵] ثابت گردیده که انگل توکسوپلاسما در کشتهای سلولی یک لایه *(monolayer)* بهتر از کشتهای سلولی معلق رشد می کند که احتمالاً به علت تماس آسانتر انگل به سلول و نفوذ راحت تر آن بداخل سلول می باشد.[۱۶] کشت سلولی استرینهای آویرولانت توکسوپلاسما به سادگی استرینهای ویرولانت (*virulent*) که بیشتر به فرم تاکی زوئیت است و به خوبی رشد و تکثیر می نماید، نیست. مقایسه کمی رشد و تکثیر استرینهای مختلف توکسوپلاسما در بین رده های مختلف سلولی انجام گردیده است [۱۷-۲۲]، با این وجود کارآیی رده های سلولی مختلف برای تولید زویتهای استرینهای آویرولانت مورد مقایسه قرار نگرفته است. به منظور انتخاب کشت سلولی مناسب برای کشت مداوم توکسوپلاسما و تولید *DNA*، سه نوع مختلف سلول فیبروبلاست مورد مقایسه قرار گرفت که عبارتند از: *HHF (human foreskin fibroblast)* ، *HEL (human embryonic lung fibroblast)* و *MRC5*.

روش کار

رده های سلولی و سویه های انگل: رده سلولی *MRC5* از شرکت *GIBCO BRL* (لایف تکنولوژی انگلستان) و رده سلولی *HEL* از بخش ویروس شناسی دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه ابردین انگلستان تهیه گردید. رده سلولی *HFF* توسط نویسنده از بافت فورسکین (*Foreskin*) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. سویه *RH* از ژنوتایپ *I* و سویه *Beverley* از ژنوتایپ *II* از آزمایشگاه رفرانس توکسوپلاسما در اسکاتلند (شهر اینورنس) تهیه گردیدند.

آماده سازی کشتهای سلولی: سلولهای *HEL* ، *MRC5* و *HFF* با شماره پاساژهای نزدیک به هم (به ترتیب ۱۳، ۱۴ و ۱۲)

Archive of SID
www.SID.ir

در فلاسکهای متوسط با سطح cm^2 ۷۵ با استفاده از محیط کشت *MEM* و مکمل های گلوتامین، اسید آمینه های غیر ضروری، پنی سیلین- استرپتومایسین، بی کربنات سدیم و سرم غیر فعال گوساله (*FBS*) در 37^oC کشت داده شدند. پس از رشد سلولها و پوشش کامل سطح کشت فلاسکها از سلولهای فیبروبلاست، هر فلاسک cm^2 ۷۵ به ۱۰ فلاسک کوچک cm^2 ۲۵ پاساژ داده شده (در هر فلاسک کوچک 1×10^6 سلول کاشته شد) و فلاسکها مجددا در 37^oC نگهداری شده تا لایه سلولی کامل گردید.

کشت انگل در فلاسکهای کشت سلولی: هنگام کشت انگل محیط کشت مایع فلاسکها با محیط تازه و غلظت کمتر *FBS* تعویض گردید و تعداد ۱۰ فلاسک از هر یک از رده های سلولی برای کشت انگل مورد استفاده قرار گرفت. ۵ فلاسک برای سویه *RH* و ۵ فلاسک برای سویه *Beverley* و جمعا به تعداد ۳۰ فلاسک که به هر فلاسک 1×10^5 انگل تلقیح گردید. در مورد سویه دوم، قبل از شروع مطالعه کیستهای نسجی این سویه در یک فلاسک اولیه کشت سلولی تلقیح و پس از رشد و تکثیر، تاکی زوئیتهای آزاد شده در محیط مایع در زمان شروع مطالعه برداشت و به فلاسکهای مورد نظر تلقیح گردید. ۲۴ ساعت بعد از تلقیح انگل و نگهداری در دمای 37^oC محیط *MEM* مجدداً با محیط تازه تعویض گردید. فلاسکهای آلوده روزانه مستقیما در زیر میکروسکوپ مخصوص (*inverted*) و همچنین با تهیه لام از محیط مایع فلاسکها از نظر روند رشد و تکثیر انگل و لیز سلولی مورد بررسی قرار می گرفتند. زمان لیز سلولی، تعداد انگلهای تولید شده، درصد زنده بودن انگل، *pH* محیط و آلودگی سلولی اندازه گیری شد.

برداشت و خالص سازی انگل: پس از تکثیر انگل و لیز سلولی به میزان ۸۰ درصد، تمامی محتوای فلاسکها جداگانه تخلیه گردید و ضمن اندازه گیری *pH* آنها با *pH* متر (میکروپروسسور *N*/۸۵۲، سنگاپور) توسط سرنگ از سر سوزنهای نازک (۲۷*g*) عبور داده شدند تا سلولهای لیز نشده حاوی انگل نیز پاره شده و زویتهای آنها آزاد گردند. در این مرحله با استفاده از لامهای نئوبار دانسیته انگل (تعداد تاکی زوئیتها در هر ۲۰ میکرولیتر) و تعداد اشکال شبیه کیست نسجی اندازه گیری شد و همزمان میزان زنده بودن زوآیتها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (*phase contrast*) محاسبه گردید. برای خالص سازی زویتها محتوای هر فلاسک از یک فیلتر پلی کربنات (*Watmann*) با روزنه های ۳ میکرومتر عبور داده شد و میزان خالص بودن انگلها با شمارش تعداد سلولها نسبت به هر ۱۰۰ انگل اندازه گیری شد. محلول صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب حاصل ۳ بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و آخرین رسوب برای تهیه *DNA* مورد استفاده قرار گرفت.

جدا سازی و تخلیص *DNA*: جهت جدا سازی و تخلیص *DNA* با استفاده از فنل- کلروفرم از روشهای *Sambrook* [۲۳] و *Cristina* و همکاران [۲۴] استفاده شد. به طور خلاصه رسوب حاصل از هر فلاسک در *ml* ۱ ماده لیز کننده حاوی ۷/۵ میلی مولار *Tris-HCl*، ۷/۵ میلی مولار *EDTA* ، *SDS* ۱ درصد، ۱ میلی گرم *Proteinase K* در دمای ۵۰ درجه به مدت ۳ ساعت نگهداری شد. در این مرحله سدیم پرکلرات با غلظت نهایی ۱ مولار به لوله ها افزوده شد. جدا سازی *DNA* یک بار با حجم مساوی فنل- کلروفرم و بار دوم با کلروفرم تنها انجام گردید و پس از جدا نمودن قسمت حاوی *DNA* با حجم مساوی از الکل اتیلیک مطلق سرد مخلوط و پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار در ۲۰- درجه به مدت ۱ ساعت نگهداری و سپس برای رسوب دادن *DNA*، لوله های اپندرف به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و محتوای الکل تخلیه گردید. جهت شستشوی رسوب *DNA*، ۱ میلی لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد به رسوب اضافه و پس از سانتریفیوژ مجدد محتوای الکل تخلیه و رسوب در ۲۰۰ میکرو لیتر بافر *TE* (۸ *pH*) حل

Archive of SID
www.SID.ir

گردید. غلظت *DNA* پس از ۲ روز با اندازه گیری *O.D* در دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه گردید. داده های بدست آمده در این مطالعه با استفاده از مقایسه میانگین ها و آنالیز واریانس و آزمون کروسکال والیس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها

حداکثر لیز سلولی در فلاسکهای آلوده به استرین *RH* در کشتهای سلولی *HEL* و*MRC5* بعد از ۴ روز و در کشت سلولی *HFF* بعد از ۵ روز اتفاق افتاد (جدول ۱). این دوره در فلاسکهای آلوده به استرین *Beverley* طولانی تر بود، ۹ روز در کشتهای *HEL* و *MRC5* و ۱۳ روز در کشت *HFF* (جدول ۲). درصد زنده بودن تاکی زوئیتهای استرین *RH* حاصل از کشت *HFF* نسبت به حاصل کشت *HEL* و*MRC5* بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). این نسبت در مورد استرین *Beverley* اختلاف معنی داری را بین کشتهای سلولی مختلف نشان نداد. پس از کشت انگل رنگ محیط در فلاسکهای *HEL* و *MRC5* به تدریج از صورتی به زرد تغییر یافت که دال بر کاهش *pH* محیط و رو به اسیدی رفتن آن بود. با وجود اینکه محیط مایع این دو کشت نسبت به کشت *HFF* در طول ۴ تا ۵ روز کشت، یک یا دو بار بیشتر تعویض گردید، *pH* محیط در پایان دوره کشت در *HFF* به طور معنی داری بیش از *pH* محیطهای دو نوع سلول دیگر بود (جداول ۱ و ۲). آلودگی سلولی یعنی حضور سلولهای کنده شده و شناور در محیط مایع فلاسکها (قبل از برداشت) در فلاسکهای *HFF* نسبت به دو نوع سلول دیگر در کشتهای هر دو استرین *RH* و *Beverley* کمتر بود ($P<۰/۰۵$). پس از برداشت کامل و فیلتر کردن محتوای فلاسکها آلودگی سلولی در هر سه نوع کشت سلولی کمتر از ۱ درصد بود. تعداد کل انگل بدست آمده در سه نوع کشت سلولی در مورد *RH* اختلاف معنی داری نداشت در حالیکه در کشتهای *Beverley*، سلول *HFF* محصول بیشتری نسبت به دو نوع سلول دیگر تولید نمود ($P<۰/۰۵$). در مجموع استرین *Beverley* نسبت به استرین *RH* تعداد انگل کمتری تولید نمود ($P < ۰/۰۵$). البته در بخشی از این مطالعه، تعداد ۴ فلاسک اضافی *HFF* که با استرین *Beverley* کشت داده شده بود برای دو بار برداشت *(Double harvest)* نتایج نشان داد که در مجموع تعداد انگل حاصل از *Beverley* در مقایسه با یک بار برداشت، به میزان قابل توجهی افزایش یافت (جدول ۳) که این قابلیت در مورد استرین *RH* به خصوص در کشتهای *HEL* و *MRC5* معمولا کمتر وجود دارد و این به دلایل مختلف از جمله سرعت بالای لیز سلولی می باشد. مقدار کل *DNA* بدست آمده از انگلهای حاصل از فلاسکهای کشت سلولی *RH*، ۳۱ تا ۳۳ میکروگرم به ازای هر فلاسک کشت سلولی و در مورد استرین *Beverley* ۲۰ تا ۲۵ میکروگرم بدست آمد.

جدول ۱: مقایسه کشت سلولی سویه *RH* توکسوپلاسما گوندی در سه نوع کشت سلولی مختلف

نوع سلول (فلاسک ۵ = *n*)	*HEL*	*MRC5*	*HFF*	*P value*
میانگین زمان حداکثر لیز سلولی در فلاسک‌ها (روز)	۴	۴	۵	$P=۰/۰۰۱$
متوسط تعداد تاکی زوئیت حاصل از فلاسکها	$۲/۴۷ \times ۱۰^{۷}$	$۲/۴۵ \times ۱۰^{۷}$	$۲/۴۵ \times ۱۰^{۷}$	$P=۰/۹۶$
متوسط میزان زنده بودن تاکی زوئیتهای بدست آمده	٪۹۰	٪۹۲/۲۶	٪۹۶/۰۰	$P=۰/۰۰۱$
متوسط *pH* محیط کشت فلاسک‌ها	۶/۴۰	۶/۴۹	۷/۰۵	$P=۰/۰۰۱$
میزان ناخالصی تاکی زوئیتها (متوسط تعداد سلولهای میزبان)	٪۳/۰	٪۲/۷	٪۱/۴	$P=۰/۰۳۶$

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲: مقایسه کشت سلولی سویه *Beverley* توکسوپلاسما گوندی در سه نوع کشت سلولی مختلف

نوع سلول (فلاسک ۵ = *n*)	*HEL*	*MRC5*	*HFF*	*P value*
میانگین زمان حداکثر لیز سلولی در فلاسک‌ها (روز)	۹	۹	۱۳	P =۰/۰۰۰۱
متوسط تعداد تاکی زوئیت حاصل از فلاسکها	۱/۲۰ × ۱۰^{۷}	۱/۲۶ × ۱۰^{۷}	۱/۵۴ × ۱۰^{۷}	P =۰/۰۰۳
متوسط میزان زنده بودن تاکی زوئیتهای بدست آمده	٪۸۲/۲۰	٪۸۵/۲۰	٪۸۸/۰۰	P =۰/۷۹
متوسط *pH* محیط کشت فلاسک‌ها	۶/۶۵	۶/۷۰	۷/۱۸	P =۰/۰۰۰۱
میزان ناخالصی تاکی زوئیتها (متوسط تعداد سلولهای میزبان)	٪۳/۶	٪۳/۴	٪۱/۶	P =۰/۰۰۰۱

جدول ۳: حاصل ۲ بار برداشت از کشت سلولی سویه *Beverley* توکسوپلاسما گوندی در کشت *HFF*

شماره فلاسک	تعداد تاکی زوئیتها		
	اولین برداشت (روز دهم)	دومین برداشت (روز سیزدهم)	جمع
۱	۰/۷۵ × ۱۰^{۷}	۱/۳۰ × ۱۰^{۷}	۲/۰۵ × ۱۰^{۷}
۲	۰/۹۵ × ۱۰^{۷}	۱/۰۰ × ۱۰^{۷}	۱/۹۵ × ۱۰^{۷}
۳	۰/۸۵ × ۱۰^{۷}	۱/۱۵ × ۱۰^{۷}	۲/۰۰ × ۱۰^{۷}
٤	۱/۰۵ × ۱۰^{۷}	۱/۲۰ × ۱۰^{۷}	۲/۲۵ × ۱۰^{۷}
میانگین	۰/۹۰ × ۱۰^{۷}	۱/۱۶ × ۱۰^{۷}	۲/۰۶ × ۱۰^{۷}

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که از سه نوع کشت سلولی مختلف که در مراکز تحقیقاتی و آزمایشگاهها استفاده می شود، سلول *HFF* با مقاصد مختلف، مناسبترین کشت سلولی می‌باشد. تعداد متعددی از انواع رده های سلولی برای کشت انگل توکسوپلاسما گوندی و تکثیر فرم فعال (تاکی زوئیت) انگل و جدا سازی و خالص سازی آن مورد استفاده قرار گرفته است. با این وجود تهیه و نگهداری بعضی از انواع سلولها با مشکلاتی مواجه بوده یا به راحتی در آزمایشگاهها در دسترس نمی باشند. همچنین هیچ یک از انواع سلول‌ها و یا روشهای کشت سلولی به تنهایی برای همه اهداف مطالعه *in vitro* توکسوپلاسما مناسب نبوده است.

Domzig و همکاران سلول ۹۳۷*U*(سلول لنفوم هیستوسیت انسانی) را تنها برای استرین *RH* استفاده کرد.[۲۱] *Harmer* و همکاران کشت سلولی *Hep2* را برای تولید انبوه انگل سویه‌های *RH* و *BK* استفاده کردند اما این کشت سلولی به علت تغییراتی که در انگل بوجود می آورد از جمله تغییر آنتی ژنیکی بر اثر شرایط خاص محیط کشت، برای مطالعات فیزیولوژیک انگل مناسب نبود.[۲۵] *Hugh* و همکاران در

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعاتی یافتند که سلول *Hep2* نامناسب بود در حالیکه سلول *(African green monkey primary kidney) AGMPK* حجم زیادی از انگل را تولید نمود.[۱۸] سه نوع سلول مورد بررسی در مطالعه حاضر بخصوص سلولهای *MRC5* و *HFF* به کرات برای کشت توکسوپلاسما با اهداف مختلف بکار رفته است، با این وجود اطلاعاتی در دسترس نیست که نشان دهد کدامیک از این سلولهای معروف برای نگهداری انگل در شرایط *in vitro* ، تولید مثل و تکثیر انگل، بررسی بیولوژیک توکسوپلاسما به خصوص سویه های کند رشد مناسبتر است.

مطالعه حاضر نشان داد که استرین *Beverley* در سلول *HFF* نسبت به *MRC5* و *HEL* بهتر رشد می کند. آثار سایتوپاتیک سلولی در *HFF* دیرتر ظاهر می شود که این خود سبب دیرپایی این نوع سلول می گردد. این پدیده احتمالاً به دلیل کندی در تقسیم سلولی و چسبندگی بیشتر سلولهای *HFF* در سطح داخلی فلاسک می باشد.[۱۶] تغییر *pH* محیط مایع کشت از قلیایی به سمت اسیدی در دو نوع کشت سلولی *MRC5* و *HEL* نسبت به *HFF* شاید باعث کاهش میزان زنده بودن تاکی زوئیتهای سویه *RH* بدست آمده از دو نوع سلول اولی باشد.در مطالعه دیگری نیز نگهداری انگلهای خارج سلولی در محیطی با $pH = ۶$، نسبت زنده بودن انگل تا ۶۰ درصد کاهش پیدا کرد.[۲۶] آلودگی محیط مایع کشت (*supernatant*) حاوی انگلهای تولید شده در داخل فلاسکها به سلولهای میزبان در کشتهای *HFF* به طور معنی داری نسبت به دو نوع کشت سلولی دیگر کمتر بود. البته پس از برداشت نهایی، کل محتوای فلاسکهای هر سه نوع کشت سلولی پس از صاف کردن از فیلتر کمتر از ۱درصد بود که سبب حصول *DNA* با درجه خلوص نسبتاً بالایی گردید که برای استفاده در روشهای بیولوژی مولکولی که نیاز به *DNA* خالص دارد مثل روش *RAPD-PCR*[1] و مناسب است. به طور کلی تولید مقدار خیلی زیادی انگل تقریباً در همه سیستمهای کشت سلولی جهت تولید مقدار قابل توجهی *DNA* بسیار مشکل است لکن برای روشهای مبتنی بر *PCR* که مقدار کمی *DNA* مورد نیاز است استفاده از این ابزار (کشت سلولی) بسیار مناسب است و به کشت *in vivo* (حیوان آزمایشگاهی) ترجیح دارد. این مطالعه نشان داد که به طور کلی کشت *HFF* نسبت به دو نوع سلول دیگر و به خصوص برای کشت سویه های کند رشد مناسبتر است. بعلاوه، این سلول را به راحتی می توان از نسج فورسکین (*foreskin*) در آزمایشگاه و در شرایط استریل تهیه و به مقدار زیادی بدون هیچ مشکلی تکثیر نمود. البته باید مراقب بود که این سلول به ویروسهای مخفی احتمالی موجود در بافت میزبان آلوده نباشد.[۱۶] احتمال آلودگی ثانویه به باکتری‌ها، ویروسها و قارچها نیز در سلول *HFF* بدلیل نیاز کمتر به باز کردن درب فلاسکها جهت تعدیل درصد *CO2* برای تعدیل *pH* محیط (*pH* در *HFF* پایدارتر می ماند)کمتر خواهد بود. سرعت پائین در تکثیر این سلول، نیاز کمتر به *FBS* و چسبندگی بیشتر سلول به سطح داخلی فلاسک امکان نگهداری این کشت سلولی را به مدت طولانی در دمای $۳۷^{o}C$ فراهم می نماید.[۱۶]

بنابراین ابزار مناسبی برای انگلهای با سرعت رشد پائین خواهد بود. به علاوه، این پایداری بیشتر سلول *HFF* به عبارتی دیگر نیمه عمر بالاتر نسبت به دو نوع سلول دیگر برای تبدیل برادی زوئیت به تاکی زوئیت و بالعکس مناسبتر خواهد بود. مطالعه حاضر همچنین نشان داد که کشت *HFF* شانس بهتری را برای تولید کیست نسجی در فلاسکهای کشت سلولی نسبت به دو نوع سلول دیگر فراهم می نماید.

سپاسگزاری

با تشکر از همکاری صمیمانه دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و بخش میکروبشناسی دانشگاه ابردین انگلستان و تشکر از آزمایشگاه رفرانس توکسوپلاسما در اسکاتلند که سویه های استاندارد توکسوپلاسما را در اختیار اینجانب قرار دادند.

1- *Random Amplified Polymorphic DNA*

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Jackson MH, Hutchison WM. The prevalence and source of Toxoplasma infection in the environment. Adv Parasitology 1989; 28:55-105.
2. Assmar M, Amirkhani A, Piazak N, et al. Toxoplasmosis in Iran, results of a seroepidemiological investigation. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 1997; 90:19-21.
3. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11:267-99.
4. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis 1992; 15:211-22.
5. Cornellissen AWCA, Overdulve JP, Hoenderboom JM. Separation of Isospora (Toxoplasma) gondii cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. Parasitol 1981; 83:103-8.
6. Freyre A. Separation of Toxoplasma cyst from brain tissue and liberation of bradyzoites. J Parasitol 1995; 81:1008-10.
7. Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL, Kinnucan T. Examination of tissue cyst formation by Toxoplasma gondii in cell culture using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. J Parasitol 1991; 77:126-32.
8. Jones TC, Bienz KA, Erb P. In vitro cultivation of Toxoplasma gondii in astrocytes in the presence of gamma interferon. Infect Immun 1986; 51:147-56.
9. Smith JE, Lewis EK. The growth and development of Toxoplasma gondii tissue cysts in vitro. In: Smith JE, editor. Toxoplasmosis. Heidelberg: Springer-Verlag; 1993.PP.99-108.
10. Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, et al. A cell culture system for study of the development of Toxoplasma gondii bradyzoites. J Eukaryot Microbiol 1995; 42:150-7.
11. Halonen SK, Chiu FC, Weiss LM. Effect of cytokines and quercetin on Toxoplasma gondii cyst induction in murine astrocytes. J Eukaryot Microbiol 1999; 46:83S-84S.
12. Pfefferkorn ER, Borotz SE. Comparison of mutants of Toxoplasma gondii selected for resistance to Azitrmycine, Spiromycine, or Clindamycine. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:31-7.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC. Toxoplasma gondii: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. Exp Parasitol 1976; 39:365-76.
14. Pfefferkorn ER, Nothnagel RF, Borotz SE. Parasiticidal effect of clindamycin on Toxoplasma gondii grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:1091-6.
15. Evans R, Chatterton JMW, Ashburn D, et al. Cell-culture system for continuous production of Toxoplasma gondii tachyzoites. Eur J Infect Dis 1999; 18:879-84.
16. Roos DS, Donald RGK, Morrissette NS, Moulton ALC. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite Toxoplasma gondii. Methods cell biol 1994 ;45:27-63.
17. Kaufman HE, Maloney ED. Multiplication of three strains of Toxoplasma gondii in tissue culture. J Parasitol 1962; 48:358-61.
18. Hughes HPA, Hudson L, Fleck DG. In vitro cultivation of Toxoplasma gondii in primary and established cell lines. Int J Parasitol 1986; 16:317-22.
19. Schwartzman JD. Quantitative comparison of infection of neural cell and fibroblast monolayers by two strains of Toxoplasma gondii (42587). Proc Soc Exp Biol Med 1987; 186:75-8.
20. Chamberland S, Current WL. Use of mouse macrophage cell lines for in vitro propagation of Toxoplasma gondii RH tachyzoites (43237). Proc Soc Exp Biol Medicine 1991; 197:150-7.
21. Domzig W, Séguéla JP, Binz H. A method to obtain large quantities of Toxoplasma gondii tachyzoites with extreme purity. J Parasitol 1993; 79:613-5.
22. Appleford PJ, Smith JE. Toxoplasma gondii: the growth characteristic of three virulent strains. Acta Trop 1997; 65:97-104.
23. Sambrook J, Fritch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1989.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Cristina N, Liaud MF, Santoro F, Oury B, Ambroise-Thamas P. A family of repeated DNA sequences in Toxoplasma gondii: cloning, sequence analysis, and use in strain characterisation. Exp Parasitol 1991; 73:73-81.

25. Harmer C, Hassl A, Kreinecker S, Aspöck H. Toxoplasma gondii in vitro cultivation: economic and efficient mass production. J Microbiol Methods 1996; 27:225-8.

26. Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL. Phagosome acidification blocked by intracellular Toxoplasma gondii. Nature 1985; 315:416-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of three different cell cultures for tachyzoite and DNA production of Toxoplasma gondii

Fazaeli A. PhD*

Background: *Toxoplasma gondii is one of the most prevalent zeonotic protozoa that has been farther considered with concern to the increasing prevalence of AIDS during the last two decades. Cell culture is an important and necessary tool for molecular and cell biology of Toxoplasma gondii as well as maintaining stock and routine laboratory works. This study was performed to evaluate different cell lines and select an appropriate one for Toxoplasma gondii culture, tachyzoite production and DNA preparation.*

Methods and Materials: *Three different fibroblast mono layers were assayed by inoculation of two strains including RH and Beverley, the representatives of virulent and avirulent phenotypes, respectively.*

Results: *The results showed that the viability of propagated parasites in the HFF cultured flasks was higher than that of the other two cell cultures. The pH of culture medium was more stable in the HFF flasks, whereas it was likely to become acidic in the HEL and MRC5 flasks. Total parasite yield in RH strain cultures comparing to the Beverley cultures in all three cell lines was significantly higher. However, comparison of the Beverley strain tachyzoite yield in different cultures showed a higher parasite quantity in the HFF line. Total amount of extracted and purified DNA was 31 to 33 µgr/flask for the RH strain and 20 to 25 µgr/flask for the Beverley strain.*

Conclusions: *It was concluded that the HFF is the most suitable cell line for routine and continuous subculture as well as DNA production from most Toxoplasma strains.*

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii, Cell culture, DNA production, Molecular and cell biology, HFF, HEL, MRC5*

***Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of medicine, Zahedan University of Medical Sciences and health services, Zahedan, Iran.**

Archive of SID
www.SID.ir