Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
سال ۲۸، شماره ۴، صفحات ۳۰۷ تا ۳۱۴ (زمستان ۸۳)

Original Article

تأثیر گلیکاسیون محیط کشت بر عملکرد فاگوسیتیک و انفجار تنفسی ماکروفاژهای پریتونئال موش Balb/C

دکتر نریمان مصفا*، دکتر ساناز جوادی، سودابه طاهری** ***

* گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
** پزشک عمومی
*** گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *افزایش غلظت قندها، چه در داخل بدن و فضای پلاسمای و چه در محیطهای کشت سلولی در آزمایشگاه می تواند تاثیرات مخربی در فرآیند حیات و عملکرد سلولها داشته باشد. در دیابت و گالاکتوزمیا، این اختلال، منجر به توقف اعمال دفاعی سیستم ایمنی بدن گردیده و ابتلاء به عفونتهای مختلف، از جمه نتایج زیان بار آن می باشد. هدف از انجام این تحقیق، مطالعه اثرات غلظت افزایش یافته گلوکز و گالاکتوز در محیط کشت سلولی است.*

مواد و روشها : *این پژوهش بصورت تجربی انجام گرفت. از ماکروفاژهای پریتونئال موش خالص نژاد Balb/c (۶-۴) هفتگی استفاده شد. سلولها در شرایط مختلف حضور غلظتهای افزایش یافته گلوکز و گالاکتوز، (۵ میلی مولار الی ۳۰ میلی مولار) به تنهایی یا هر دو قرار گرفتند. از محیط کامل کشت سلول برای ادامه حیات سلولها استفاده گردید. گروه کنترل فاقد هرگونه قند در محیط کشت بود. از محرکهای سیستم ماکروفاژی منجمله PMA و FmlP و LPS استفاده گردید. فعالیت اکسیداتیو و انفجار تنفسی سلولها توسط آزمون NBT مورد ارزیابی قرار گرفت. با شمارش تعداد باکتری بلع شده در سلولها و همچنین درصد سلولهائی که باکتری را بلع نمودند میزان فعالیت فاگوستیک تعیین گردید. قدرت کشندگی فاگوسیتها توسط تعیین تعداد باکتریها در محیط کشت به دو روش لوله های مک فارلند و همچنین کلنی کانت، محاسبه و مقایسه شد.*

یافته ها: *سلولهای تحت کشت در حضور مقادیر ۱۵ و ۳۰ میلی مولار گالاکتوز در مقایسه با سایر شرایط و نیز گروه کنترل کاهش چسبندگی و مورفوژنز فاگوسیتیک را نشان دادند. این تغییرات کاملاً معنی دار بود. همچنین فاگوسیتها در محیط کشت همراه با غلظتهای ۳۰ میلی مولار از حیث میانگین تعداد باکتریهای بلع شده تغییرات معنی داری را با گروه کنترل نشان دادند. قدرت کشندگی و حذف باکتریها از محیط کشت توسط فاگوسیت های پریتونئال، کاهش محسوسی را از حیث باکتریهای باقیمانده در محیط، نشان داد که با افزاش غلظت گلوکز و گالاکتوز، این تغییرات چشمگیر بود. افزایش غلظت قند در محیط کشت، قادر به تاثیر در وقوع فعالیتهای اکسیداتیو نگردید.*

نتیجه گیری: *فعالیتهای غشایی سلولهای فاگوستیک، از جمله بلع و قدرت چسبندگی، در اثر افزایش قند محیط مختل می گردد لیکن سیستمهای پیام رسانی برای وقوع انفجار تنفسی تابع این تغییرات نمی باشد. وقوع عفونتهای مکرر در دیابت و هیپرگالاکتوزمیا می تواند به دلیل اختلال در فرآیند فاگوسیتوز باشد.*

واژگان کلیدی: *گلیکاسیون محیط کشت، ماکروفاژهای پریتونئال، بلع، انفجار تنفسی.*

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019

مقدمه

ترکیبات موجود در بدن جانداران، بویژه مولکولها و موادی که به عنوان منابع انرژی و حیات سلول مورد استفاده قرار می گیرند، دارای نقش و وظیفه مشخصی بوده و بالطبع از غلظتهای معین و ثابتی برخوردارند. حضور این مواد در مایعات در گردش بدن و نیز آب میان بافتی، نقش مهمی را در حفظ تعادل و عملکرد بافت ایفا می نماید. از جمله مهمترین این ترکیبات، قندها می باشند که اساس فعالیتهای متابولیکی را در سلول تشکیل می دهند. عمده ترین اختلالات مرتبط با تغییرات غلظت قند، افزایش گلوکز در بیماری دیابت و هیپرگالاکتوزمیا در نوزادان می باشد (۱،۲).

مطالعات بالینی و آزمایشگاهی نشان داده است که عملکرد بیگانه خواری و دفاع ایمنی در این افراد، در هر دو سیستم ماکروفاژی و نوتروفیلی، اختلال عمده دارد (۶-۳). بررسیهای in vitro نیز تأثیر قندی شدن محیط کشت را بر فعالیت دفاعی سلولهای فوق به اثبات رسانیده است. اثر افزایش غلظت قند (گالاکتوز و گلوکز) برفرآیند بیگانه خواری، اولین بار در سال ۱۹۷۵ بصورت اختلال در بلع باکتری Ecoli توسط ماکروفاژهای خوکچه هندی گزارش گردید. غلظت ۵ میلی مولار گلوکز بهمراه غلظت ۳۰ میلی مولار گالاکتوز، تاثیر معنی داری را بر فعالیت فاگوسیتیک نشان داد (۷). یکی از دلایل عمدهٔ بروز این اثرات، کاهش میزان ATP داخل سلولی و تولید مواد واسطه ای از جمله آدنوزین دی فسفات و آدنوزین منوفسفات می باشد. در حضور گالاکتوز، دخول گلوکز به داخل سلولها، مهار می شود. مسیر گلیکولیز مختل می گردد(۲،۸). تحقیق دیگری نشان داد که عملکرد باکتریسیدی لکوسیتهای خون محیطی جوجه های ۹ روزه که رژیم پرگالاکتوزی داشته اند، به شدت کاهش یافته است (۹).

مطالعات تکمیلی در این زمینه با بررسی نحوهٔ تولید AGE[1] نشان داده شده است. قندی شدن آلبومین بصورت تأخیری آنهم در محیط کشت، موجب صدمهٔ فراوان به مکانیسمهای انفجار تنفسی سلولهای بیگانه خوار گردیده و وقوع عفونتهای مکرر باکتریایی را در بیماران دیابتی توجیه می نماید. اتصال AGE بصورت Scavenger به O_2، مسئول توقف در روند بیگانه خواری سلولها می باشد. در چنین مواردی، سلولهای بیگانه خوار که تحت تأثیر محرکهای رایج مانند ترکیبات فوربوراستر قرار می گیرند، ناتوان از فعالیت اکسیداتیو می باشند (۱۰). در شرایطی که سلولهای فوق، تنها به دلیل قندی شدن محیط اطراف و آنهم در طول مدت زمان کوتاه، علامتی را دال بر عدم شناسایی عوامل بیگانه از خود بروز می دهند، فعالیت دفاعی خویش را از دست داده و ناتوان از فعالیت باکتریسیدی می گردند (۴).

پژوهش حاضر با هدف بررسی نقش فاکتورهای قندی کننده محیط (گلوکز و گالاکتوز) با توجه به حضور غلظتهای تحت مولاری آنها که با همان مقادیر پلاسمایی و مایع میان بافتی هماهنگی می نماید، پایه ریزی گردید. بطوریکه اقدام به کشت سلولهای ماکروفاژی در این شرایط نمودیم. علاوه بر فعالیتهای فاگوسیتیک شامل بلع و توان کشندگی و نیز تغییرات مورفولوژیک سلولهای تحت آزمایش، وقوع انفجار تنفسی و توان اکسیداتیو سلولها در حضور محرکهای رایج آزمایشگاهی به روش آزمون NBT (نیتروبلوتترازولیوم) ارزیابی گردید. نتایج این تحقیق گامی است در جهت فهم مکانیسمهای مرتبط با وقوع عفونتهای مکرر در بیماران دیابتیک و مبتلایان به هیپرگالاکتوزمیا.

مواد و روشها

تهیه محیط کشت قندی شده: توسط RPMI 1640 (ساخت شرکت Gibco) و مقادیر افزاینده از گلوکز و گالاکتوز براساس میلی مولار و با محاسبه وزن مولکولی قند، اقدام به تهیهٔ محیط کشت سلولی نمودیم (جدول ۱). محیط کامل کشت سلولی، توسط مواد فوق و اجزاء تکمیلی شامل (FBS بمیزان۱۲٪) تهیه گردید. به دلیل بررسی مکانیسمهای بلع و کشندگی ماکروفاژها در مجاورت باکتری از افزودن آنتی بیوتیک به محیط کشت خودداری نمودیم.

جداسازی و تخلیص ماکروفاژهای پریتوئن موش: با انجام عمل لاواژ پریتونئال، ماکروفاژهای محوطه صفاقی موش نژاد خالص Balb/C (۶ هفته، به وزن ۵±۳۰ گرم) اخذ گردید. بدین صورت که ابتدا با عمل Cervical Dislocation، حیوان قطع حیات گردید. با رعایت شرایط کامل استریلیزاسیون، در زیر هود لامینار، توسط وسایل جراحی در قطع میکروسرجری، محوطه صفاقی با مایع HBSS[2] لاواژ گردید. مایع حاصله از لاواژ در g×۴۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلولهای ته نشین شده، یکبار توسط هنکس شستشو و سانتریفوژ گردیدند. سپس اقدام به شمارش سلولها و تعیین وایابیلیتی به کمک رنگ تریپان بلو نمودیم. (حداقل ۹۵٪ سلولها باید زنده باشند) (۱۱). (شکل شماره ۱)

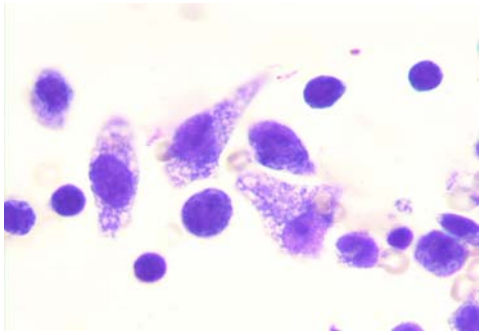
[1] Advanced glycosylation end product

[2] Hanks Buffer Sault Solution

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019

جدول ۱- ماکروفاژهای پریتونئال موش Balb/C در مجاورت محرکهای مختلف و در حضور غلظتهای ۳۰-۰ میلی مولار از گلوکز و گالاکتوز، کشت گردید. درجات تکاملی و میانگین تعداد سلولهای چسبیده نشان داده شده است.

محتویات کربوهیدراتی			محرکهای محیط کشت							
			Control		FMLP		PMA		Endotoxin	
Plate	گلوکز	گالاکتوز	تعداد سلولهای چسبیده	M	تعداد سلولهای چسبیده	M	تعداد سلولهای چسبیده	M	تعداد سلولهای چسبیده	M
۱	۵	۵	۳۷/۷	<+	۶۴	++++	۹۱	++	۷۸	+++
۲	۵	۱۵	۳۹	++	۵۳	++	۲۹	++	۹۳	+
۳	۵	۳۰	۷۶	+	۷۷/۷	<+	۱۰۰/۳	++	۱۱۲	+++
۴	۰	۰	۱۰۸	++	۷۳/۵	++++	۸۷	++	۹۰/۵	+++
۵	۵	۰	۹۲	+	۶۴/۵	+	۱۱۳/۵	+++	۱۰۷/۶	+++
۶	۱۵	۰	۱۰۰	+	۸۸/۶	+++	۷۵/۷	+++	۳۰	++
۷	۳۰	۰	۶۸	+	۴۷/۷	++	۷۲/۳	++	۴۲	++



شکل ۱= سلولهای ماکروفاژی حاصل از لاواژ و کشت پریتونئال موش Balb/C که به خوبی علائم تحریک و چسبندگی را نشان می دهند (۱۰۰ ×) ایمرسیون

کشت ماکروفاژها در محیط قندی شده: با رعایت کامل شرایط کشت سلول، در ظروف مخصوص (۲۴ خانه ای) Multiplate Tissue Culture Dish ساخت شرکت Falcon سلولها را در محیط کشت تهیه شده به تعداد ۳×۱۰^{۵} در هر گوده، قرار دادیم (هر گوده با ۲۰۰ میلی لیتری محیط کشت). در این مرحله سلولها برای انجام مرحله آزمون، مورد تفکیک و گروه بندی قرار گرفتند. در گوده های مختلف غلظتهای مختلف قند در نظر گرفته شده بود.

- *آزمون تعیین خصوصیات چسبندگی سلولها:*

در این روش آزمایشگاهی،سلولها تحت تاثیر محرکهای مختلف آزمایشگاهی قرار گرفتند. این محرکها عبارت بودند از: FLMP (فورمیل میتونین لوسین فنیل آلانین، ساخت شرکت زیگما): بمقدار ۱۰/ml-۶ ؛ PMA (فوربول میریستات استات، ساخت شرکت زیگما): بمقدار ۲۵۰ng/ml؛ LPS (لیپو پلی ساکارید– اندوتوکسین، ساخت شرکت زیگما): بمقدار ۱۵ µg/ml.

گروه کنترل در این آزمون، عاری از هرگونه محرک بوده و برای هر چهار گروه کنترل و آزمایش شرایط عاری از قند اضافی نیز در نظر گرفته شد.

پس ازانکوباسیون سلولها به مدت۳ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتیگراد، جریان CO_2 ۵٪ در دستگاه CO_2-Incubator و رطوبت حداقل ۷۰٪، مایع رویی کشت سلولها که حاوی محیط کشت و سلولهای غیرچسبنده بود از ظروف خارج و با شستشو توسط RPMI گرم، سلولهای باقیمانده و غیر چسبنده، بطور کامل از محیط خارج گردیدند. به کمک میکروسکوپ فاز کنتراست سلولهای چسبنده در حداقل ۱۰ فیلد میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰، شمارش گردیدند. میانگین اعداد بدست آمده (در چند نوبت) محاسبه و ثبت گردید (۱).

- *آزمون برآورد تغییرات مورفولوژیک سلولها*

سلولهای چسبنده به سطح پلاستیکی محیط کشت، نشان از ظهور خصوصیات ماکروفاژی و فاگوسیتیک دارند. با روش رنگ آمیزی گیمسا و با استفاده از معیارهای زیر، تغییرات مورفولوژیک سلولها بررسی شد:

تغییر شکل هندسی سلولها، ظهور پاهای کاذب در سطح بدن و ظهور گرانولهای سیتوپلاسمیک و واکوئولهای فاگوسیتیک.

حداقل ۱۰ فیلد میکروسکوپی برای امتیاز بندی به سلولهای ماکروفاژی کشت شده در سیستمهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. اخذ نتایج این مرحله با روش سیتولوژیک زیر امکان پذیر گردید:

اگر ۲۰٪ کل سلولهای hpf ،تغییرات مورفولوژیک فوق را نشان دادند، (+) تلقی گردیدند و چنانچه ۴۰٪، ۶۰٪ و ۸۰٪ کل سلولهای hpf ،تغییرات مورفولوژیک فوق را نشان دادند به ترتیب (++)، (+++) و (++++) تلقی گردیدند (۱۲).

تعیین فعالیت اکسیداتیو و انفجار تنفسی سلولها: ابتدا پودر NBT (ساخت شرکت زیگما) با غلظت ۵mg در ۵ میلی لیتر نرمال سالین (۰/۹٪) محلول گردید. سلولهای ماکروفاژی طبق بندهای فوق تحت کشت و انکوباسیون قرار گرفتند. در

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019

سیستم مربوط به ارزیابی فعالیت اکسیداتیو، مایع رویی کشت سلولها برداشته شد. سلولهای چسبنده باقیمانده با RPMI گرم شستشو شدند. به هر گوده ۱۰۰ لاندا از RPMI و ۱۰۰ لاندا NBT محلول اضافه گردید. ۲۰ دقیقه در انکوباتور کشت سلول قرار گرفتند. سپس مایع رویی تخلیه گردید و ۳ بار با متانول شستشو شد. سپس به بررسی سلولهایی که فعالیت اکسیداتیو داشتند، پرداختیم. طبق روش استاندارد، سلولهایی که در سیتوپلاسم، رسوب آبی رنگ فورمازان را که نشانه احیاء ماده NBT است داشتند، شمارش گردیدند. به روش دیفرانسیون، سلولهای مثبت از منفی تعیین گردیدند. حداقل ۳۰۰ سلول شمارش شدند و درصد سلولهای NBT مثبت تعیین گردید. بدین ترتیب توان اکسیداتیو هریک از سیستمهای سلولی تحت کشت و گروههای مختلف مشخص شد (۱۳).

انجام تست بلع[3] و کشندگی[4]:

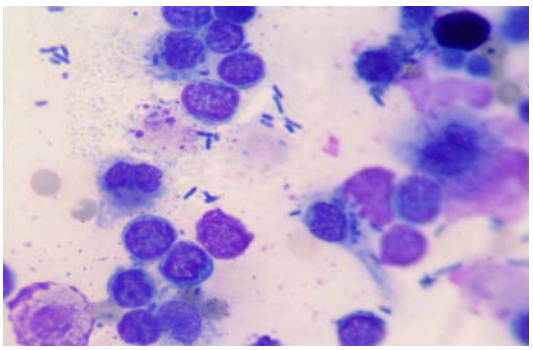
الف- تهیه سوسپانسیون زنده و متحرک از باکتری E coli: کلنی ایزولهٔ E-coli در ژلوز خوندار بمدت ۲۴ ساعت کشت شد و در ۲ میلی لیتر تیوگلیکولات استریل شناور گردید. برای حفظ حیات باکتریها و سلولها، استفاده از این محیط کشت اجتناب ناپذیر بود. تیترنهائی، بمقدار ۶×۱۰^{۸} در ۲ میلی لیتر محیط تیوگلیکولات بود. این تعداد برای استفاده از لوله های مک فارلند، تعیین و محاسبه گردید.

ب- برآورد فعالیت بلع ماکروفاژها: لوله محتوی باکتری در دور ۴۰۰xg بمدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. ته نشین به محیطهای کشت سلولی حاوی غلظتهای مختلف قند منتقل گردید. بلافاصله سلولهای تحت بررسی به محیط کشت افزوده شدند. انکوباسیون ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در انکوباتور CO_2 انجام گردید. سپس مایع رویی تخلیه و سلولهای چسبنده بهمراه باکتریها بمنظور ارزیابی نتایج، توسط ماده گیمسا رنگ آمیزی گردیدند. توسط میکروسکوپ نوری باکتریهای بلع شده در داخل سیتوپلاسم سلولها مشاهده گردیدند (شکل ۲). ۱۰ فیلد بررسی گردیدند. تعداد متوسط باکتریهای بلع شده توسط ماکروفاژها با شمارش، تعیین گردید. حداقل ۱۰۰ سلول مثبت از حیث بلع باکتری، مورد شمارش تعداد باکتری در سیتوپلاسم هر سلول قرار گرفتند.

۳ بار عمل برآورد میزان بلع انجام پذیرفت. بدین ترتیب، میانگین تعداد باکتری بلع شده در هر یک از سیستمهای قندی شده کشت سلول با سیستم کنترل مقایسه گردید.

[3] Ingestion
[4] Killing

در همین مرحله، به کمک روش اجرا شده، درصد سلولهای مثبت از حیث بلع باکتری در هر ۱۰۰ سلول شمارش گردید. حداقل ۳۰۰ سلول برای هر سیستم قندی شده و کنترل شمارش شد. در اینجا این نکته را اضافه می کنیم که به دلیل محدودیتهای آزمایشگاهی و عدم وجود امکانات لازم، تنها به افزدن دو نمونه از غلظت قندها آنهم با مولاریته بالا اقدام نمودیم.



شکل ۲- سلولهای ماکروفاژ در شرایط گلیکولاسیون محیط کشت (غلظت بالای گالاکتوز) قادر به بلع تعداد کمتری از باکتریهای محیط گردیده است. ملاحظه می شود که باکتریهای آزاد در فضای خارج سلولها فراوان هستند (۱۰۰×) ایمرسیون

ج- محاسبه قدرت کشندگی ماکروفاژها: تعداد ۶×۱۰^{۸} باکتری وارد هر یک ازسیستمهای محیط کشت گردید (مشابه بند ب). پس از انکوباسیون، مایع رویی با استفاده از لوله های مک فارلند که تعداد مشخصی از باکتری را در هر مرحله با کدورتهای مختلف نشان می دهد، مورد ارزیابی از حیث تعداد باکتری بلع نشده قرار گرفت. برای اطمینان از خلوص باکتری، از محیط کشت مک کانکی و ژلوز خوندار و آگار EMB استفاده گردید.

برای انجام مرحلهٔ تکمیلی برآورد خصوصیت کشندگی و ارزیابی تعداد باکتریهای زنده در محیط کشت اقدام به انجام آزمون کلنی کانت نمودیم. هر کلونی رشد کرده معادل $۱۰^{۷}$ باکتری است. بدین ترتیب تفاوت بین تعداد باکتریها، قبل از آغاز کشت سلولها و پس از اختتام مراحل آزمون، تعیین گردید.

یافته‌ها

همانگونه که جدول ۱ نشان می دهد، سلولهای فاگوسیتیک پریتونئال، در شرایط کنترل و عاری از قند اضافی بالاترین میزان چسبندگی را نشان می دهند. درهمین وضعیت محرک FMLP نقش مهمی را در تکامل و مورفوژنز سلولها اعمال

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019

نمـوده سـپس اندوتوکسـین و در رتبـه بعـد PMA ، قـدرت تحریک و ایجاد خصوصیات چسـبندگی را در سـلولها افـزایش داده است.

افزایش غلظت گالاکتوز موجب کاهش تعداد سلولهای چسبنده به سطوح محیط کشت گردیده و غلظت ۳۰ میلی مولار گلوکز نیز نه تنها سلولهای فاگوسیتیک را فعال ننموده بلکه اثر منفی برروی مورفوژنز آنها بجا گذاشته است. در مجاورت محرکهـای مختلف آزمایشـگاهی، غلظتهـای مختلـف گلـوکز و گـالاکتوز، تغییرات محسوس و چشمگیری را بر مورفوژنز و تکامل سلولها و نیز تعـداد سـلولهای چسـبنده ایجـاد ننمـوده اسـت. لـیکن ملاحظه می شـود کـه تغییـرات تکامـل سـلولها در مجـاورت FMLP آنهم در غلظتهـای بـالای گـالاکتوز و گلـوکز کـاهش نسبتا محسوسی را نشان می دهد. ستون مربـوط بـه عملکـرد اندوتوکسین بر غلظتهای مختلف قند و نحوۀ اعمال فعالیتهـای چسبندگی و مورفوژنز نشان می دهد که افزایش غلظت گلوکز (۱۵ و ۳۰ میلی مولار) موجب کاهش تعداد سلولهای چسبنده در محیط گردیده است.

همانگونه که در بخش روشـها ذکـر گردیـد، بمنظـور بررسـی وضعیت بلع فاگوسـیتها، تعـداد مشخصـی بـاکتری در اختیـار ماکروفاژها قرار گرفت. جدول ۲ نشـان مـی دهـد کـه غلظـت بالای گلوکز صـدمۀ عملکـردی محسوسـی را در پروسـه بلـع فاگوسیتها در محیط کشت اعمال نمـوده بطوریکـه تنهـا ۱۹٪ سلولهای فاگوسیت قادر به بلع باکتریها بودند (در مقایسـه بـا رقم ۳۴/۵٪ محـیط کشـت عـاری از قنـد اضـافی). همچنـین افزایش غلظت گالاکتوز درغلظت۳۰ میلی مولار در مقایسه بـا محیط قبلی، موجب کاهش درصد سلولهای بلع کننده بمیزان ۸٪ گردید که بسیار محسوس و چشمگیر می باشد. بر اساس نتایج بالا، میانگین تعداد باکتریهای بلـع شـده در هـر سـلول ماکروفاژی نیـز در شـرایط طبیعـی بـالاتر از میـانگین تعـداد باکتری بلع شده در شرایط ۳۰ میلی مولار گلوکز و گـالاکتوز است که انطباق نسبی با فرایند قبلی دارد.

جـدول ۳ بیـانگر مشـاهدات مربـوط بـه فعالیـت کشـندگی فاگوسیتها در رابطه با تغییرات تعداد باکتری در محیط کشـت است، که بدون شک بدون در نظر گرفتن یک سیستم کنتـرل، اعتبار لازم را نخواهد داشت. محیط کشـت عـاری از ماکروفـاژ موجـب فـراهم نمـودن زمینـه بـرای افـزایش تعـداد بـاکتری می شود لیکن با توجه به سیستم شمارش بـاکتری در محـیط کشت به روش لوله های مـک فارلنـد، باکتریهـای بلـع نشـده شمارش گردیده و مشخص شـد کـه غلظـت ۳۰ میلـی مـولار گالاکتوز در مقایسه با محیط عاری از هر گونه قند موجب بقاء تعداد بیشتری از باکتری در محیط کشت گردیده است. غلظت ۳۰ میلی مولار گلوکز این تفاوت را بطور بارزی نشان می دهد.

جدول ۲- عملکرد بلع سلولهای ماکروفاژی در سه وضعیت غلظت بالای گالاکتوز، غلظت بالای گلوکز و محیط کشت بدون قند اضافی

پلیت	محتویات کربوهیدراتی محیط کشت		میانگین تعداد باکتری بلع شده در هر سلول ماکروفاژی (۱۰۰ سلول)	درصد سلولهای بلع شده توسط باکتری
	گلوکز	گالاکتوز		
۱	۰	۰	۳/۲۳	٪۳۴/۵
۲	۳۰	۰	۲/۳۸	٪۱۹
۳	۰	۳۰	۲/۰۶	٪۸

جدول ۳- تفاوت در تعداد و بقا باکتریها قبل و بعد از انجام انکوباسیون و در طول کشت سلولهای فاگوسیت

پلیت	محتویات کربوهیدراتی در محیط کشت		سلول ماکروفاژ	تعداد باکتری در هر میلی لیتر محیط کشت قبل از انکوباسیون	شمارش باکتری در محیط کشت روش مک فارلند (non-ingested) بعد از انکوباسیون	شمارش باکتری در محیط کشت روش کلنی کانت (Killing) بعد از انکوباسیون
	گلوکز	گالاکتوز				
۱	۰	۰	+	۶×۱۰^{۸}	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	۲×۱۰^{۷}
۲	۳۰	۰	+	۶×۱۰^{۸}	۳×۱۰^{۸}	۱۱×۱۰^{۷}
۳	۵	۳۰	+	۶×۱۰^{۸}	۲×۱۰^{۸}	۶×۱۰^{۷}
۴	۰	۰	-	۶×۱۰^{۸}	۶×۱۰^{۸}	۴۰×۱۰^{۷}

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019

جدول ۴- آزمون NBT به منظور برآورد فعالیت اکسیداتیو و انفجار تنفسی سلولهای کشت شده در محیطهای قندی مختلف

محتویات قندی محیط کشت			درصد سلولهای NBT مثبت در مجاورت محرکها			
پلیت	گلوکز	گالاکتوز	Control	Endotoxin	PMA	FMLP
۱	۵	۵	۷۶	۷۴	۷۵	۷۴
۲	۵	۱۵	۶۳	۷۸	۷۷	۷۵
۳	۵	۳۰	۵۸	۷۴	۶۵	۶۴
۴	۰	۰	۶۷	۸۳	۸۴/۷	۸۱/۵
۵	۵	۰	۶۷/۵	۵۶	۶۴	۶۶
۶	۱۵	۰	۵۹	۵۸	۵۶	۴۵
۷	۳۰	۰	۶۹/۲	۶۰/۵	۸۴/۲	۷۹/۲

در روش کلنی کانت باکتری برای هر محیط باقیمانده از فعالیت فاگوسیتها ملاحظه می شود که فعالیت کشندگی ماکروفاژها در مجاورت مقادیر افزاینده قند بشدت کاهش یافته و با ملاحظه نتایج حاصله از محیط کشت عاری از سلول، این اثرات مهاری کاملا مشخص می شود. غلظت ۳۰ میلی مولار گالاکتوز امکان ادامه حیات و رشد باکتریها را در محیطهای مخصوص به شدت افزایش داده و غلظت ۳۰ میلی مولار گلوکز نیز به ادامهٔ حیات باکتریها و رهایی از فعالیت کشندگی ماکروفاژها یاری می رساند.

بخش تکمیلی این یافته ها مربوط به برآورد فعالیت اکسیداتیو و ادامهٔ انفجار تنفسی فاگوسیتی است. جدول ۴ تغییرات احیاء NBT را در سیستمهای مختلف کشت همراه یا بدون قند اضافی را نشان می دهد. این جدول نشان می دهد که PMA و FMLP بالاترین قدرت فعالیت اکسیداتیو را در سلولها فراهم می آورند. سایر اعداد مربوط به درصد سلولهای احیاء کننده NBT تفاوت قابل تأملی را در سیستم های مختلف کشت سلول نشان نمی دهد.

بحث

تأثیر گلیکاسیون محیط رشد و تکامل سلولهای فاگوسیتیک بر فعالیت دفاعی این سلولها نشان داده است که صدمات عملکردی متعاقب افزایش غلظت قند در اطراف سلولها، از طریق مکانیسم تولید AGE ، مسئول بروز عفونتهای مکرر در بیماریها و ناهنجاریهای مرتبط است. اینکه این صدمات در کدامیک از مراحل و فرایندهای بیگانه خواری به وقوع می پیوندد انگیزه اصلی در ابداع روش تحقیق در این کوشش بوده است. بدون شک اجزاء سطحی بسیاری که مسئول شناسایی عوامل بیگانه و سپس راه اندازی مکانیسمهای بیگانه خواری هستند تحت تاثیر تغییرات غلظت قند محیط، دگرگون گردیده امکان بروز پدیده ای مهاری در فعالیت گیرندگی آنها وجود دارد.

با مطالعهٔ نحوه اثر گلیکاسیون بر مراحل مختلف بیگانه خواری شامل چسبندگی، تکامل مورفولوژیک، توان بلع و کشندگی و فعالیتهای اکسیداتیو، بر آن شدیم تا عملکرد مهاری پدیدهٔ فوق را در بخشهای مختلف اعمال فاگوسیتیک مطالعه نماییم. با مروری بر یافته های این تحقیق، مشخص گردید که غلظتهای بالای گالاکتوز و گلوکز مانع چسبندگی و مورفوژنز سلولهای ماکروفاژ می گردند. این مراحل در روند تکامل التهاب و بکارگیری فاگوسیتها در بدن اهمیت ویژه ای داشته و از مهمترین ارکانهای دفاع غیر اختصاصی محسوب می شوند.

اثر محرکهای آزمایشگاهی در فعالیت فاگوسیتهای تک هسته که در این تحقیق نشان داده شده است با سایر مقالات و پژوهشهای مشابه، هماهنگی و تطابق دارد. FMLP که محرک قوی سیستم ماکروفاژها است با وجود غلظت افزاینده گلوکز و گالاکتوز همچنان توان عملکردی این سلولها را در تمامی شرایط افزایش داده است.

نتایج حاصله از مراحل وضعیت بلع سیستم ماکروفاژی در محیط قندی نشان می دهد که در افزایش غلظت گلوکز و گالاکتوز (تنها به غلظت ۳۰ میلی مولار بسنده نمودیم) سیستم بلع باکتریایی بشدت تضعیف می شود. گالاکتوز توان بلع ماکروفاژها را به مقدار ۲۵٪ کنترل کاهش داده است (۸٪). در سیستم کنترل بلع و با توجه به شرایط طبیعی محیط کشت تعداد باکتری بلع شده در مقایسه با افزایش غلظت گلوکز بالاست. وقوع عفونتهای مکرر باکتریال در هیپرگالاکتوزمیا، الگویی کاملا بیولوژیک و همراه با یافته فوق می باشد. لازم است ذکر شودکه اضافه کردن ۵ میلی مولار گلوکز به محیط حاوی گالاکتوز با غلظت بالا، موجب عدم استفاده سلولها از گالاکتوز برای تامین انرژی می شود زیرا چنانچه گلوکز اضافی محیط وجود نداشته باشد، سلولها مقادیری از گالاکتوز را به عنوان منبع انرژی استفاده نموده و ترتیب افزایش یافته غلظت گالاکتوز مختل می گردد.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019

میانگین افزایش یافته تعداد باکتریهای بلع شده در ۱۰۰ سلول نیز در محیط عاری از قند، بیانگر نقش مهاری قندها در اشغال گیرنده های لکتینی برای بلع باکتری است. جدول ۳ نشان می دهد که تعداد باکتریهای محیط کشت در صورت عدم وجود سلولهای ماکروفاژی، ثابت و زنده باقیمانده و حتی در محیط کشت باکتریایی، تعداد آنها افزایش بسیار یافته است. غلظت بالای گلوکز سبب بقاء تعداد بیشتری از باکتریهای بلع نشده گردیده است زیرا فاگوسیتها نیز ناتوان از بلع آنها می باشند. می توان موارد فوق را با شمارش باکتری به روش مک فارلند در محیط نرمال کشت سلولی، مقایسه نمود. افزایش غلظت گالاکتوز نیز سبب بقاء باکتریهای بلع نشده توسط سلول فاگوسیتیک، در محیط گردیده است.

بمنظور تعیین هر چه دقیقتر نحوهٔ عملکرد مهاری قندها بر فعالیت فاگوسیتها لازم بود تا باکتریهای بلع نشده با روش کلنی کانت، مورد بررسی از حیث بقاء حیات قرار گیرند. امکان دارد فعالیتهای اکسیداتیو ماکروفاژها، بر حیات آنها حتی در خارج سلول، تاثیر بگذارد زیرا روش کلنی کانت، برآوردی صحیح از تعداد باکتریهای زنده موجود در محیط می باشد و همانگونه که ذکر شد مکانیسمهای فاگوسیتیک و خروج عوامل باکتریسیدال چه در داخل واکوئلها و چه خارج سلولها اثرات کشندگی و انهدامی بر حیات باکتریها اعمال می نماید.

در جدول ۳ تفاوت بین اعداد کلنی کانت، بیانگر این است که قدرت کشندگی سلولهای بیگانه خوار بر حفظ حیات باکتری آنهم در مجاورت قندها، کاهش شدیدی را نشان می دهد. این نتایج با مقالات و پژوهشهای مشابه مطابقت دارد (۲،۴،۸،۵،۷،۹).

یکی از روشهای آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت کشندگی فاگوسیتها، تست احیاء ماده NBT است که ما در این تحقیق از آن استفاده نمودیم. می توان ادعا نمود که پژوهش مشابهی در این راستا انجام نگرفته است. البته در تحقیقی تقریبا مشابه با اندازه گیری NADPH اکسیداز، کوشش بسیار ارزنده ای را برای تعیین توان اکسیداتیو ماکروفاژها در مجاورت غلظتهای مختلف قندی انجام گرفته است که ما ناتوان از اجرای روش پژوهشی فوق بودیم. لیکن تست NBT نیز ارزش والایی در تعیین روند اکسیداتیو و انفجار تنفسی در سلولها دارد. جدول ۴ نشان می دهد که با وجود تاثیر قابل ملاحظه و چشمگیر غلظت افزاینده قندها بر مکانیسمهای فاگوسیتیک، چسبندگی و بخصوص بلع و کشندگی، وقایع اکسیداتیو که کاملا درون سلولی می باشند، تغییرات قابل ملاحظه ای را در مقایسه با سیستم کنترل نشان نمی دهند. بنابراین بالاترین اثر مهاری این قندها بر مکانیسمهای وابسته به گیرنده و برون سلولی است. احتمالا سیستمهای پیام رسانی وابسته به اکسیژن تحت تاثیر این تغییرات قرار نمی گیرند. پژوهشهای مشابه در سلولهای اخذ شده از مبتلایان به دیابت نشان داده است که برعکس، فعالیت اکسیداتیو در این بیماران افزایش می یابد و این عامل خود باعث ایجاد جراحات عروقی و بافتی شرایطی مانند پای دیابتیک می شود (۱۴). نتایج ما نیز نشان داد که فعالیتهای اکسیداتیو فاگوسیتها، دراثر افزایش غلظت قند محیط تغییر نمی کند.

امید است با انجام آزمونهای دقیقتر در برآورد توان چسبندگی لکوسیتها و فعالیت کشندگی فاگوسیتها مانند اندازه گیری مولکولهای چسبان و گیرنده های کمکی سطح فاگوسیتها، گامهای موثرتری در فهم مکانیسمهای مرتبط با وقایع بیگانه خواری در دیابت و هیپرگالاکتوزمیا برداریم.

REFERENCES

1. Behrman RE, Kliegman RM, editors. Nelson essential of pediatrics. 4th edi. Philadelphia: WB Saunders; 2002. p. 161-2.
2. Newsholme P, Newsholme EA. Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture. Biochem J 1989; 261(1): 211-8.
3. Carpenter CCJ, Griggs RC, Loscalzo J, editors. Cecil essential of medicine. 5th edi. Philadelphia: WB Saunders; 2001.
4. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. Diabetes 1974; 231: 9-15.
5. Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. Diabetes. 1989; 38(8): 1031-5.
6. Sanchez A, Reeser JL, Lau HS, Yahiku PY, Willard RE, McMillan PJ, Cho SY, Magie AR, Register UD. Role of sugars in human neutrophilic phagocytosis. Am J Clin Nutr 1973; 26(11):1180-4.

7. Litchfield WJ, Wells WW. Inhibitory action of D-galactose on phagocyte metabolism and function. Infect Immun 1976; 13(3): 728-34.

8. Newsholme P, Gordon S, Newsholme EA. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. Biochem J 1987; 242(3): 631-6.

9. Litchfield WJ, Wells WW. Inhibitory action of galactose on phagocytes from normal and hypergalactosemic chicks. Infect Immun 1977; 16(1): 198-202.

10. Roith DL, editor. Diabetes mellitus; A fundamental clinical text. 2nd edi. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

11. Rafael F, editor. Methods in cellular immunology. 2nd edi. CRC press; 2001. p. 5-6.

۱۲. میرزا حسین یزدی ب، مصفا ن. بررسی خصوصیات چسبندگی ماکروفاژهای پریتونئال موش Balb/c در حضور محرک PMA. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۲؛ سال ۶۱، شماره فروردین.

13. Sonnenwirth AC, Jarett L, editors. Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 8th edi. New York: Mosby Company; 1980. p. 1363, 1760.

۱۴. شوشتری زاده پ. بررسی کمی و کیفی فرآیند انفجار تنفسی سیستم فاگوسیتی و میزان روی سرمی در افراد دیابتی. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد ایمونولوژی. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. سال ۱۳۸۱.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 17:31 +0330 on Tuesday October 15th 2019