دراسة تاثير استخدام اوساط محورة والفيتامينات كمحفزات لنمو طفيلي اللشمانيا الاحشائية *Leishmania donovani*

عذراء عبدالأمير عزيزالحلفي

قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة البصرة

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية استخدام اوساط محورة عن وسط Novy-MacNeal-Nicolle (N.N.N Medium) من خلال تغيير نسب سكر الكلوكوزوالفركتوزواضافة بعض محفزات النمو (فيتامين A وE) لزيادة سرعة نمو الطور المسوط لطفيلي اللشمانيا الاحشائية *Leishmania donovani*

اثبتت الدراسة ان سكر الفركتوز ذات فعالية عالية في زيادة اعداد الطور المسوط خارج الجسم الحي والتي بلغت اقصاها في اليوم الرابع مقارنة مع سكر الكلوكوز التي كانت فعاليته اقل عدداً .

وعند دراسة تاثير فيتامينات E و A كمحفزات للنمو ،لوحظ ان فيتامين E كان اكثر تاثيراً في زيادة اعداد الطفيلي بالمقارنة مع العينات المعاملة بفيتامين A والتي كانت اقل عدداً .

المقدمة

يعد طفيلي *Leishmania donovani* من الطفيليات الخطرة المنتشرة في العراق ولاسيما على الاطفال لما يمتاز به هذا الطفيلي من أعراض مرضية قد تختلط مع أعراض العديد من الأمراض البكتيرية والفيروسية الشائعة (Polonio and Efferth,2008)

ينتج عن الإصابة بالطفيلين *L. donovani* و *L. infantum* مرض الحمى السوداء Kala azar و أن الأخير أكثر انتشاراً في الأطفال وحديثي الولادة (Abreu-silva *et al*., 2004) .

يوجد الطفيلي بشكلين الشكل امامي السوط Promastigote والذي يوجد داخل الحشرة الناقلة وهي نوع من أنواع ذبابة الرمل *Phlebotomus longipe*.

أما الطور الأخر فيكون داخل خلوي غير متحرك Amastigote بيضوي يحتوي على سوط أثري (Talaro and Talaro , 1999) .

تعد حشرة ذبابة الرمل المضيف الناقل المناسب للطفيلي . وشخص حبيب (2006) ثلاثة انواع منها *Phelobatomus alexandri* و *P . papitasi* و *P. sergenti* واقترح انها قد تكون نواقل للمرض .

تحتاج تربية الطفيلي عملية اعادة زراعة الطفيلي اسبوعيا" مما يعرضها الى التلوث كما ان استزراعها مرات عدة قد يؤدي الى فقدان ضراوتها وهذا تطلب تحضير اوساط جديده طويلة الامد .

استعمل Muniaraj *et al.* (2006) وسط Blood agar في تربية الطفيلي وحفظه بدرجة حراره 7-8 درجة مئوية ولاحظ ان طفيلي *Leishmania donovani* قد احتفظ بحيويته لمدة 6-7 أشهر و يموت بعد مرور سنه من حفظه. استعمل(Muniaraj *et al.* (2007 حليب البقر والجاموس والماعز في عزل وتنمية طفيلي اللشمانيا الاحشائية *L.donovani* وجد ان الوسط الجديد اكثر فعاليه في عزل وتنمية الطفيلي لمده طويلة اختبرت Emi *et al.*(1997) وسط جديد مكون من :

Yeast Nacl ,0.8 gm ; Peptone,1.00 gm; Na2HPO4,0.75gm; extract, 0.25gmاذيبت المواد اعلاه بـ 100 مل ماء مقطر ولاحظت ان الوسط مفيد في انتاج إعداد كبيره من الطفيلي لفتره لاتتجاوز ثمانية ايام الا انها استعملت وسط NNN-Medium في عزل طفيلي اللشمانيا الاحشائية من المرضى واكدت باته من الاوساط الاساسه في عزل الطفيلي .

تعد الاوساط Medium 199 و Medium RPM I1640 و Drosophila Schneiders Medium من الأوساط المهمة في إنتاج إعداد كبيره من الطفيلي الا ان عيوب هذه الأوساط أنها باهضة الثمن وفترة صلاحيتها قصيرة (Darling *et al.*, 1989) لذا اقتضت الحاجة الى تحضير وسط جديد قليل الكلفة وطويل الامد وذي مكونات من السهل الحصول عليها.

اشار الطعمة(2011) الى ان محلول الدكستروليت هو من المحاليل المهمة في زرع طفيلي اللشمانيا لمدة تصل الى 7اشهر ونتيجة الى ان محلول الدكستروليت يحتوي على نسب عالية من الكلوكوز توجهت الدراسة الحالية الى تحديد اهمية زيادة الكلوكوزواستبداله بسكريات اخرى وخفض نسبة ملح كلوريد الصوديوم في زيادة مدة بقاء الطفيلي ،ونظراً لان الطفيلي يفقد ضراوته بتكرار الاستزراع وهذا يتطلب التوصل الى وسط جديد يمكن به استزراع الطفيلي دون ان يفقد ضراوته لذا اختبرت الدراسة الحالية استخدام مواد اضافية كمعززات نمو مثل الفيتامينات لامكانية تنشيط اللشمانيا ويكون تقدير الاستجابة بالعدد والحركة.

المواد و طرائق العمل

زرع طفيلي الشمانيا الاحشائية الطور امامي السوط Promastigote الذي تم الحصول عليه من مركز اللشمانيا التابع لجامعة النهرين على وسط NNN- Mediumنسبة الى Novy-MacNeal-Nicolle ثنائي الطور .

استخدام سكر الكلوكوز

يتكون الطور الصلب من المواد التالية :(Kang and Norman (1970)

Brain heart infusion broth	33.3 غراماً
Glucose	8 غراماً
Agar	16 غراماً

اذيبت المواد اعلاه في 850 مل من الماء المقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى 4 . 7 عقم المحلولان باستعمال المؤصدة autoclave ثم اضيف 50 مايكرو غراماً من المضاد الحيوي Gentamycin ،صب الوسط الصلب بقناني ذات غطاء خاصة للمزارع الماتله بعد اضافة 150 مل من دم الانسان قبل ان يتصلب الوسط تركت القناني بوضع مائل لحين التصلب.

يتكون الطور السائل Lock الاساسي من :.(Merdith *et al.* (1995)

Nacl	9 غراماً
Kcl	0.1 غراماً
Cacl 2	0.2 غراماً
NaH Co3	0.2 غراماً
Glucose	2.5 غراماً

اذيبت المواد أعلاه بـ1 لتر ماء مقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى 7.2 (يعتبر هذا الوسط السائل كمجموعة سيطرة)

وحور الوسط السائل(محلول Lock) مرات عديدة مع رفع نسبة الكلوكوز وخفض نسبة ملح كلوريد الصوديوم حيث يتضمن :

وسط السائل المحور الاول Nacl - 3 غراماً و Glucose – 5 غراماً
وسط السائل المحور الثاني Nacl - 2 غراماً و Glucose – 7.5 غراماً
وسط السائل المحور الثالث Nacl - 1 غراماً و Glucose – 10 غراماً

اضيفت فيتامينات E و A كعوامل منشطة الى محلول لوك الاساسي كلاً على حده بنسبة 0.1 ملغم/كغم.
قسمت قناني الجزء الصلب الى ستة مجاميع كل مجموعة تحتوي على اربعة قناني ،
اضيف 1 مل من محلول Lock الاساسي الذي يعتبر مجموعة سيطرة لكل قنينة من الجزء الصلب بالمجموعة(1)، واضيف 1مل من محلول Lock المحور الاول لكل قنينة من الجزء الصلب بالمجموعة (2) كما اضيف 1مل من محلولLock المحور الثاني لكل قنينة من الجزء الصلب بالمجموعة (3) ،ثم اضيف 1مل من محلولLock المحور الثالث لكل قنينة من الجزء الصلب بالمجموعة (4).و اضيف 1مل من محلول Lockالمضاف بالفيتامين A لكل قنينة من الجزء الصلب بالمجموعة (5) ، و اضيف 1مل من محلول Lockالمضاف بالفيتامين E لكل قنينة من الجزء الصلب بالمجموعة (6) وبعد عدة ساعات نقل الطفيلي لكل قنينة تحتوي على الاوساط بالمجاميع الستة،ثم حضنت الأوساط بدرجة 26°م ± 2°، و بعد مرور 5 ايام أخذت قطرة من الطور السائل للوسط لكل قنينة بالمجاميع الستة ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وغطيت بغطاء الشريحة كلاً على حده وفحصت باستعمال مجهر ضوئي اعتيادي للتحري عن وجود الطفيلي ، وتم حساب اعداد الطفيلي يومياً لمدة اربعة ايام.
اعيد تحضير اوساط جديدة باستبدال سكر الكلوكوز بسكر الفركتوز وبنفس النسب المبينه اعلاه.وحللت النتائج باستخدام جدول تحليل التباين ANOVA (الراوي وخلف الله و1980)

النتائج

اختبار تاثير زيادة نسبة الكلوكوز وخفض نسبة كلوريد الصوديوم على اعداد وحيوية الطفيلي

اثبتت نتائج الدراسة الحالية وعند مستوى احتمال للتحليل الاحصائي ($P<0.05$) ان لزيادة كمية الكلوكوز دور في بقاء مزارع طفيلي اللشمانيا مدة اكثر واعداد اكبرمقارنة بمجموعة السيطرة.جدول (1)

جدول (1) معدلات اعداد الطورامامي السوط Promastigote الحية على وسط ثنائي الطور باستخدام مصدر كاربوني (كلوكوز)

نوع الوسط	معدلات اعداد الطفيلي بملم³			
	اليوم الاول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع
Lock المحور الاول	4525	8225	13775	16350
Lock المحور الثاني	5475	10725	20075	24425
Lock المحور الثالث	7750	19750	25250	31800
Lock الاساسي غير المحور كمجموعة سيطرة	3175	4475	9225	10300

ملاحظة:كل قيمة هي معدل لاربعة مكررات
L.s.d. للايام = 608.4
L.s.d. للتراكيز = 608.4
L.s.d. للايام * التراكيز= 1216.7

اختبار تاثير اضافة الفيتامينات كمعززات نمو على اعداد وحيوية الطفيلي

اثبتت نتائج الدراسة الحالية وعند مستوى احتمال للتحليل الاحصائي ($P<0.05$) ان فيتامين E سبب زيادة في اعداد الطفيلي و حيويته المتمثلة بسرعة الحركة مقارنة مع فيتامين A ومجموعة السيطرة .جدول (2)

جدول (2) معدلات حيوية اعداد الطورامامي السوط Promastigote على وسط ثنائي الطور باستخدام الكلوكوزواضافة الفيتامينات

الفيتامين	معدلات اعداد الطفيلي بالملم^3			
	اليوم الاول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع
A	7800	7025	13325	19150
E	15925	24900	26925	27750
Lock الاساسي غير المحور كمجموعة سيطرة	3175	4475	9225	10300

ملاحظة:كل قيمة هي معدل لاربعة مكررات

L.s.d. للايام = 940.1

L.s.d. للتراكيز = 814.2

L.s.d. للايام * التراكيز= 1628.3

اختبار تاثير زيادة نسبة الفركتوز وخفض نسبة كلوريد الصوديوم على اعداد وحيوية الطفيلي

اثبتت نتائج الدراسة الحالية وعند مستوى احتمال للتحليل الاحصائي ($P<0.05$) ان لزيادة كمية الفركتوز تاثيراً في زيادة اعداد الطفيلي وحيويته وبلغت اقصاها في اليوم الرابع والتي كانت بدورها اعلى من السيطرة.جدول (3)

جدول (3) معدلات اعداد الطورامامي السوط Promastigote الحية على وسط ثنائي الطور باستخدام مصدر كاربوني(فركتوز)

نوع الوسط	معدلات اعداد الطفيلي بالملم^3			
	اليوم الاول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع
Lock المحور الاول	7475	13150	8625	28825
Lock المحور الثاني	9400	26750	23600	40125
Lock المحور الثالث	14325	32025	54950	70500
Lock الاساسي غير المحور كمجموعة سيطرة	4625	5475	7750	14675

ملاحظة:كل قيمة هي معدل لاربعة مكررات

L.s.d. للايام = 1322.8

L.s.d. للتراكيز = 1322.8

L.s.d. للايام * التراكيز= 2645.6

اختبار تاثير اضافة الفيتامينات كمعززات نمو على اعداد وحيوية الطفيلي

اثبتت نتائج الدراسة الحالية وعند مستوى احتمال للتحليل الاحصائي ($P<0.05$) ان لفيتامين E تاثيراً في زيادة اعداد الطفيلي و حيويته مقارنة مع فيتامين A ومجموعة السيطرة .جدول (4)

جدول (4) معدلات اعداد الطور المسوط Promastigote الحية على وسط ثناني الطور باستخدام الفركتوز واضافة الفيتامينات

الفيتامين	معدلات اعداد الطفيلي بالملم^3			
	اليوم الاول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع
A	12850	16025	14000	24750
E	35475	31650	39525	52800
Lock الاساسي غير المحور كمجموعة سيطرة	4625	5475	7750	14675

ملاحظة:كل قيمة هي معدل لاربعة مكررات

L.s.d. للايام = 1609.8

L.s.d. للتراكيز = 1394.1

L.s.d. للايام * التراكيز= 2788.3

المناقشة

اظهرت الدراسة الحالية ان للكلوكوز دور مهم في بقاء الطفيلي وتكاثره على خلاف كلوريد الصوديوم والذي لم يبدي خفض كميته أي تاثير على نمو وبقاء الطفيلي اذ بلغت اقصاها في اليوم الرابع (31800،24425،16350) على التوالي لثلاث تراكيز.

فقد اشارت العديد من البحوث الى اهمية الكلوكوز كمصدر رئيسي للطاقة في جميع الكائنات الحية وهو اكثر سكر يتواجد في داخل خلايا الانسان والكائنات الاخرى (Naula *et al*,2010)

كذلك الحال مع سكر الفركتوز اذ اظهرت الدراسة ان استخدام سكر الفركتوز له دور مهم في زيادة اعداد الطفيلي وحيويته وبلغت اقصاها في اليوم الرابع (28825، 40125 ، 70500) على التوالي لثلاث تراكيز. وقد يستفيد الطفيلي من سكريات اخرى فقداشار(Maugeri *et al*2003) الى ان الطفيلي يتعرض في دورة حياته داخل امعاء الحشرة الى انواع مختلفة من سكريات متعددة تعتمد على تغذية الحشرة الناقلة وفي غياب سكر الكلوكوز يلجا الطفيلي للاستفادة بسكريات اخرى منها الفركتوز والرايبوز.

ويمكن تفسير زيادة اعداد الطفيلي في الوسط الحاوي على الفركتوزالى التكيف الوراثي للطفيلي في المعيشة في اجواء تحتوي على نسب عالية من سكر الفركتوز بالاعتماد على طبيعة تغذية الحشرة.كما اشار(2007 Rosenzweig *et al*) ان الغذاء الاساسي للحشرة هو الفركتوز.

توفر الاوساط الزرعية المواد الاساسية الضرورية لنمو وتكاثر الطفيلي فيها ففي الاوساط الصلبة يعد الدم مصدر رئيسي للبروتين بينما في الاوساط السائلة يعد مصل اجنة الابقار المصدر الاساسي للبروتين ويستخدم هذا النوع من الاوساط لجمع وتنقية الطفيلي في الدراسات المختلفة (Emi etal.,1997) .

استخدم وسط N.N.N.Medium المحور المضاف اليه محلول Dextrolyte ووجد ان الوسط الجديد ادى الى ادامة بقاء الطفيلي لمدة 4 اشهر بدون تجديد المزرعة وعلل ذلك الى المحتوى العالي من الكلوكوز. (الطعمة ،2011)

وبينت الدراسة زيادة اعداد الطفيلي خارج الجسم الحي عند تنميته في وسط يحتوي على الفيتامينات وقد يعود سبب ذلك كون الفيتامينات تعمل كأنزيمات منشطة coenzyme تساعد في زيادة سرعة التفاعلات الحيوية للطفيلي مما يؤدي الى زيادة اعداده.(Leonardi *et al*,2005).

كما ظهر من خلال الدراسة الحالية ان لفيتامين E تاثير ايجابي في الاسراع في نمو الطفيلي بشكل كبير بالمقارنة بالعينات المعاملة بفيتامين A والذي كان اكبر من عينات السيطرة وقد يعود السبب لكون فيتامين E كثير التواجد بالجلد الذي يعد مدخل الطفيلي للجسم.

المصادر العربية

- **الطعمه, مسلم عبد الرحمن (2011).** دراسه تاثير هرمون Testosterone على الاصابة بالطفيليات *Fasciola hepatica* و *Echinococcus granulosus* و *Leishmania donovani* في الحيوانات المختبرية وفي الزجاج .اطروحة دكتوراه / كلية العلوم / جامعة البصرة ، 106 صفحة.
- **الراوي,خاشع محمود و خلف الله ,عبد العزيز محمد.(1980)** .تصميم وتحليل التجارب الزراعية.دار الكتب للطباعة والنشر.جامعة الموصل.رقم الايداع في المكتبة الوطنية في بغداد (21):488 صفحة
- **حبيب ، مفيد عبد اللطيف (2006).** تصنيف وبيئة حشرة ذبابة الرمل الفاصد sand fly (Diptera : Psycholidae "Phlebotomiae") في محافظة البصرة / جنوب العراق . اطروحة دكتوراه / كلية العلوم / جامعة البصرة , 183 صفحة .

المصادر الاجنبية

Abreu-Silva, A. L.; Calabrese, K. S.; Cupolilo, S. M. N.; Cardoso, F. O.; Souza, C. S. and Dacosta, S. C. G. (2004) . Histopathological studies of visceralized *leishmnia* (*leishmania*) in mice experimentally infected. Vet. Parasitol. ,121:179-187.

Darling, T. N.; D. G. Davis, R. E. L. and J. J. Blum. (1989). CO2 abolishesthe reverse Pasteur effect in *L. major* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol., 33:191–202.

Emi N. M., Cu N. B.L., Kor Y.,Yusuf O. Z., and Ahmet O. Z. (1997) . A New Experimental *In Vitro* Culture Medium for Cultivation of *Leishmania* Species . J. Clin. Micro Crobi.,.35.2430-2431

Lang, I. G. and Norman, L. (1970). Manual of clinical microbiology. Am. Soc. Microbiol., Washington, USA.

Leonardi,R.; Zhang,Y.;Rock,C. and Jackowski,S.(2005). Coenzyme A :Back in action . progress in lipid Research.44:125-153.

- **Maugeri,D.A.; Cazzulo,J.J.; Burchmore,R.J.; Barrett,M.P. Ogbunude,P.O.(2003).**Nutrition transport and pathogenesis protozoa.Mol.Biochem.parasitol.130:117-125.
- **Meredith, S. E. ; Kroon, N. ; Sondorp, E. ; Seaman, J. ; Goris, M. ; Ingen, C.;Oosting, H. a Schoon, G. (1995).** Leish- KIT, a stable direct agglutination test based on freeze dried antigen f serodiagnosis of visceral leishmaniasis . J. Cli. Microbiol., 33: 1742- 1745.
- **Muniaraj, M.; Gupta, A.K.; Narayan , S.; Singh D .; Sinha, P,K .; Kishor K. D. P. and Bhattacharya S.K. (2006).** Preservation of *Leishmania donovan* promastigote in blood agar slants. J. Commun. Dis., 37:191-5
- **Muniaraj,M.; Lal, C. S; Kumar, S.;Sinha, P. K. and Das P. (2007)** .Milk o Cow (*Bos taurus*), Buffalo (*Bubalus bubalis*), and Goat (Capra hircus): a Bette Alternative than Fetal Bovine Serum in Media for Primary Isolation, In Vitro Cultivation, and Maintenance of *Leishmania donovani* Promastigotes. J. Clin. Microbiol., 45(4): 1353-1356.
- **Naula,C.M. ;Logan,F.M.;Wong,P.E.Barrett,M.P. and Burchmore,R.J.(2010)** .Aglucose transporter can mediate ribose uptake definition of residues that confer substrate specificity in a sugar transporter.J.of Bio.Chem.285:29721-29728.
- **Rrsenzweig,D.;Smith,D.;Opperdoes,F.;Stern,S.;Olafson,R.W. and Zilberstein,D.(2007).**Retooling *Leishmania* metabolism:from sand fly gut to human macrophage.J.FASEB.22(2):590-602.
- **Talaro, Kathleen Park and Talaro, Arthur (1999).** Foundations in Microbiology. 3rd ed. 873 pp .
- **Polonio,T. and Efferth, T. (2008).** Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (review). Int. J. Mol. Med., 22: 277-286.

Studying effecte of using culture media and vitamins as stimulater growth for *Leishmania donovani*

Athraa Abd-Al Ameer Aziz Al-Hilfy

Basrah University-College of science –Biology department .

Summary

During this study using modify culture media about Novy- MacNeal-Niccolle (N.N.N.Medium) by chang percentage of glucose and fructose also add some stimulated growth (vitamine A and B) increase promastigote phase of *Leishmania donovani*

The resulte showed fructose was more activity in increase number of promastigote invitro which reach maximium number in fourth day compared with glucose which lease activity and number of promastigote in the same period time

While during studing effect of vitamin A and E as stimulated growth obserived the vitamin A was more effect increase of parasite number compared with samples which treatment by vitamin A .