مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۵/هفته چهارم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۷

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

امیر نوابی[۱]، دکتر سیمین دخت سلیمانی‌فرد[۲]

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 مقطعی بود و 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 NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) و RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute-۱۶۴۰) منتقل و به شکل پروماستیگوت رشد داده شد. سپس با رسم منحنی رشد، پروماستیگوت‌های مرحله‌ی ایستا جدا گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر یک از محیط کشت‌ها پس از انجماد، همراه با بافر سدیم استات و Triton-X-۱۰۰ هموژنیزه شدند و پس از سانتریفیوژ، میزان فعالیت اسید فسفاتازدر 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 برابر ۰/۰۸ ± ۱/۰۲ و در محیط RPMI ۰/۰۱ ± ۱/۸۰ مساوی µM/min/mg protein به دست آمد. همچنین، Km (Michaelis–Menten) و Vmax (Maximum velocity) اسید فسفاتاز مرحله‌ی ایستا در پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط NNN به ترتیب µM ۱/۱۱ ± ۱۰۵/۲۶ و µM/min/mg protein ۱/۴۸ ± ۹۸/۳۷ و در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ به ترتیب µM ۱/۱۴ ± ۱۰۶/۳۹ و µM/min/mg protein ۰/۹۶ ± ۹۸/۰۴ 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 ایستای 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 پروماسیگوت‌های انگل لیشمانیا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۵): ۱۱۷۴-۱۱۶۶

۱- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، بیمارستان الزهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سیمین دخت سلیمانی فرد
Email: s_soleimanifard@yahoo.com

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، فلاژل‌دار و متحرک است و به صورت اجسام دوکی تاژک‌دار به طول ۲۵-۱۵ µ و عرض ۳-۲ µ 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 ویرولانس انگل نقش دارد (۹). علاوه بر آن اسید فسفاتاز ترشحی در زنده ماندن انگل در بدن پشه‌ی خاکی، شکل‌گیری و تکامل واکوئل پارازیتوفوروس و زنده ماندن اماستیگوت در آن نیز ایفای نقش 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

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 کشت‌های NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) و RPMI-۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute۱۶۴۰) بر زمان عفونی شدن و خصوصیات آنزیمی اسید فسفاتاز در پروماستیگوت‌های L.major مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی بود و در ابتدا برای حصول اهداف پیش‌بینی شده، ml ۰/۱ PBS (Phosphate buffered saline) حاوی ۲×۱۰^{۶} 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 $۱۰^{۴}$ ضرب شد تا تعداد انگل در ml به دست آید. سپس غلظت آن به نحوی تنظیم شد که تعداد مورد نیاز ذکر شده در بالا در ml ۰/۱ آن موجود باشد.

پس از گذشت ۴-۳ 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 ۴-۳ روز با ازدیاد تعداد انگل‌های کشت داده شده، بخشی از این ارگانیسم‌ها به محیط کشت RPMI۱۶۴۰ غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FCS یا Fetal calf serum) انتقال داده شد و در دمای $۲۶ \pm ۱\ ^{o}C$ 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.

تهیه‌ی نمونه

پروماستیگوت‌های مرحله‌ی ایستا در هر یک از دو محیط کشت استفاده شدند. به این منظور تعداد $۱۰^{۶} \times ۵$ پروماستیگوت در ml ۱ 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 PBS، ml ۱ بافر سدیم استات ۰/۱ M (pH = ۵/۲) و ۰/۱ Triton − x − ۱۰۰ درصد به پروماستیگوت‌های منجمد شده اضافه شد و به وسیله‌ی هموژنایزر تفلون، هموژنیزه و در g ۱۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در $۴\ ^{o}C$ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برای اندازه‌گیری اسید فسفاتاز جمع‌آوری گردید (۱۳).

اندازه‌گیری اسید فسفاتاز

جهت اندازه‌گیری اسید فسفاتاز از سوبسترای پارانیتروفنل فسفات استفاده شد (۱۲). طبق این روش، به ml ۲ محلول بافری استات mM ۱۰۰ با pH ۴/۵، مقدار ml ۱ از سوبسترای تهیه شده در قسمت قبل افزوده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در ^{o}C ۲۷ با افزودن µl ۳۰۰ پارانیتروفنل فسفات mM ۱۲۵ واکنش شروع و پس از مدت ۱۰ دقیقه میزان جذب پارانیتروفنل حاصل در nm ۴۰۵ 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.

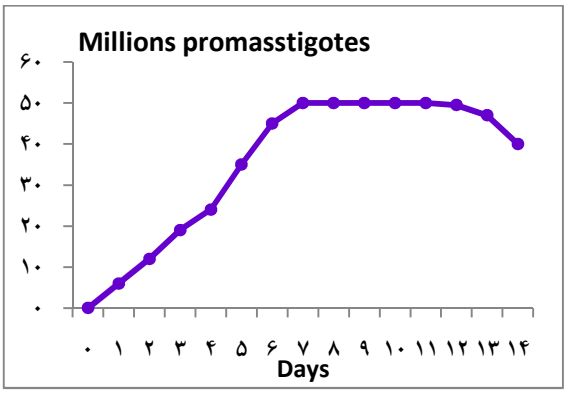
محاسبه‌ی ضریب ثابت Michaelis–Menten (Km) و سرعت بیشینه‌ی (Vmax) آنزیم اسید فسفاتاز

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.

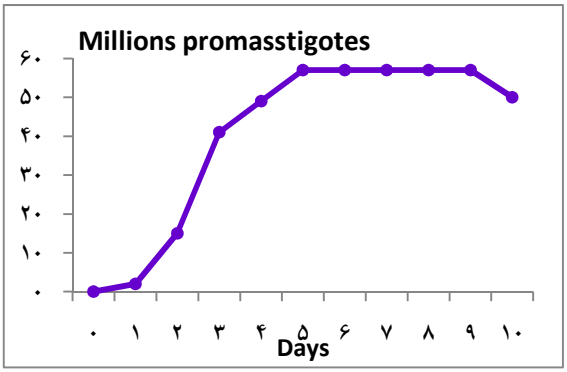
نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آماری Wilcoxon و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل شد.

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 institute۱۶۴۰)

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

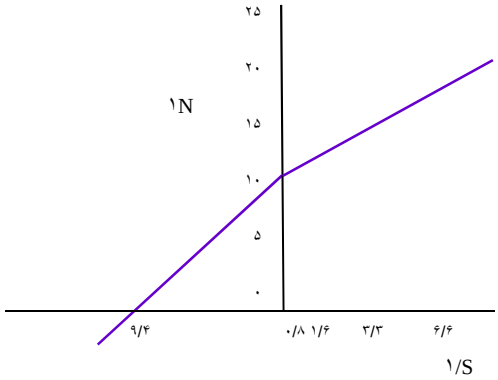
محیط کشت	NNN	RPMI۱۶۴۰
فعالیت اسید فسفاتاز (IU)	۱/۲۰ ± ۰/۰۸	۱/۸۰ ± ۰/۱۰
Km (µM)	۱۰۵/۲۶ ± ۱/۱۱	۱۰۶/۳۹ ± ۱/۱۴
Vmax (Mmol/min/mg protein)	۹۸/۳۷ ± ۱/۴۸	۹۸/۰۴ ± ۰/۹۶

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

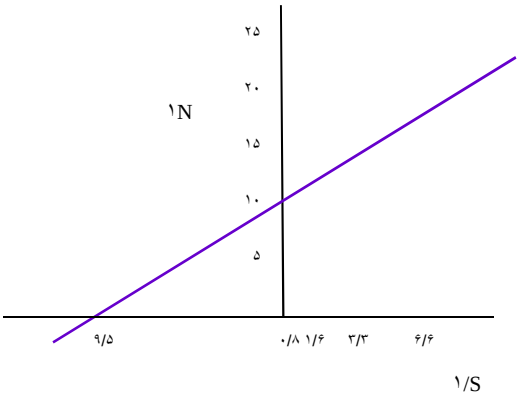
منحنی رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ نشان می‌دهد که پروماستیگوت‌ها از روز ۵ پس از شروع کشت وارد مرحله‌ی ایستا شدند و تا روز ۹ با ثابت بودن تعداد، در این مرحله باقی ماندند. سپس از روز ۹ کاهش تدریجی در تعداد پروماستیگوت‌ها مشاهده شد. با توجه به منحنی‌های رشد، پروماستیگوت‌های مرحله‌ی ایستا در محیط NNN در روز ۸ و در محیط RPMI۱۶۴۰ در روز ۶ پس از کشت، جمع‌آوری شدند.

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

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

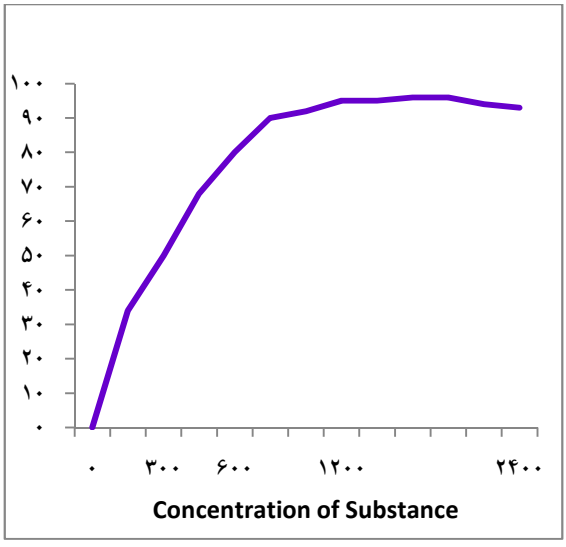


شکل ۳. منحنی لینوویرگ اسید فسفاتاز در مرحله‌ی ایستا در محیط RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute۱۶۴۰)

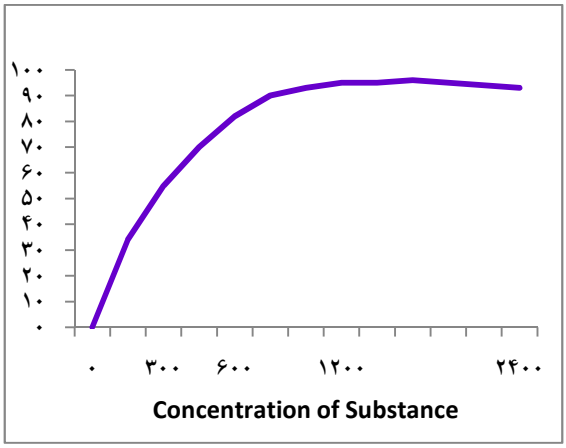


شکل ۴. منحنی لینوویرگ اسید فسفاتاز در مرحله‌ی ایستا در محیط NNN (Novy-MacNeal-Nicolle)

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 مرحله‌ی ایستا در محیط RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park ۱۶۴۰ memorial institute)



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

بحث

در سال‌های اخیر با توجه به شیوع 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 RPMI۱۶۴۰ و NNN به ترتیب روز ۵ و ۷ پس از شروع کشت آغاز می‌شود و طول مرحله‌ی ایستا در پروماستیگوت‌های کشت داده در محیط RPMI۱۶۴۰، 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).

وجود 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

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 آلوده کنندگی 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 می‌باشد؛ اما تفاوت قابل توجهی در میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و نیز Km و Vmax این آنزیم در پروماستیگوت‌های رشد یافته در دو محیط کشت وجود ندارد ($P < ۰/۰۵۰$) 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 Km و Vmax 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 تحقیقات روی خصوصیت اسید فسفاتاز و نقش آن در فیزیولوژی انگل میسر می‌باشد.

تشکر و 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.

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, Romeiro A, Attias M, De SW, et al. Platelet-activating factor modulates a secreted phosphatase activity of the trypanosomatid parasite Herpetomonas muscarum muscarum. Curr 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. [In 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, Foroumadi A. In vitro immunobiological studies of novel 5-(5-nitrofuran-2-yl)-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, Dilger E, 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].

Journal of Isfahan Medical School Received: 11.05.2014

Vol. 32, No. 259, 4th Week, September 2014 Accepted: 18.08.2014

The Effect of Medium in Properties and Activity of Acid Phosphatase (ACP) in the Infective Form of Leishmania Major Promastigotes

Amir Navabi MSc[1], Simindokht Soleimanifard PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: The wet cutaneus leishmaniasis caused by Leishmania major infection is one of the common skin diseases in many parts of the world. Reports indicate that some properties of Leishmania, such as time of infection, is affected of medium. Respecting the use of artificial medium in the majority of the studies on Leismania, and the role of acid phosphatase (ACP) in the pathogenesis of promastigotes, in this research, we studied the effects of medium in properties of acid phosphatase and time of infecting in Leishmania major promastigotes.

Methods: In this cross-sectional study, to culture promastigotes, Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) from previously infected Balb/c mice was transferred to NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) and RPMI1640 (Roswell Park memorial institute) medium. Growth curve was generated and stationary stages were divided. Frozen promastigotes of each medium were homogenized using sodium acetate and Triton-X-100 and acid phosphatase was measured via calorimetric assay.

Findings: Stationary parasites were collected in NNN and RPMI-1640 medium in seventh and fifth day, respectively. The rate of acid phosphatase activity was determined as 1.02±0.08 in NNN and 1.8 ± 0.01 in RPMI-1640. Also, Km (Michaelis–Menten) and Vmax (Maximum velocity) of this enzyme was 105.26 ± 1.11 µM and 98.37 ± 1.48 µM/min/mg protein in NNN and 106.39 ± 1.14 µM and 98.04 ± 0.96 µM/min/mg protein in RPMI1640.

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

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): 1166-74

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