Research article

New Cell Mol Biotech
j.9/36 , 2019

Scan online to view this article

Study of Leishmania Tropica proliferation in mouse J774A-1 cell line

Zahra Moradi [1], Saeed Zaker Bostanabad [1]*, Ramtin Hadighi [2]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad Parand University, Tehran, Iran
2-. Department of Parasitology, Faculty of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran,

Abstract

Aim and Background: From the perspective of biology The genus Leishmania belongs to Tripanozomatite tribe flagellate Parasits. Leishmania is in the form of promastigotes and amastigotes. In culture, In the form of promastigotes and intra-macrophage is in the form of amastigotes. The aim of this study was to investigate the survival of *L.tropica* parasites in culture .

Materials and Methods: In this study, the Possibility of growth in NNN and RPMI1640 culture Reviewed . In the laboratory, Conditions were provided that *L.tropica* protighotites transformed into amastigotes that live in the host cell. Growth of *L.tropica* was investigated in comparison with other types of leishmaniasis, such as *L. major*. *L.tropica* was kept at 25-26°C in a conventional incubator. *L.tropica* culture culture was performed in RPMI1640 culture. Contamination of *L.tropica* was done on J774A-1 cells. The J774A-1 cell was maintained in RPMI1640 medium. Cells were stored at 37°C in a CO2-encoded incubator.

Results: *L.tropica* After infecting was observed on the J774A-1 macrophage cell line. compared to *L.major*, Which takes more time to show its performance, *L.tropica* is the power of survival for a long time Inside it. It was also observed that *L.tropica* was only stored and not proliferated in NNN medium.

Conclusion: The results indicate that *L.tropica* protighotites, in laboratory environment Became amastigotes Which host cells have the power of survival for a long time.

Keywords: Proliferation and growth, *L. tropica*, J774A-1

Corresponding author:
Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad Parand University, Tehran, Iran
Email: saeedzaker20@yahoo.com

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره -۳۶ پائیز ۱۳۹۸
مقاله تحقیقی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

مطالعه و بررسی تکثیر لیشمانیاتروپیکا در رده سلولی J774A-1 موشی

زهرا مرادی [۱]، سعید ذاکر بستان‌آباد [۱*]، رامتین حدیقی [۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکره علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۲. گروه انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: جنس لیشمانیا از نظرزیست شناسی به انگل‌های تاژک‌دارخانواده تریپانوزوماتیدهآ [1]تعلق دارد. لیشمانیا به دو فرم پروماستیگوت و آماستیگوت است. در محیط کشت به‌فرم پروماستیگوت و داخل ماکروفاژ به‌فرم آماستیگوت است. در این پژوهش هدف بررسی زنده ماندن انگل‌های لیشمانیاتروپیکا *(L.tropica)* در محیط کشت سلول است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه امکان رشد در محیط کشت Novy-MacNeal-Nicolli (N.N.N) وRPMI1640 بررسی گردید. در آزمایشگاه شرایطی فراهم شد که پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا، به آماستیگوت‌هایی که در سلول میزبان زنده - ماندند تبدیل شدند. رشد لیشمانیاتروپیکا، در مقایسه با انواع لیشمانیاهای دیگر مانند لیشمانیا ماژور بررسی گردید. لیشمانیاتروپیکا در دمای ۲۶- ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور معمولی نگهداری شد. کشت لیشمانیاتروپیکا در محیط کشت RPMI1640 انجام شد. آلوده‌سازی لیشمانیاتروپیکا بر روی سلول J774A-1 انجام شد. سلول J774A-1 در محیط کشت RPMI1640 نگهداری شد. سلول‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO_2 دار نگهداری شدند.

یافته‌ها: لیشمانیاتروپیکا بعد از آلوده‌سازی بر روی سلول ماکروفاژی J774A-1 مشاهده شد. در مقایسه با لیشمانیاماژور که زمان بیش‌تری نیاز دارد تا عملکرد خود را نشان دهد، لیشمانیاتروپیکا در داخل این سلول قدرت زنده ماندن برای زمان طولانی را دارد. هم‌چنین مشاهده شد لیشمانیاتروپیکا در محیط کشت N.N.N فقط نگهداری می‌شود و تکثیر نمی‌شود.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها در این تحقیق نشان داد پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا، در شرایط آزمایشگاه به آماستیگوت‌هایی تبدیل شدندکه درسلول‌های میزبان قدرت زنده ماندن برای زمان طولانی را دارند.

واژه‌های کلیدی: تکثیر و رشد، لیشمانیاتروپیکا ، J774A-1

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در ایران است که کنترل این بیماری به‌لحاظ مداخله در محیط با اهداف کاهش ناقل و مخزن حیوانی بیماری هزینه زیادی دارد (۱). لیشمانیازیس انگلی تک یاخته است که توانایی آلوده-سازی انسان و چندین گونه از پستانداران را دارد. این انگل با پشه خاکی آلوده انتقال داده می‌شود، که میکروارگانیسم‌ها در نیش آن‌ها است (پروماستیگوت) (۲).

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی
پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۷

[1]. Trypanosomatidea

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

بعد از ایجاد زخم درون پوست میزبان، پروماستیگوت‌ها با فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای فرا گرفته می‌شوند (در سلول میزبان)، آن‌ها تبدیل به آماستیگوت می‌شوند. ماکروفاژهای انگلی وقتی در میزبان آلوده قرار می‌گیرند، آماستیگوت‌ها دوباره به پروماستیگوت در دستگاه گوارش قربانی تبدیل می‌شوند. پروماستیگوت اندامی است که به‌سادگی می‌تواند در آزمایشگاه رشد کند (۲).

مطالعه‌های انجام شده با هدف بررسی زنده ماندن انگل لیشمانیاتروپیکا در محیط کشت برای بررسی و مطالعه‌های آزمایشگاهی است. رشد انگل را می‌توان در محیط‌های کشت مختلف بررسی کرد. در این مطالعه‌ها رشد لیشمانیاتروپیکا در مقایسه با انواع لیشمانیاهای دیگر مانند لیشمانیا ماژور *(L.major)* بررسی می‌شود (۱۲).

محیط کشت (Novy - Mac-Neal and Nicolle) N.N.N نتایج بسیار رضایت‌بخش را به‌خصوص برای جداسازی اولیه لیشمانیاتروپیکا نمی‌دهد (۱). مطالعه‌ها به‌منظور به‌دست‌آوردن رشد فراوان در سطح جامد انجام گرفته‌اند. پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا در محیط کشت RPMI-1640 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و PH=۷/۴ کشت داده می‌شود (۴،۳). رنگ‌آمیزی با روش گیمسا انجام می‌شود.

Rogers (۱۹۰۴) اولین بار ثابت کرد که لیشمانیا دونووانی (*L.donovani*) در بدن انسان در طحال به‌صورت گرد تاژک‌دار است و با حل کردن در سدیم سیترات برای چند روز در دمای آزمایشگاه نگه داشته می‌شود (۲۹). Nicolle (۱۹۰۸) لیشمانیا اینفنتوم *(L.infantum)* را در محیط کشت N.N.N کشت داد و نشان داد که شناسایی کشت فرعی امکان‌پذیر بود. Nicolleو Manceaux (۱۹۱۱) مشاهده کردند که لیشمانیاتروپیکا را هم‌چنین می‌توان در محیط کشت N.N.N در سطح جامدی که تازه بود و سطح آن خشک نبود کشت داد. در پایان ۴یا ۵ روز به‌صورت کوچک، گرد، صاف و کلنی‌های شفاف، کوچک‌تر از سر سنجاق گسترش یافتند. چنین کلنی‌های گردی از لیشمانیا فراوان هستند (۴).

مطالعه‌های Esterre و همکارانش در سال ۱۹۸۹ نشان دادند که رابطه‌ای بین گروه‌های خونی انسان با رشد عامل لیشمانیوز جلدی آمریکایی وجود ندارد (۵).

مطالعه‌های Gupta و همکارانش نشان داد که تغییر مواد تشکیل دهنده محیط کشت لیشمن و شرایط نگهداری محیط کشت‌ها با رشد پروماستیگوت لیشمانیوز جلدی رابطه دارد (۱).

Evans در سال۱۹۸۶ از سرم خون جنین گاوی (ECS) غیر فعال برای کشت پروماستیگوت‌ها ۱۲ سوش تأیید شده سازمان بهداشت جهانی استفاده نمود و نشان داد که افزودن ECS فعال یا غیر فعال در رشد پروماستیگوت تفاوت ایجاد نمی‌کند (۵).

در سال ۱۸۸۵ نخستین بار، Cuningham وجود تک یاخته انگلی را از زخم‌های جلدی گزارش کرد و در سال ۱۹۰۰، لیشمن (leishman) نام‌گذاری شد. در سال ۱۹۰۴ برای اولین بار Rogers موفق به کشت انگل و مشاهده فرم تاژک‌دار آن در محیط کشت حاوی خون خرگوش گردید. در سال ۱۹۰۸ توسط Novy ,Mac-Neal and Nicolle به نام محیط N.N.N معروف شد و امروزه در اکثر آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱).

مطالعه‌های Gupta و همکارانش نشان داد که تغییر مواد تشکیل دهنده محیط کشت لیشمن و شرایط نگهداری

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

محیط کشت‌ها با رشد پروماستیگوت لیشمانیوز جلدی رابطه دارد(۱).

این پژوهش تکثیر لیشمانیاتروپیکا در مقایسه با تکثیر لیشمانیا ماژور بررسی نمود. هدف اصلی در این پژوهش تکثیر لیشمانیاتروپیکا در محیط‌های مختلف کشت و داخل ماکروفاژ و تغییرهای ایجاد شده است. تکثیر لیشمانیاتروپیکا در محیط‌های کشت N.N.N و RPMI1640 و آلوده‌سازی در سلول ماکروفاژی J774A1 موشی انجام شد.

روش کار

این تحقیق تجربی که به‌منظور مطالعه اثر لیشمانیاتروپیکا در مقایسه با لیشمانیا ماژور بر روی سلول ماکروفاژی J774A-1 در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نمونه‌های مورد مطالعه از نظر آلودگی به آماستیگوت انگل لیشمانیا به‌روش گیمسا رنگ‌آمیزی شدند.

سویه استاندارد انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) و سویه استاندارد انگل لیشمانیاتروپیکا، (MHOM/AF/88/KK27) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد، سویه‌های استاندارد در محیط کشت Novy-MacNeal-Nicolli (N.N.N) داخل لوله‌های مخصوص کشت نگهداری شدند. این لوله‌ها قابل مشاهده با میکروسکوپ معکوس بودند. هر دو تا سه روز یک‌بار این محیط‌ها بررسی شدند و هرگاه تعداد انگل‌ها به حد قابل توجهی رسیدند، دوباره فاز مایع اضافه شد. پاساژ برای تازه شدن محیط کشت به‌همراه ۱ ml محیط کشت RPMI1640 بدون FBS انجام شد. هر زمان نیازبه انگل بود از این محیط برداشته شد و پس از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰- ۲۰۰۰ به فلاسک منتقل شد. به‌دلیل دست‌یابی به انگل‌های فاقد آگار و گلبول‌های قرمز، کشت انگل در محیط RPMI1640 انجام شد. سرم جنین گاوی FBS ۱۰٪ تا ۲۰٪ به‌منظور غنی سازی محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.

لوله‌های کشت در دمای۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر روز مورد بررسی قرار گرفتند. هنگامی‌که اشکال پروماستیگوت به مرحله ایستایی (Stationary phase) رسیدند محتوی لوله‌های کشت را سانتریفیوژ نموده و انگل-های رسوب داده شده را چند بار با بافر Phosphate) PBS (buffered saline استریل شست و شو داده و سپس مقداری PBS به آن افزوده و با استفاده از لام نئوبار انگل‌ها در واحد حجم شمارش و محاسبه شدند.

کشت سلول

سلول‌های رده سلولی J774A-1 داخل فلاسک ۵۰ml از انستیتو پاستور خریداری شد. به‌دلیل این‌که این رده سلولی از نوع سلول‌های چسبنده بود در زمان مشاهده با میکروسکوپ معکوس به‌صورت چسبیده در کف فلاسک دیده شد. بعد از خارج نمودن مایع رویی و شستشو با محلولی با نام Pbs و اضافه نمودن تریپسین و با گذشت زمان ۳ دقیقه، سلول‌ها به فلاسک جدید انتقال داده شدند. سپس محیط کشت کامل را اضافه می‌نماییم. به‌دلیل اختلاف دمای داخل یخچال و فلاسک حاوی سلول، قبل از اضافه نمودن محیط کشت به سلول، محیط به‌مدت چند دقیقه داخل انکوباتور Co_2 دار قرار داده شد تا کمابیش با فلاسک هم دما شود. با این اقدام از ایجاد شوک سلولی جلوگیری شد. پس از اضافه نمودن محیط کشت ، ابتدا وضعیت سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده شد، بعد داخل انکوباتور Co_2 دار قرار داده شد و به‌طور روزانه وضعیت سلول‌ها مورد بررسی کامل قرار گرفت.

باتوجه به رشد سلول هر ۲۴ تا ۴۸ ساعت یکبار محیط درون فلاسک تعویض شد. سلول‌ها در اثر تکثیر، محتوی مقداری مواد سمی و دفعی بودند که سبب زرد شدن محیط شد. این مواد PH محیط را کم کرده و محیط را اسیدی می‌کنند. بنابراین برای ادامه رشد سلول، این مواد از فلاسک خارج شدند. لازم به ذکر است، تمام محیط کشت نباید خارج شود

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

ml ۲-۱ محیط به‌دلیل دارا بودن فاکتورهای رشدی که سلول تولید کرده باید در فلاسک باقی بماند.

مرحله آلوده‌سازی ماکروفاژ با پروماستیگوت

پلیت‌ها درون انکوباتور CO_2 دار ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. حدود ٪۵۰-۶۰٪ ماکروفاژها به لامل می‌چسبند (حدود $۱۰^۴$ ماکروفاژ). ۲۴ ساعت پس از کشت سلول پلیت‌ها را از انکوباتور خارج نموده، سپس مرحله اضافه کردن انگل، که به‌ازای هر ۱ ماکروفاژ ۱۰ انگل اضافه شد (به‌ازای $۱۰^۴$ سلول باید $۱۰^۵$ انگل اضافه شود). در ادامه در دو پلیت جداگانه، انگل لیشمانیا ماژور و انگل لیشمانیاتروپیکا اضافه شد. پلیت‌ها درون انکوباتور قرار داده شدند.

رنگ‌آمیزی ماکروفاژها

مقداری سلول حاوی انگل از سطح پلیت برداشته شد. در ابتدا این نمونه، با الکل متیلیک ثابت شد. در مرحله بعد محلول رنگ گیمسا (به نسبت ۱ به ۵۰۰ با آب رقیق شده) اضافه نموده ، لام‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در آن قرار داده شد. بعد از این مدت لام‌ها در زیر جریان آب شیر به‌آرامی شستشو شد. پس‌از خشک‌شدن، لام‌ها آماده مطالعه میکروسکوپی بودند.

مشاهده آماستیگوت‌ها در ماکروفاژها

تهیه گسترش و رنگ آمیزی به مدت ۲۱ روز انجام شد و وجود آماستیگوت‌ها در داخل ماکروفاژها بررسی شد. ماکروفاژهایی که دارای لیشمانیا ماژور است در کم‌تر از یک هفته از بین می‌روند. اما ماکروفاژهای آلوده شده با لیشمانیاتروپیکا به‌مدت حدود ۳ هفته باقی‌ماند.
نمونه‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰ در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. تعداد انگل اضافه شده به سلول ۱۰ برابر سلول است. به پلیت دوم لیشمانیا ماژور به‌منظور مقایسه با لیشمانیاتروپیکا اضافه شد.

نتایج

نتایج نگهداری انگل در محیط کشت

نتایج بررسی چگونگی رشد انگل لیشمانیاتروپیکا در محیط کشت NNN نشان داد که این محیط کشت فقط برای نگهداری انگل لیشمانیا تروپیکا است.

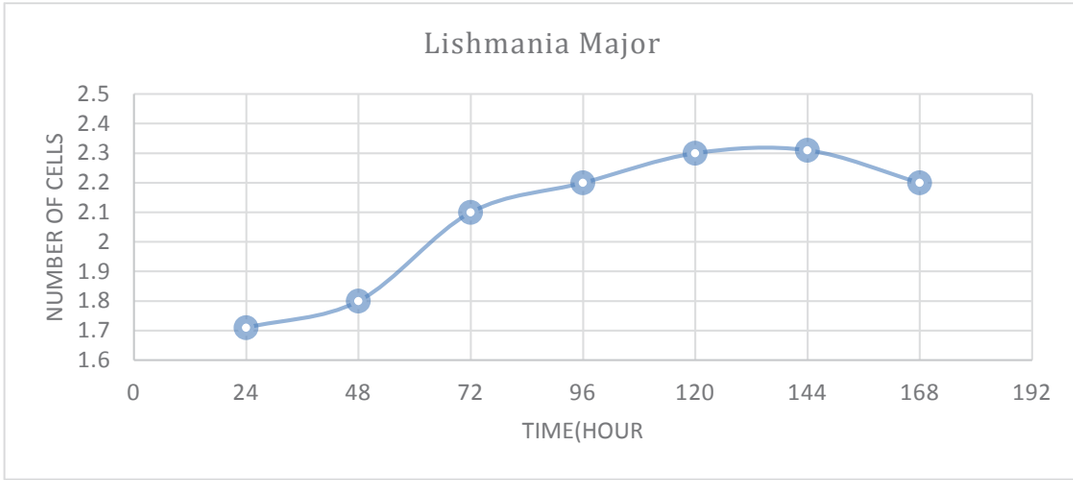
در این پژوهش پس از اضافه نمودن محیط کشت RPMI1640 به لیشمانیاتروپیکا و لیشمانیا ماژور و انتقال فلاسک‌ها به انکوباتور معمولی ۲۶ درجه سانتی‌گراد، شمارش انگل به‌طور روزانه با فرمالین و برروی لام نئوبار انجام شد. طبق داده‌های جدول ۱، ابتدا منحنی، رشد تأخیری را نشان داد. سپس وارد فاز لگاریتمی و در روزهای پایانی وارد فاز ثابت شد. از روز چهارم به بعد انگل‌ها دارای این قابلیت بودند که به ماکروفاژ اضافه شوند. منحنی شمارش روزانه در نمودار ۱ و ۲ مشخص شده است.

جدول ۱- شمارش روزانه لیشمانیا ماژور و لیشمانیاتروپیکا

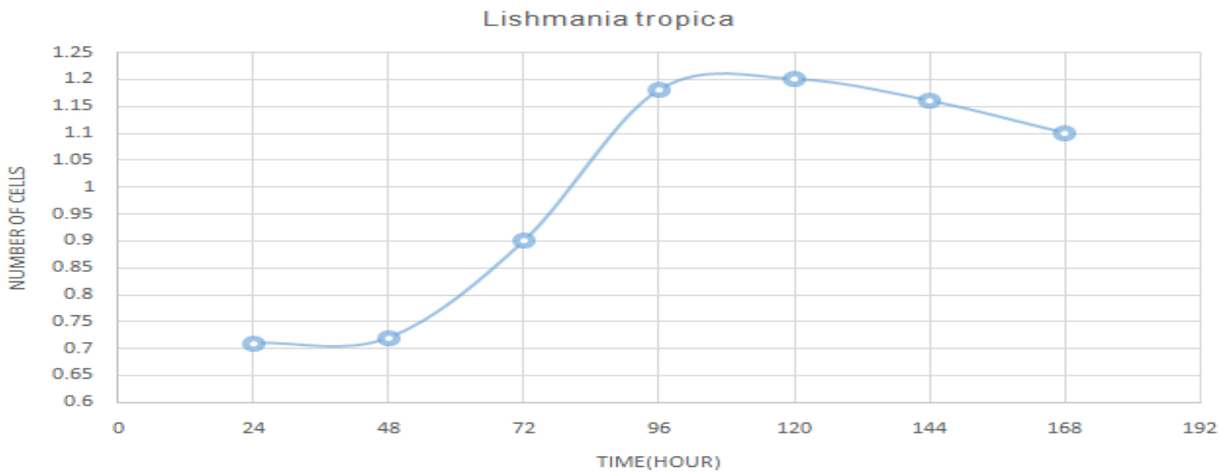
روز	روز اول	روزدوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم
شمارش روزانه لیشمانیا ماژور	$۱/۷۱\times۱۰^۶$	$۱/۸\times۱۰^۶$	$۲/۱\times۱۰^۶$	$۲/۲\times۱۰^۶$	$۲/۳\times۱۰^۶$	$۲/۳۱\times۱۰^۶$	$۲/۲\times۱۰^۶$
شمارش روزانه لیشمانیا تروپیکا	$۰/۷۱\times۱۰^۶$	$۰/۷۲\times۱۰^۶$	$۰/۹\times۱۰^۶$	$۱/۱۸\times۱۰^۶$	$۱/۲\times۱۰^۶$	$۱/۱۵\times۱۰^۶$	$۱/۱\times۱۰^۶$

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]



نمودار ۱- منحنی شمارش روزانه لیشمانیا ماژور



نمودار ۲- منحنی شمارش روزانه لیشمانیا تروپیکا

نتایج آلوده‌سازی ماکروفاژ با پروماستیگوت

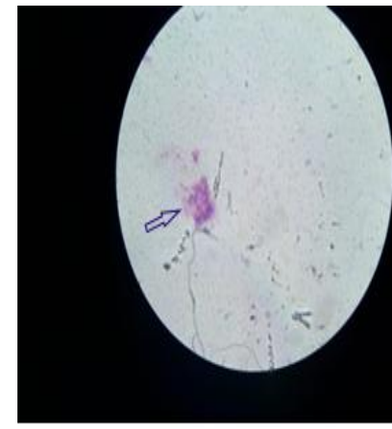
در جدول ۲ مشاهده می‌شود پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در روز اول وارد ماکروفاژ شد. در داخل ماکروفاژ فرم پروماستیگوت به فرم آماستیگوت تبدیل شد (شکل ۱). تعداد آماستیگوت‌ها تا روز چهارم به حداکثر تعداد رسید و در روز پنجم آماستیگوت‌ها ماکروفاژ را پاره نموده و به آلوده‌سازی ماکروفاژهای دیگر پرداختند.

جدول۲. روند تکثیر لیشمانیا ماژور داخل سلول ماکروفاژی J774A-1

روز	تکثیر انگل لیشمانیا ماژور
روز اول	پروماستیگوت‌ها در حال وارد شدن به ماکروفاژ
روز دوم و سوم	وجود آماستیگوت‌ها در داخل ماکروفاژ
روز چهارم	افزایش تعداد آماستیگوت‌ها داخل ماکروفاژ
روز پنجم	پاره شدن ماکروفاژ و خروج انگل از ماکرو فاژ

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

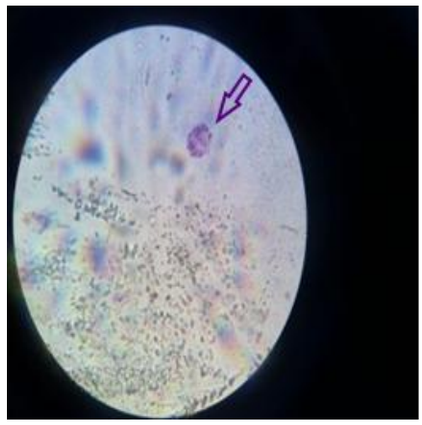


شکل ۱- انگل لیشمانیا ماژور داخل سلول J774A-1: سلول به رنگ صورتی نشان داده شده که انگل در داخل آن با رنگ بنفش توسط پیکان مشخص شده است.

طبق (جدول ۳) پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا در روز اول هنوز داخل سلول نشده. در روز دوم انگل‌ها درحال داخل شدن به سلول بودند. در روز سوم انگل داخل سلول شده است. از روز ششم تا روز دوازدهم تعداد آماستیگوت‌ها به آرامی در سلول در حال افزایش بودند (شکل ۲). روزهای سیزدهم و چهاردهم آماستیگوت‌ها به کناره‌های ماکروفاژ نزدیک شدند. روزهفدهم آماستیگوت‌ها در حال خروج از سلول بودند و روز هجدهم سلول پاره شده و آماستیگوت‌ها از سلول خارج شدند.

جدول ۳- روند تکثیر انگل لیشمانیاتروپیکا در داخل در داخل سلول ماکروفاژی J774A-1

روز	تکثیر انگل لیشمانیا تروپیکا
روز اول	هنوز پروماستیگوت‌ها وارد ماکروفاژ نشده‌اند.
روز دوم	پروماستیگوت‌ها در حال داخل شدن به ماکروفاژ
روز سوم	حضور آماستیگوت‌ها در داخل ماکروفاژ
روزهای چهارم تا دوازدهم	افزایش تعداد آماستیگوت‌ها در داخل ماکروفاژ
روزهای سیزدهم وچهاردهم	نزدیک شدن آماستیگوت‌ها به کناره‌های ماکروفاژ
روز های پانزدهم و شانزدهم	قرار گیری آماستیگوت‌ها در دهانه پاره شده ماکروفاژ
روزهای هفدهم و هجدهم	پاره شدن ماکروفاؤ و خروج انگل



شکل ۲- انگل لیشمانیاتروپیکا داخل سلول J774A-1 : سلول به رنگ صورتی نشان داده شده که انگل در داخل آن با رنگ بنفش توسط پیکان مشخص شده است.

به‌این ترتیب مشاهده شد لیشمانیاتروپیکا درمقایسه با لیشمانیا ماژور زمان بیش‌ترین نیاز دارد تا در محیط کشت عملکرد خود را نشان دهد و از سلول خارج و باعث آلوده‌سازی سلول‌های دیگر شود.

بحث

کشت استاندارد شده گونه‌های لیشمانیا در محیط کشت روش مفیدی برای به‌دست‌آوردن مقادیر زیادی انگل جهت اهداف گوناگون پژوهشی است. کشت انگل در راستای ارتقاء آگاهی از ارتباطات بین انگل و میزبان و هم‌چنین تشخیص خصوصیات زیستی انگل مؤثراست (۶).

یکی از اهداف اولیه محققین از کشت انگل، به‌دست‌آوردن مقادیر زیاد گونه‌های مختلف انگلی وحفظ طولانی مدت آن ها است (۷).

محیط‌های مورد استفاده برای کشت انگل لیشمانیا شامل: محیط دوفازی و محیط مایع است، محیط کشت دو فازی شامل فاز جامد؛ آگار، نمک و خون خرگوش و فاز مایع آن معمولا سرم فیزیولوژی است. پروماستیگوت تمام گونه‌های لیشمانیا می‌تواند به‌صورت اگزنیک در محیط‌های مایع کشت داده شوند. کشت پروماستیگوت درمحیط آزمایشگاه به آسانی انجام‌پذیراست لذا در سال‌های گذشته تحقیقات

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

بسیار زیاد و دامنه‌داری که روی لیشمانیوز انجام گرفته همگی با استفاده ازپروماستیگوت‌های کشت داده شده درمحیط آزمایشگاه بوده است (۹،۸)، ولی از آن‌جا که فرم پروماستیگوت، فرمی است که در بدن پشه خاکی رشد و تکثیر می‌یابد و فرم آماستیگوت، شکلی از انگل است که در زخم روی بدن میزبان مهره‌دار مستقر شده و بیماری ایجاد می‌کند، به‌راحتی نمی‌توان نتیجه تحقیقات در مورد پروماستیگوت را به‌فرم آماستیگوت تعمیم داد (۹). این مسئله با یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های آماستیگوت ازنظر خصوصیاتی مثل پروتئین‌های سطحی با فرم پروماستیگوت قابل بررسی بوده است. به‌طور معمول بین دو هفته تا دو ماه زمان لازم است تا انگل بتواند در یکی از محیط‌های غنی مایع حاوی سرم حیوانی یعنی سرم جنین گوساله و آلبومین یا ادرار انسان با درصدهای مختلف عادت به رشد نماید. طولانی‌تر شدن زمان رشد و پاساژهای متوالی تغییرهایی در انگل به‌وجود می‌آورد، در ضمن کاهش تعداد انگل یکی از این مشکلات است. در سال ۲۰۰۲ محیط مناسبی جهت کشت لیشمانیا اینفنتوم با استفاده از آگار ۷٪، کلرور سدیم، خون خرگوش، RPMI و ۵٪ سرم جنین گوساله معرفی شد (۱۰). کشت پروماستیگوت در محیط مایع یک الی دو ماه طول می‌کشد و به‌طور مرتب باید به انگل محیط کشت مایع اضافه شود. تناوب این کار باعث آلودگی محیط کشت با میکروب، قارچ و گونه‌های دیگر انگل می‌شود. هزینه و تهیه سرم حیوانی از جمله سرم جنین گوساله گران است. کشت انبوه انگل لیشمانیا جهت مطالعه‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژی و ایمن‌شناسی یک ضرورت است، در این مطالعه-ها سعی شد با تغییرهای اساسی در محیط جامد خون‌دار و حذف مواد گران‌قیمت، محیط جامد ارزان‌قیمت که انگل به خوبی در آن رشد یابد تهیه گردد.

از جمله محیط‌های دو فازی آشنا، محیط Novy-MacNeal-Nicolli (N.N.N) است که یکی از رایج‌ترین محیط‌های کشت انگل جهت جداسازی اولیه لیشمانیا به حساب می‌آید (۱۱). مشکل اصلی در محیط‌های تک فازی تهیه ماده افزودنی سرم جنین گوساله (Fetal calf serum یا FCS) است که به‌عنوان مکمل جهت تحریک تقسیم یاخته و رشد انگل به محیط اضافه می‌شود.

محیط کشت RPMI1640 کاربردهای مختلفی در کشت سلول‌های پستانداران دارد، این محیط کشت با فرمولاسیون‌های متنوع تولید می‌شود تا برای هر کاربردی مناسب باشد. PRMI1640 در فرمت‌های دارای گلوتامکس (GlutaMAX ™)، دارای L-glutamine، دارای معرف فنول رد (phenol red) و نیز فاقد فنول رد در بافر HEPES فرموله شده است.

مطالعه‌های Dalit و Charles بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا که در مرحله متاسیکلیک به موش‌های صحرایی تزریق شدند، نشان داد که در انتهای مطالعه، انگل در طحال موش‌ها یافت شد. بار انگلی در مقایسه با مکان-های تلقیح تا حدود ۴۰ برابر بیش‌تر در طحال بود (۱۲).

Talari A, VakiliZ, Saffari M.(2008) بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیاتروپیکا درمحیط کشت محتوی خون خرگوش و محیط‌های هشت‌گانه خون انسان و محیط‌های گاو، بز وگوسفند با۱۰تکرار آزمایش‌هایی انجام دادند. زمان سازگاری با محیط و حداکثر و حداقل رشد بر مبنای کاهش تعداد انگل فعال نسبت‌به تعداد انگل در زمان کشت محاسبه گردید. سرعت زمان سازگاری پروماستیگوت در محیط‌ها باهم مساوی و بین۱ تا ۳ روز بود. سرعت رشد انگل در محیط‌های محتوی خون گاو وگروه خونی B^- انسان وضعیت مناسب و مفیدی دارد.

Nsiri, et(20011) نشان داد که رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور درمحیطRPMI1640 غنی شده با ۱۰٪ سرم مرغ و محیط غنی شده با ۱۰٪ FCS کمابیش برابر است (۱۳). زرده تخم‌مرغ، عصاره پلاکتی انسان، سرم انسان، پلاسمای انسان، مایع داخل چشم گاو، سرم موش صحرایی و سرم اسب از جمله موادی هستند که تا به حال با FCS مقایسه شده‌اند (۱۸-۱۴). دراین مطالعه نیز استفاده ازسرم موش، سرم گوسفند و سرم گاو به‌عنوان جایگزین FCS در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

کشت انگل لیشمانیا ماژور مورد ورد بررسی و مقایسه قرارگرفت. نتایج حاصل، یک رشد ۳- ۲ برابری انگل در محیط غنی شده با ۱۰٪ سرم موش سوری در روزهای اولیه پس از کشت نسبت‌به محیط حاوی FCE ۱۰٪ نشان داده و ثابت نمود که این سرم می‌تواند به‌عنوان غنی‌کننده، درصورت اضافه شدن به محیط‌های کشت پایه، محیط مناسبی برای رشد انگل فراهم نماید. البته تحقیقات صورت گرفته در زمینه ترکیب‌های شیمیایی سرم حیوانات مختلف نشان می‌دهد که سطح گلوکز و کلسترول در سرم موش نسبت به سرم گاو و گوسفند بالاتراست. هم‌چنین سطح بعضی مواد معدنی نظیر پتاسیم و فسفر نیز در سرم موش نسبت به سرم گاو وگوسفند در سطح بالاتری قراردارند (۱۷). باتوجه به این مطلب و نیز نتایج به‌دست آمده در این مطالعه به‌نظر می‌رسد بالا بودن سطح این مواد در سرم موش می‌تواند محرک رشد سریع انگل در محیط غنی شده با این سرم باشد. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد سرم گوسفند دارای شیب کم‌تر تکثیر نسبت‌به سایر محیط‌ها بوده و باعث طولانی شدن مرحله ثبات وکاهش شیب مرحله مرگ انگل می‌گردد، لذا قابلیت خوبی برای نگه‌داری طولانی مدت انگل دارد. مطالعه‌های صورت گرفته نشان داده است که سطح کلسترول در سرم گوسفند نسبت‌به سرم گاو پایین‌تر بوده و از نظر سایر مواد نظیرگلوکز، سدیم و پتاسیم کمابیش برابر است (۱۹،۲۰) هم‌چنین تحقیقات صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که کلسترول نقش حیاتی در عملکرد سلول لیشمانیا دونووانی داشته و کاهش آن موجب کاهش عفونت‌زایی انگل می‌شود (۲۰).

Milena و Jan در سال ۲۰۰۳، لیشمانیاتروپیکا را به همسترهای طلایی و موش‌های BALB/C توسط نیش پشه خاکی P.sergenti انتقال دادند. P.sergenti به‌صورت کلنی در آزمایشگاه توسط خون همسترها و موش‌های BALB/C تغذیه شدند. ۶ همستر مورد آزمایش قرار گرفتند، پشه‌های خاکی پرورش یافته در آزمایشگاه در هنگام تغذیه از خون همسترها لیشمانیاتروپیکا را انتقال دادند. بعد از یک ماه آلودگی، چندین ضایعه در ۲ همستر دیده شد. ضایعات زخمی نداشتند و برای همیشه باقی ماندند. آن‌ها آزمایش دیگری برروی ۴ موش BALB/C انجام دادند. در ۳ موش پس از ۶ ماه ضایعات دیده شدند. در ۱ موش پس از ۱ ماه ضایعه در دم ظاهر شد، اما این ضایعه کوچک پس از ۶ ماه ناپدید شد. در این آزمایش انتقال لیشمانیاتروپیکا به همسترهای طلایی و موش‌های BALB/C توسط نیش پشه P.sergenti که میزبان اصلی است، مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد، همه پشه‌های خاکی توانایی انتقال انگل را نداشتند، بنابراین انتقال انگل به‌طور مستقیم با توانایی خوردن خون میزبان مرتبط نیست و زمان و هزینه زیادی صرف این آزمایش شد (۲۱).

مطالعه‌های Kovari و همکاران رفتار فاگوسیتیک پویا سلول رده J774A-1 را نشان داد. این تحقیقات نشان داد که گسترش فاگوسیتیک در مراحل مختلف و با یک دوره متمایز انقباض رخ می‌دهد. مدت زمان پخش و مناطق تماس حداکثر، مستقل از تراکم opsonin سطح است، اگرچه تراکم opsonin بر روی احتمال گسترش سلول تأثیر می‌گذارد. این امر این ایده را تقویت می‌کند که پویایی فاگوسیتوزی به‌طور عمده توسط فعالیت‌های سیتو اسکلتی انجام می‌شود (۲۲).

نتایج حاصل از پژوهش ما، تکثیر لیشمانیاتروپیکا در محیط-های مختلف کشت و داخل ماکروفاژ و تغییرهای ایجاد شده را نشان داد. لیشمانیا تروپیکا طبق مطالعه‌های گذشته برای تکثیر به موجود زنده مانند همسترو موش BALB/C نیاز دارد، اما به‌دلیل صرف هزینه بالا و زمان طولانی، استفاده از موجود زنده مقرون به‌صرفه نیست. بنابراین هدف اصلی در این پژوهش، کشت لیشمانیاتروپیکا در محیط‌های مختلف کشت مانند محیط کشت RPMI1640 و محیط کشت NNN و تکثیر داخل سلول ماکروفاژی J774A-1 در شرایط آزمایشگاه و بدون نیاز به موجود زنده به‌دلیل صرف هزینه بالا و زمان طولانی است و تغییرهای ایجاد شده در این زمینه بررسی شد. در حقیقت این انگل، با مکانیزم دفاعی سلول روبرو است و مواد و آنزیم‌هایی که بسیاری از میکروب‌ها را از بین می‌برند براین انگل بی‌اثرند. دلیل این‌که

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

در محیط ماکروفاژ با این همه مواد ضد میکروبی، لیشمانیاتروپیکا توانایی زنده ماندن دارد این است که: انگل به‌علت داشتن LPG و ایجاد بار منفی بسیار زیاد نسبت‌به اثر آنزیم‌های مختلف مقاوم است و دیگر این‌که انگل مواد بازدارنده آنزیم‌های لیزوزوم شبیه عامل ترشحی(EF) و LPGترشح می‌کند (۲۳). لیشمانیاتروپیکا در محیط کشت N.N.N فقط نگهداری می‌شود و توانایی تکثیر در این محیط را ندارد. پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا قدرت زنده ماندن برای زمان طولانی در ماکروفاژ را دارند و در مقایسه با لیشمانیا ماژور زمان بیش‌تری نیاز دارند تا عملکرد خود را نشان دهند و از سلول خارج و باعث آلوده‌سازی سلول‌های دیگر شوند. این انگل در محیط کشت به شکل پروماستیگوت (تاژک‌دار) است، زمانی‌که وارد ماکروفاژ می‌شود تغییر شکل داده و تاژک خود را از دست می‌دهد و به شکل آماستیگوت تبدیل می‌شود.

به‌علاوه در این مطالعه از سلول‌های ماکروفاژ جهت رشد انگل استفاده گردید تا شرایط ایجاد شده، الگویی از رشد انگل به‌صورت In vitro و یا در داخل سلول میزبان باشد. مشاهده میکروسکوپی ماکروفاژهای کشت داده شده و تشخیص آماستیگوت‌های داخل و خارج سلولی نمایان‌گر مطلوب بودن شرایط رشد بود.

بنابراین در آزمایشگاه شرایطی فراهم شد که پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا، به آماستیگوت‌هایی تبدیل شدند که در سلول‌های میزبان قدرت زنده ماندن برای زمان طولانی را دارند و نتایج حاصل، می‌تواند قابل توجه برای محققینی که درنقاط مختلف دنیا درخصوص لیشمانیاتروپیکا مشغول مطالعه هستند، باشد.

نتیجه‌گیری

کشت عامل لیشمانیوز جلدی در محیط‌های کشت از نقطه نظر شیمیایی، بیولوژیکی، ایمنولوژیکی و شیمیوتراپی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گرچه در چرخه زندگی تک یاخته لیشمانیا دو فرم ظاهر می‌شود یکی فرم لیشمانیائی در درون لکوسیت‌های انسان و حیوانات مهره‌دار (promastigote) که در بدن پشه خاکی رشد می‌نماید و کشت هر دوفرم تک یاخته لیشمانیاتروپیکا امکان‌پذیر است.

درنتیجه این کار پژوهشی دیده شد لیشمانیا ماژور در محیط‌های کشت NNN و RPMI1640 قدرت تکثیر بالایی دارد. اما لیشمانیاتروپیکا در محیط کشت N.N.N تکثیر نمی‌شود، فقط نگهداری می‌شود. پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا قدرت زنده ماندن برای زمان طولانی در ماکروفاژ را دارند و در مقایسه با لیشمانیا ماژور زمان بیش‌تری نیاز دارد تا عملکرد خود را نشان دهد و از سلول خارج و باعث آلوده‌سازی سلول‌های دیگر شود. بنابراین در آزمایشگاه شرایطی فراهم شد که پروماستیگوت‌های لیشمانیاتروپیکا، به آماستیگوت‌هایی تبدیل شدند که در سلول‌های میزبان قدرت زنده ماندن برای زمان طولانی را دارند.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران و مسئولین آزمایشگاه مسعود که امکانات لازم را جهت انجام آزمایشات در اختیار ما قرار دادند، قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

منابع

1.Talari A, VakiliZ, Saffari M. Investigating the effect of different blood on growth of cutaneous leishmaniasis by invitro method. 2006. J. Medical Sciences and Health Services, pp. 75-69.

2. Hosseininasab A, Sharifi I, Daei M. H, Zarean M, Dadkhah M. Causes of Pediatric Visceral Leishmaniasis in Southeastern Iran. 2014, Iran J Parasitol.; 9(4): 584–587.

3. Marina. V, Shirmanova I. N, Druzhkova. M.M, Lukina . M. E. Matlashov .V.V. Belousov L. B, Snopova N.N, Prodanetz V. V, Dudenkova Sergey A. Lukyanov Elena V. Zagaynova. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2. ScienceDirect, 2015:1905-1

4. McCauley J, Zivanovic A, Skropeta D. Bioassays for Anticancer Activities. 2013. Metabolomics Tools for Natural Product Discovery PP191-205.

5. Xu D, Liu H, Komai M, Campbell C, McSharry C, Alexander J. $CD4^{+}CD25^{+}$ Regulatory T Cells Suppress Differentiation and Functions of Th1 and Th2 Cells, *Leishmania major* Infection, and Colitis in Mice. 2003, The Journal of Immunology: 170 (1) 394-399.

6. Mansouri M, Jafari AA, Medicinal Plant Scrophularia striata Evaluation Anti-parasitic Effects on Leishmania major: In vitro and In vivo Study. 2014. BIOSCIENCES BIOTECHNOLOGY RESEARCH ASIA; 11 (2), 627-634.

7.Patricia M. Barnes M.A. Complementary and Alternative Medicine Use Among Adults and Children: United States, 2008. National Health Statistics Reports, Number 12.

8. Fadili K, Messier N, Leprohon P. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes. Antimicrob Agents Chemoter 2005; 49(5):1988-1993.

9. Haytham AZ, Michael LC, Paul AB. The axenic cultivation of leishmania donovani amastigotes. Saudi Med J 1999; 20(5):334-340.

10. Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. High- efficiency plating method for Leshmania infantum. Mol&Biochemi Parasitol 2003; 130(2): 139- 141.

11. Rodrigues IA, da Silva BA, dos Santos AL, Vermelho AB, Alviano CS, Dutra PM, et al. A new experimental culture medium for cultivation of Leishmania amazonensis: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. Parasitol Res 2010; 106(5): 1249-52.

12.Talmi D, Jaffe C, Nasereddin A. Baneth G, *L. tropica* experimental infection in the rat using luciferase-transfected parasites, 2012, Veterinary parasitology : Pages 57-62.

13. Nasiri A, Habibi Gh, Esmailnia K. Use of chicken serum as a good replacement for the fetal calf serum in cultivation of promastigotes of *Leishmania major*. J Archives of Razi Institute 2011;66: 59-64.

14. Kinzebach S. Bieback K. Kinzebach S. Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Conditions. 2012. Basics and Clinical Application I pp33-57.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]

15.Younesi E, Bayati V, Hashemitabar M, Azandeh S. S, Bijannejad D, Bahreini A. Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells: fetal bovine serum or human serum. 2015 Anat Cell Biol; 48(3):170-176.

16. Gérzia M.C, Leonor L. L, Solange L.C. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. 2007. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz ,*Print version* ISSN 0074-0276*On-line version* ISSN 1678-8060.

17. Jawasreh K, Awawdeh F, Bani Ismail Z, Al-Rawashdeh, Al- Majali A. Normal hematology and selected serum biochemical values in different genetic lines of Awassi Ewes in Jordan. 2010 Internet J. Veterinary Medicine Vol.7 No.2 pp.unpaginated ref.12.

18. Eelco B, Dimitris D.T. Experimental and Pharmacokinetic Studies in Intraperitoneal Chemotherapy: From Laboratory Bench to Bedside. 2007; Advances in Peritoneal Surface Oncology pp 53-73.

19. Devendra B, Harinderpal SB, Rakesh S. Role of cholesterol in parasitic infections. 2005, licensee BioMed Central Ltd: **4**:10

20. Fakhar M, Mirzaei M, Rafiei A, Armat S, Mojtahedian M. Comparative Evaluation of Hydatid Cyst Fluid and Fetal Bovine Serum (FBS) in Culture Medium of Rat Fibroblast Cells. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012; 21 (86) :213-221.

21. Milena S,Petr V, Jan V. Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hyraxes (*Procavia capensis*) by the bite of *Phlebotomus arabicus*. 2006, Pages 1691-1694.

22. Kovari D, Wei W, Chang P, Toro J.S, FoggBeach R , Chambers D, Porter K, Koo D, Curtis J. Frustrated Phagocytic Spreading of J774A-1 Macrophages Ends in Myosin II-Dependent Contraction. 2016. Biophysical Journal: Pages 2698-2710.

23. Khatima A, Elodie G, Baptiste V, Bruno O, Denis S. *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. 2011, 109:1225.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.4.8]