

مقایسه سه نوع کشت سلولی برای تکثیر و نگهداری توکسوپلازما

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: توکسوپلازما 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 توکسوپلازما گوندی مناسبتر از دو نوع کشت دیگر است. (مجله طبیب شرق، سال ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۳، ص ۱۰۵ تا ۱۱۳)

کل واژه ها: توکسوپلازما گوندی، کشت سلولی، تولید DNA، بیولوژی سلولی مولکولی، *HFF*، *HEL*، *MRC5*

مقدمه

ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (*IFA*)، مشخص گردید که به طور متوسط ۵۱/۸ درصد افراد دارای سرم مثبت در مقابل آنتی ژن توکسوپلازما بودند.^(۲) عفونت توکسوپلازما 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 کشنده ای 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

در سال ۱۹۷۳، *Kean* تخمین زد که حدود یک سوم مردم جهان در سرم خون خود دارای آنتی بادی ضد توکسوپلازما گوندی هستند، بدین معنی که با انگل توکسوپلازما آلوده شده اند.^(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

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

در افراد دارای سیستم ایمنی کارآمد بیشتر آلودگی های توکسوپلازما 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. *Remington* و *Luft* 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 توکسوپلازما 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 آویرولانته (*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.^(۵) کشت سلولی توکسوپلازما از سالها پیش مورد استفاده قرار گرفته است^(۶-۱۱) 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 توکسوپلازما 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 آویرولانته توکسوپلازما به سادگی استرینهای ویرولانته (*virulent*) که بیشتر به فرم تاکی زوئیت است و به خوبی رشد و تکثیر می نماید، نیست. مقایسه کمی رشد و تکثیر استرینهای مختلف توکسوپلازما در بین رده های مختلف سلولی انجام گردیده است^(۱۷-۲۲)، با این وجود کارآیی رده های سلولی مختلف برای تولید زوئیتهای استرینهای آویرولانته مورد مقایسه قرار نگرفته است. به منظور انتخاب کشت سلولی مناسب برای کشت مداوم توکسوپلازما و تولید *DNA*، سه نوع مختلف سلول فیروبلاست 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 فرانس توکسوپلازما 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) در فلاسکهای متوسط با سطح 75 cm^2 با استفاده از محیط

حاوی انگل نیز پاره شده و زوئیت‌های 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 زوئیت‌ها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (*phase contrast*) محاسبه گردید. برای خالص سازی زوئیت‌ها 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 ۱ ml ماده لیز کننده حاوی ۷/۵ میلی مولار *Tris-HCl*، ۷/۵ میلی مولار *EDTA*، ۱ درصد *SDS*، 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* (pH ۸) حل گردید. غلظت *DNA* پس از ۲ روز با اندازه گیری *O.D* در

کشت *MEM* و مکمل های گلوتامین، اسید آمینه های غیر ضروری، پنی سیلین - استرپتومایسین، بی کربنات سدیم و سرم غیر فعال گوساله (*FBS*) در ۳۷°C کشت داده شدند. پس از رشد سلول‌ها و پوشش کامل سطح کشت فلاسک‌ها از سلول‌های فیروبلاست، هر فلاسک ۷۵ cm² به ۱۰ فلاسک کوچک ۱×۱۰^۶ cm² پاساژ داده شده (در هر فلاسک کوچک ۱×۱۰^۶ سلول کاشته شد) و فلاسک‌ها مجدداً در ۳۷°C 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 ۱×۱۰^۵ 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 ۳۷°C محیط *MEM* مجدداً با محیط تازه تعویض گردید. فلاسک‌های آلوده روزانه مستقیماً 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 (میکروپروسور ۸۵۲/N، سنگاپور) توسط سرنگ از سر سوزن‌های نازک (۲۷g) عبور داده شدند تا سلول‌های لیز نشده

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 ($P < 0/05$). 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 (جدول 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 ($P < 0/05$). 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 ($P < 0/05$). در مجموع استرین *Beverley* نسبت به استرین *RH* تعداد انگل کمتری تولید نمود ($P < 0/05$). 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* معمولاً 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* توکسوپلازما گوندی در سه نوع کشت سلولی مختلف

<i>P value</i>	<i>HFF</i>	<i>MRC5</i>	<i>HEL</i>	نوع سلول (فلاسک = ۵)
$=0/001$ <i>P</i>	۵	۴	۴	میانگین زمان حداکثر لیز سلولی در فلاسکها (روز)
$=0/966$ <i>P</i>	$\times 10^7$ ۲/۴۵	$\times 10^7$ ۲/۴۵	$\times 10^7$ ۲/۴۷	متوسط تعداد تاکی زوئیت حاصل از فلاسکها
$=0/001$ <i>P</i>	۹۶/۰۰%	۹۲/۲۶%	۹۰%	متوسط میزان زنده بودن تاکی زوئیتها بدست آمده
$=0/001$ <i>P</i>	۷/۰۵	۶/۴۹	۶/۴۰	متوسط <i>pH</i> محیط کشت فلاسکها
$=0/036$ <i>P</i>	۱/۴%	۲/۷%	۳/۰%	میزان ناخالصی تاکی زوئیتها (متوسط تعداد سلولهای میزبان)

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

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

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

تعداد تاکی زوئیتها			شماره فلاسک
جمع	دومین برداشت (روز سیزدهم)	اولین برداشت (روز دهم)	
× ۱۰ ^۷ ۲/۰۵	۱/۳۰ × ۱۰ ^۷	۰/۷۵ × ۱۰ ^۷	۱
× ۱۰ ^۷ ۱/۹۵	۱/۰۰ × ۱۰ ^۷	۰/۹۵ × ۱۰ ^۷	۲
× ۱۰ ^۷ ۲/۰۰	۱/۱۵ × ۱۰ ^۷	۰/۸۵ × ۱۰ ^۷	۳
× ۱۰ ^۷ ۲/۲۵	۱/۲۰ × ۱۰ ^۷	۱/۰۵ × ۱۰ ^۷	۴
× ۱۰ ^۷ ۲/۰۶	۱/۱۶ × ۱۰ ^۷	۰/۹۰ × ۱۰ ^۷	میانگین

همچنین هیچ یک از انواع سلولها و یا روشهای کشت سلولی

به تنهایی برای همه اهداف مطالعه *in vitro* توکسوپلازما 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 سویه های *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

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 می باشد. تعداد متعددی از انواع رده های سلولی برای کشت انگل توکسوپلازما 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.

مطالعات فیزیولوژیک انگل مناسب
نبود. (۲۵) *Hugh* و همکاران در

درجه خلوص نسبتاً بالایی گردید که برای استفاده در روشهای بیولوژی مولکولی که نیاز به DNA خالص دارد مثل روش RAPD-PCR^۱ 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 (در HFF پایداریتر 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° 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

مطالعاتی یافتند که سلول *Hep2* نامناسب بود در حالیکه سلول *AGMPK* (*African green monkey primary kidney*) 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 توکسوپلازما 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 توکسوپلازما 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 $pH = 6$ ، 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 ۱ درصد بود که سبب حصول DNA با

^۱- *Random Amplified Polymorphic DNA*

سپاسگزاری

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

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.

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, Overdulse 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 Azitromycine, Spiromycine, or Clindamycine. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:31-7.
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. Parasitocidal 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.

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.

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 zoonotic 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 $\mu\text{gr}/\text{flask}$ for the RH strain and 20 to 25 $\mu\text{gr}/\text{flask}$ 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.