

تأثیر قندهای مونوساکاریدی بر شدت بیماریزایی آکانتامبای جدا شده از بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبائی در محیط کشت سلولی

یحیی معروفی*، دکتر عبدالحسین دلیمی اصل**، دکتر فاطمه غفاری فر***، دکتر فریبا خوش زبان****
مهدی دلاوری*

دریافت: ۸۵/۲/۱۳، پذیرش: ۸۵/۸/۱

چکیده:

مقدمه و هدف: آکانتامبا آمیبی با زندگی آزاد است. که در آب، خاک، هوا و حتی بینی و حلق انسان یافت می شود. آکانتامبا در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و بیماران ایدزی می تواند باعث انسفالیت گرانولوماتوزی و در افراد استفاده کننده از لنز باعث ایجاد کراتیت شود. گونه های بیماریزای آکانتامبا دارای گیرنده های پروتئینی بنام MBP (Mannose binding protein) هستند که از طریق آنها به گلیکو پروتئین های حاوی مانوز در غشاء سلول های هدف می چسبند. اتصال آکانتامبا به سلول های هدف باعث تحریک ترشح پروتئین های می شود که اصلی ترین آنها پروتئینی بنام MIP-133 (Mannose induced protein 133) است. مانوز اگزوزن در شرایط *in vitro* اتصال آکانتامبا را مهار می کند ولی با تحریک ترشح MIP-133 بیماریزایی آکانتامبا را افزایش می دهد. هدف از این مطالعه تعیین تاثیر غلظت های مختلف قندهای مونوساکاریدی بر شدت بیماریزایی آکانتامبای جدا شده از بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبایی در محیط کشت سلولی هلا در زمان های مختلف می باشد.

روش کار: در این مطالعه که از نوع مطالعات تجربی است، ایزوله آکانتامبا در محیط کشت سلولی هلا کشت داده شد و قندهای گلوکز، مانوز و گالاکتوز با غلظت های نهایی ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ میلی مولار به پلیت ها افزوده شد. پلیت ها پس از گذشت ۸، ۱۶، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل در سلول با میکروسکوب معکوس بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که مانوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار بیشترین تاثیر را در افزایش اثرات سایتوپاتیک آکانتامبا دارد، همچنین گالاکتوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۳۲ ساعت از کشت اثرات سایتوپاتیک آکانتامبا را افزایش داد.

نتیجه نهایی: اضافه کردن قند های مانوز و گالاکتوز به محیط کشت سلولی هلا ی حاوی آکانتامبا بیماری زایی انگل را بصورت چشمگیر افزایش می دهد.

آکانتامبا / سلول هلا / شدت بیماریزایی / کراتیت / مونوساکاریدها

مقدمه:

تروفوزوئیت دیده می شود که دارای پاهای خاری شکل بنام آکانتوپودی (Acanthopodia) است و از باکتری ها تغذیه می کند، ولی در شرایط نامساعد به فرم کیستی در می آید و نسبت به عوامل شیمیایی، مواد ضد عفونی

آکانتامبا (Acanthamoeba) آمیبی است با زندگی آزاد که در خاک، آب، هوا، فاضلاب و حتی حلق و بینی افراد یافت می شود. در شرایط طبیعی انگل به فرم

* کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

** استاد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (dalimi4@yahoo.com)

*** استادیار گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

**** استادیار گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

پروتئازهای آمیب، اثرات سائیتوپاتیک CPE (Cytopathic effect) را در سلولهای اپیتلیال قرنیه تقویت می‌کند (۱۰، ۶). هدف از انجام این مطالعه تعیین تاثیر غلظت‌های مختلف قندهای مونوساکاریدی بر پاتوژنیسیته آکانتامبای جدا شده از بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبایی در محیط کشت سلولی هلا در زمانهای مختلف می‌باشد.

روش کار:

نمونه برداری از بیماران: در این مطالعه تجربی به کمک چشم پزشک برش‌هایی از قرنیه افراد مبتلا به کراتیت آکانتامبایی داده شد. نمونه‌ها در بافر Page's Saline به آزمایشگاه منتقل شدند. در این مطالعه از سه ایزوله بیماریزا استفاده شد.

کشت آکانتامبا: نمونه‌ها در محیط کشت آگار غیر مغذی NNA به همراه باکتری اشرشیا کلی، بعنوان منبع غذایی، کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس تعدادی از نمونه‌ها در محیط کشت اگزینیک P.Y.G (Glucose Yeast Peptone) کشت داده شدند. در کشت اگزینیک برای جدا کردن کیست‌های آکانتامبا، سطوح پلیت حاوی محیط NNA با استفاده از PBS شستشو داده شد. به منظور حذف سایر میکروارگانیسم‌های همراه آمیب، رسوب حاصل سه بار با اسید کلریدریک ۰.۳٪ شستشو داده شد. تعداد 10^4 کیست از هر ایزوله به فلاسک حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط اگزینیک افزوده شد و نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۱).

کشت سلول هلا: سلول هلا از موسسه پاستور ایران در تهرآن تهیه شد و در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) به همراه FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰٪ در فلاسک‌های جنس پلی استیرین (شرکت NUNC دانمارک) کشت داده شد. فلاسک‌های حاوی سلول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵٪ انکوبه شدند.

قندهای مونوساکاریدی: در این تحقیق از قندهای مانوز، گالاکتوز و گلوکز با غلظتهای نهایی ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۰/۱ میلی مولار استفاده شد.

اضافه کردن انگل و قند به سلول: سلول در پلیت‌های ۲۴ خانه ایی کشت داده شد و پس از آنکه تبدیل به مونولایر شد به هر کدام از چاهک‌ها یک میلی لیتر DMEM حاوی 10^4 انگل اضافه شد. سپس به هر چاهک بطور

کننده، عوامل فیزیکی، حرارت و خشکی، مقاوم است. ساختمان کیست از مدتها قبل اساس شناسایی و طبقه بندی گونه‌ها بوده است (۱).

تمام گونه‌های آکانتامبا در محیط کشت آگار غیر مغذی (N.N.A (Non-Nutrient Agar)، همراه یک باکتری مناسب مثل اشرشیا کلی (Escherhia coli) بعنوان منبع غذایی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد رشد می‌کنند. گونه‌های جدا شده از بیماران در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و بالاتر رشد می‌کنند (۲).

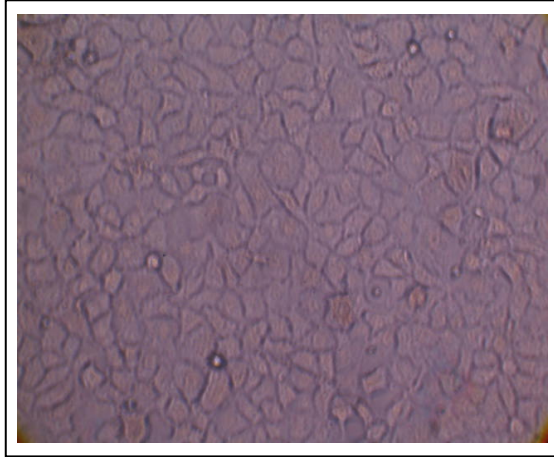
انسان دائما در معرض این انگل قرار دارد. راههای ورود انگل به داخل بدن متفاوت است؛ از راه پوست آسیب دیده که در تماس با انگل می‌باشد، یا از طریق مجاری تنفسی بصورت کیست موجود در هوا یا باد وارد بدن می‌شود و از طریق دستگاه گردش خون خود را به سیستم عصبی و اندام‌های دیگر میرساند. انگل دو نوع آلودگی می‌دهد: در افراد با نقص سیستم ایمنی و ایدزی، عامل گرانولوماتوز انسفالیت آمیبی (Granulomatose Amoebic Encephalitis) GAE است و نوع دیگر آلودگی کراتیت آمیبی است که ممکن است در افراد سالم بوجود آید. لنزهای تماسی اصلی ترین ریسک فاکتور در ایجاد کراتیت آمیبی است. علائم شامل؛ درد شدید چشم، ترس از نور و التهاب حلقوی شکل قرنیه است (۳).

اولین مرحله در بیماریزائی آکانتامبا چسبیدن به سطح سلول است. مطالعات نشان داده که در سطح انگل گیرنده‌هایی پروتئینی بنام (Mannose Binding Protein) MBP با وزن ۱۳۶ کیلو دالتون وجود دارد که به گلیکو پروتئین‌های حاوی مانوز (Mannose) در سطح سلولهای هدف متصل می‌شود (۷-۳).

همچنین مشاهده شده است که MBP در چسبندگی به سطوح اجسام نقش دارد. مانوز اگزوزن میزان چسبندگی انگل به سطح را کاهش می‌دهد (۸). MBP در بیماریزائی آکانتامبا نقش دارد و اتصال آن به مانوز باعث القاء ترشح پروتئینی با وزن ۱۳۳ کیلو دالتون در آکانتامبا می‌شود و آن را (Mannose-Induced Protein) MIP-133 می‌نامند. این پروتئین در محیط کشت باعث تخریب کلاژن I و IV انسان می‌شود (۹، ۱۰).

اضافه کردن مانوز به محیط کشت سلولی سلول‌های اپیتلیال قرنیه انسان باعث افزایش اثر سایتوتوکسیک آکانتامبا می‌شود (۱۰). مانوز از طریق افزایش ترشح

این حالت در هر سه ایزوله مشابه بوده است. پس از گذشت ۸ ساعت از کشت آکانتامبا در کشت سلولی هیچ پلاکی مشاهده نشد (تصویر ۱).



تصویر ۱: سلول هلا در محیط کشت و بدون انگل؛ سلولها کاملا چسبیده به هم هستند و هیچ پلاکی دیده نمی شود

جداگانه یک میلی لیتر از قندهای مانوز، گلوکز یا گالاکتوز با دو برابر غلظت قند افزوده شد تا غلظت نهایی ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ میلی مولار گردد. برای هر غلظت ۱۰ بار تکرار در نظر گرفته شد. تعداد ده چاهک نیز تنها حاوی سلول و انگل بودند که بعنوان کنترل در نظر گرفته شدند. بررسی پلیت ها: پلیت ها پس از گذشت زمانهای ۸، ۱۶، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ ساعت با میکروسکوب معکوس بررسی شدند. معیار بررسی CPE مشاهده پلاک در بین سلولهای مونولایر بوده است تعداد پلاک های هشت منطقه از هر چاهک بررسی و شمارش شد.

آنالیز داده ها: آنالیز داده ها با استفاده از روش من ویتنی یو برای مقایسه هر گروه با کنترل و روش آنوا یک طرفه برای مقایسه گروه ها با یکدیگر انجام شد.

نتایج:

میانگین و انحراف معیار تعداد پلاک های ایجاد شده در کشت سلولی هلا آلوده به آکانتامبا در مجاورت قندهای مونوساکاریدی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار تعداد پلاک های تشکیل شده بر حسب غلظت های مختلف قندهای مونوساکاریدی در محیط کشت سلولی هلا حاوی آکانتامبا پس از گذشت ۱۶، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ ساعت

زمان (ساعت)	غلظت (مینی مولار)				
	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار
مانوز					
۱۶	۰/۸۷ ± ۰/۸۳	۰/۸۷ ± ۰/۶۴	۱/۱۲۵ ± ۰/۸۳	۲ ± ۱/۱۹	۴/۳۷ ± ۲/۷۷
۳۲	۲/۰ ± ۰/۷۵	۲/۲۵ ± ۰/۷	۲/۶۲ ± ۱/۰۶	۳/۱۲ ± ۱/۶۴	۵/۰ ± ۰/۷۵
۴۸	۴/۰ ± ۰/۹۲	۴/۱۲ ± ۱/۲۴	۴/۷۵ ± ۲/۱۲	۶/۲۵ ± ۲/۲۵	۷/۵۰ ± ۱/۳
۷۲	۲۱/۷۵ ± ۲/۸۱	۲۴/۳۷ ± ۲/۵	۲۹/۷۵ ± ۱/۴۸	۳۵/۷۵ ± ۵/۳۱	۳۸/۵ ± ۲/۰۷
گلوکز					
۱۶	--	--	۱/۰ ± ۱/۰۶	۱/۰ ± ۱/۰۶	۱/۵ ± ۱/۴۱
۳۲	--	--	۱/۸۷ ± ۱/۲۴	۲/۰ ± ۰/۷۵	۲/۱۲ ± ۱/۷۲
۴۸	--	--	۴/۱۲ ± ۱/۸	۴/۲۵ ± ۱/۹	۴/۱۲ ± ۱/۶۴
۷۲	--	--	۲۰/۵ ± ۲/۹۷	۱۸/۷۵ ± ۲/۳۱	۱۸/۲۵ ± ۴/۷۷
گالاکتوز					
۱۶	--	--	۰/۸۷ ± ۰/۶۴	۱/۰ ± ۰/۹۲	۲/۰ ± ۱/۱۹
۳۲	--	--	۲/۳۵ ± ۱/۰۲	۲/۰ ± ۱/۰۶	۳/۷۵ ± ۱/۲۸
۴۸	--	--	۴/۱۲ ± ۱/۳	۴/۳۷ ± ۲/۱	۶/۰ ± ۲/۱
۷۲	--	--	۱۹/۲۵ ± ۲/۸۱	۱۹/۲۵ ± ۲/۰۵	۲۷/۷۵ ± ۲/۲۵
۱۶			۱/۵ ± ۰/۵۹		
۳۲			۲/۲۵ ± ۰/۴۱		کنترل
۴۸			۴/۲۵ ± ۰/۴۱		(بدون قند)
۷۲			۲۰ ± ۰/۹۲		

معنی دار بودند ($P < 0.05$) و در ساعت ۷۲ از کشت میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ و گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بودند ($P < 0.05$).

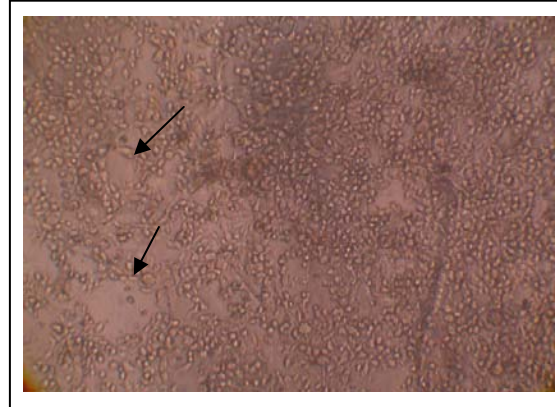
بحث:

در این مطالعه ملاک بیماری زا بودن آمیب این است که از قرنیه بیماران مبتلا به کراتیت آکانتامبائی جدا شده و در محیط های کشت سلولی قادر به ایجاد پلاک است. چسبندگی آکانتامبا به سلولهای میزبان، مرحله ای مهم و حیاتی برای بیماری زا بودن آمیب است. مطالعات نشان داده است که چسبندگی آمیب آنتامبا هیستولیتیکا از طریق گیرندهایی برای گلیکوپروتئینهای سطح غشاء سلولهای میزبان صورت می گیرد. همچنین مشخص شده که گالاکتوز مانع چسبندگی آنتامبا هیستولیتیکا می شود (۴). آکانتامبا پس از چسبیدن شروع به ترشح پروتازها می کند که باعث تخریب سلولهای هدف می شود. مهمترین این پروتازها پروتئینی بنام MIP-133 است که در شرایط آزمایشگاهی باعث تخریب کلژن I, IV می شود. چسبیدن آکانتامبا به گلیکوپروتئینهای سطح غشاء سلول های هدف باعث تحریک ترشح MIP-133 می شود و آن هم منجر به افزایش اثرات سایتوپاتیک انگل می شود. تمام مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته اثرات مانوز در افزایش شدت بیماریزائی آکانتامبا را در محیط های کشت سلولی مختلف، نشان می دهند (۱۰-۴). نتایج این مطالعه نیز موید همین مطلب است. بدین ترتیب که از بین قندهای مونوساکاریدی مانوز تاثیر قابل ملاحظه ای بر افزایش بیماریزائی آکانتامبا در سلولهای هلا داشته است. از طرفی میزان تاثیر مانوز به غلظت قند و زمان انکوباسیون بستگی داشته است بدین ترتیب که با افزایش غلظت و یا زمان انکوباسیون بیماری زایی انگل افزایش می یابد.

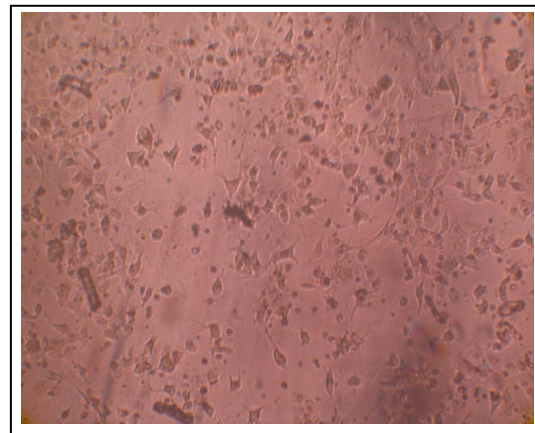
همچنین طبق نتایج این مطالعه گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار شدت بیماریزائی آکانتامبا را افزایش می دهد این افزایش در ساعت ۳۲ و ساعت های بعد از ۳۲ مشاهده شد. در هیچ مطالعه ایی اثر گالاکتوز در افزایش بیماریزائی آکانتامبا تاکنون گزارش نشده است.

ممکن است ملکولهای سطحی مختلفی در چسبیدن تروفوزوئیت های آکانتامبا به سلولهای اپیتلیال نقش داشته باشند. در این مطالعه از سلول هلا استفاده شد.

ولی با گذشت زمان بیشتر بتدریج پلاک ها ظاهر و تعداد آنها افزایش یافت (تصویر ۲) بنحوی که بیشترین تعداد پلاک در چاهکهای حاوی مانوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۷۲ ساعت بوده است (تصویر ۳).



تصویر ۲: چاهک حاوی گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۳۲ ساعت از کشت آکانتامبا در سلول هلا؛ پلاکها با پیکان نشان داده شده اند.



تصویر ۳: چاهک حاوی مانوز ۱۰۰ میلی مولار پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت آکانتامبا در سلول هلا؛ تخریب گسترده سلولها مشاهده می شود.

بررسی پلیت ها پس از گذشت ۱۶ ساعت نشان داد که تنها میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با کنترل دارای اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$). پس از گذشت ۳۲ ساعت از کشت انگل میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز و گالاکتوز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بودند ($P < 0.05$). در ساعت ۴۸ میانگین پلاک تشکیل شده در چاهک های حاوی مانوز ۱۰۰، ۵۰ و گالاکتوز ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف

- 39(4): 681-685.
3. Martinz AJ. Free-living Amoeba: natural history, prevention, diagnosis, pathology, and treatment of disease. Florida : CRC Press, Boca Raton, 1985: 156.
 4. Khan N. A. Role of mannose binding protein in the pathogenesis of *Acanthamoeba*. J Euk Microbiol 2002; 50: 8-10.
 5. Kennett MJ, Hook RR, Craig Jr, Franklin L, Riley LK. *Acanthamoeba castellanii*: characterization of adhesion molecule. Exp Parasitol 1999; 92:161-169.
 6. Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanism of *Acanthamoeba*. J Biol Chem 1998; 273, 15838-15845.
 7. Allen PH, Dawidowicz E. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: a mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. J Cell Physiol 1990;145(3):508-513.
 8. Bouyer SI, Merlaud A, Imbert C, Danialt G, Rodier MH. A mannose binding protein is involved in the adherence of *Acanthamoeba* species to inert surfaces. Microbial. Letter. 2004; 238: 207-211
 9. Hurt M, Neelam S, Niederkorn J, Alizadeh H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. J Infect Immun 2003;71(11):6243-6255.
 10. Leher H, Silvany R, Alizadeh H, Huang J, Niederkorn JY. Mannose induced the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. Infect Immun 1998; 66:5-10.
 11. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4th ed. Washington D.C: ASM, 2001:850-872.

سلول هلا سلولی انسانی است و می توان نتایج حاصل از آن را تا حدودی به سایر سلول های انسان تعمیم داد. شناسائی مکانیسم های دخیل در چسبندگی آکانتامبا به سلول ها و تعیین اهمیت آن می تواند به شناخت بیماری زائی آکانتامبا و درمان آن کمک کند. البته برای شناسائی ملکول های سطحی دخیل در چسبندگی نیاز به مطالعات بیشتری هست لذا پیشنهاد می شود که تاثیر فندهای دیگر با غلظت های مختلف و در محیط کشت های مختلف سلولی، بر شدت بیماریزائی آکانتامبا نیز تحت مطالعه قرار گیرد.

نتیجه نهایی:

بطور کلی از این مطالعه می توان چنین نتیجه گرفت که اضافه کردن قند های مانوز و گالاکتوز به محیط کشت سلولی هلائی حاوی آکانتامبا بیماری زایی انگل را بصورت چشمگیر افزایش می دهد. این نتیجه در ارزیابی های بالینی بیماری های ناشی از آکانتامبا نیز می تواند مورد توجه قرار گیرد.

منابع:

1. Shuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. J Parasitol 2004; 34 1001-1027.
2. Jonckheere J. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. Appl Environ Microbiol 1980;