

## مقاله پژوهشی

## تأثیر کوتریماکسازول بر رونویسی قطعه تکراری ۵۲۹ و فاکتور نکروز توموری-آلفا در مغز موش‌های آلوده به توکسوپلازما گوندی

جلال بابایی<sup>۱\*</sup>، محمد سیاح<sup>۲\*</sup>، مجید گل‌کار<sup>۱</sup>

۱. گروه انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران  
 ۲. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش: ۲۵ شهریور ۱۳۹۸

دریافت: ۱۶ مرداد ۱۳۹۸

## چکیده

**زمینه و هدف:** توکسوپلاسموز یک عفونت انگلی با شیوع جهانی است که بوسیله توکسوپلازما گوندی ایجاد می‌شود. علائم عفونت حاد شبیه سرماخوردگی است ولی عفونت مزمن بدون علامت است. در این مطالعه اثر کوتریماکسازول بر تیترا انگل و پاسخ التهابی در مغز موش‌های مبتلا به توکسوپلاسموز بررسی شده است.

**روش‌ها:** موش‌های سوری با تزریق صفاقی کیست انگل به توکسوپلاسموز مبتلا شدند. توالی REP-529 (معرف بار انگل) و TNF- $\alpha$  (معیار پاسخ التهابی) در مغز موش‌ها با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی، در هفته‌های ۱ تا ۸ پس از تزریق کیست و نیز متعاقب درمان با کوتریموکسازول اندازه‌گیری شد. درمان با کوتریموکسازول ده روز پیش از شروع هفته چهارم و هشتم عفونت شروع شد و بمدت ۱۰ روز ادامه یافت.

**یافته‌ها:** از روز ۴ تا ۱۴ پس از تزریق کیست، موش‌ها دچار آسیت شدید شدند. مقادیر REP-529 نشان داد انگل هفته اول وارد مغز شده و هفته دوم و سوم با سرعت تکثیر می‌یابد. بیان TNF- $\alpha$  از هفته دوم شروع شده و به اوج می‌رسد و هفته‌های بعد کاهش می‌یابد. کوتریموکسازول با‌طور معنی‌داری موجب کاهش معنی‌دار رونویسی REP-529 و TNF- $\alpha$  در هفته ۴ و ۸ عفونت شد. درمان در هفته ۴ با افزایش معنی‌دار وزن موش‌ها ( $p < 0.05$ ) نسبت به گروه درمان‌نشده همراه بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که در موش‌های سوری مبتلا به توکسوپلاسموز، تجویز مزمن کوتریموکسازول با مهار تکثیر انگل و پاسخ التهابی در مغز موش‌ها و بهبود بیماری همراه است.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلازما گوندی، کوتریماکسازول، TNF- $\alpha$ ، REP-529

## مقدمه

مطالعه متا-آنالیز دریانی و همکاران در سال ۲۰۱۴، نشان داده شد که میزان شیوع سرمی<sup>۲</sup> عفونت توکسوپلازما در ایران به‌طور کلی ۳۹/۳٪ و در مناطق مختلف کشور بین ۱۴٪ تا ۶۶٪ متغیر می‌باشد [۱]. توکسوپلازما به سه شکل عفونی دیده می‌شود:

توکسوپلازما گوندی<sup>۱</sup> یک انگل درون سلولی اجباری است که قابلیت ایجاد عفونت در تمام حیوانات خونگرم را دارا می‌باشد. تخمین زده می‌شود که ۵۰-۳۰٪ جمعیت جهان- نزدیک به ۲ میلیارد نفر- سابقه عفونت به این انگل را داشته باشند. در

<sup>2</sup> Seroprevalence<sup>1</sup> *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)

\* نویسنده‌های مسئول مکاتبات: jalalbabaie@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4989-5998)

sayyahm2@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0003-0603-2444)

نیستند [۴]. ظاهراً توکسوپلازما گوندی در فرم نهفته خود علامت بالینی ندارد ولی در صورت سرکوب سیستم ایمنی (مثل مواقع مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و بیماری ایدز) عفونت عود کرده، و منجر به بیماری سیستمیک و انسفالیت مغزی می شود که می تواند کشنده باشد [۵]. کیست های نسجی گرایش خاصی به بافت های تحریک پذیر مانند عضلات اسکلتی، قلب و مغز دارند و عمدتاً در این اندام ها تشکیل می شوند. مطالعات نشان داده است که حضور انگل در سیستم عصبی مرکزی با برخی از مشکلات عصبی و رفتاری در ارتباط است. برخی مطالعات بالینی و تجربی شواهد محکمی را ارائه داده اند که نشان می دهد فرآیندهای التهابی در مغز ممکن است نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی این مشکلات عصبی و رفتاری بازی کند [۶]. سایتوکین ها-پروتئین هایی که فرآیندهای التهابی را تعدیل می کنند- در اولین مراحل التهاب مغز به وسیله سلول های نوروگلیا و نورون ها تولید می شوند [۷]. فاکتور نکروز توموری-آلفا (TNF- $\alpha$ ) یک سایتوکاین است که در التهاب سیستمیک نقش دارد و یکی از سایتوکاین هایی است که واکنش فاز حاد را بوجود می آورد. در پاسخ به شرایط پاتولوژیک، TNF- $\alpha$  توسط آستروسیت ها، نورون ها و عمدتاً میکروگلیا تولید می شود و در فعالیت های ایمنی و التهابی مغز نقش مهمی دارد [۸، ۹]. تولید TNF- $\alpha$  یک عامل مهم پاسخ التهابی عصبی است که با چندین اختلال عصبی در ارتباط است [۸].

هدف اصلی این مطالعه، بررسی اثر بخشی کوتریموکسازول در کاهش شدت عفونت و کنترل فاکتور نکروز توموری آلفا ناشی از توکسوپلازما بود. ما در این مطالعه از تیپ II توکسوپلازما گوندی (سوش تهران) استفاده کردیم که باعث عفونت غیر کشنده در موش ها می شود از این رو شبیه به توکسوپلازما پیش رونده انسانی است. در مرحله بعد با اندازه گیری تعداد کپی توالی تکراری REP-529 و میزان رونویسی TNF- $\alpha$  در مغز موش های آلوده به انگل اثر دارودرمانی با کوتریموکسازول بر مهار رشد انگل کاهش التهاب ناشی از آن را بررسی کردیم.

## مواد و روش ها

### حیوانات مورد استفاده

موش های سوری نر نژاد ان ام آر آی<sup>۱۲</sup> (گونه موس

تاکی زوایت<sup>۳</sup> (در گروه و یا کلونی ها)، برادی زوایت<sup>۴</sup> (در داخل کیست نسجی<sup>۵</sup>) و اسپوروزوایت<sup>۶</sup> (در داخل اوویست<sup>۷</sup>). اوویست ها فقط در میزبان نهایی - خانواده گربه سانان - تشکیل می شوند. اوویست ها وقتی از طریق مدفوع دفع شده و خورده شوند، می توانند انسان و سایر میزبان های واسط را آلوده کنند. اوویست ها در میزبان جدید به تاکی زوایت تبدیل شده و وارد سلول های هسته دار میزبان شده و تکثیر می شوند. این دوره فاز حاد عفونت است. در این مرحله، تاکی زوایت های سریع تکثیر شونده در سراسر بدن به خصوص سیستم عصبی مرکزی، چشم ها و عضلات مخطط منتشر شده و در اثر پاسخ سیستم ایمنی به برادی زوایت ها تمایز یافته و تشکیل کیست های نسجی را می دهند. این دوره فاز مزمن عفونت است [۲].

عفونت توکسوپلازما گوندی به طور غیرمستقیم با روش های سرولوژیکی و مستقیم به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز<sup>۸</sup> (PCR)، جداسازی انگل و مشاهده انگل با روش های بافت شناسی تشخیص داده می شود. با توجه به حساسیت بالای PCR، امروزه از این تکنیک برای تشخیص انگل استفاده می شود. حساسیت PCR می تواند با استفاده از توالی هدف چندنسخه ای افزایش یابد. پیش تر برای تشخیص این عفونت از توالی ژن B1 (که ۳۵ کپی دارد) استفاده می شد. یک توالی تکراری ۵۲۹ جفت بازی به نام REP-529 (accession No. AF146527) در سال ۲۰۰۰ شناسایی شد که با داشتن ۳۰۰ کپی در ژنوم، به عنوان هدف PCR مناسب تر می باشد [۳]. سایر توالی های تکراری نیز مثل عناصر ژنتیکی متحرک<sup>۹</sup> (۵۰۰-۱۰۰ کپی) در تشخیص توکسوپلازما استفاده می شوند.

در انسان، مصرف انواع گوشت خام و نیم پز و مواد غذایی حاوی کیست (مانند شیر و تخم مرغ) و یا مواد غذایی، سبزیجات و آب آلوده به اوویست ها از منابع آلودگی می باشند. کیست های نسجی تا آخر عمر در بدن میزبان باقی می ماند و حتی به وسیله MRI<sup>۱۰</sup> و آنالیز روتین مایع مغزی نخاعی نیز قابل تشخیص

<sup>3</sup> Tachyzoites

<sup>4</sup> Bradyzoites

<sup>5</sup> Tissue cysts

<sup>6</sup> Sporozoites

<sup>7</sup> Oocysts

<sup>8</sup> Polymerase chain reaction (PCR)

<sup>9</sup> Mobile genetic elements

<sup>10</sup> Magnetic resonance imaging (MRI)

<sup>11</sup> TNF- $\alpha$

<sup>12</sup> NMRI

موش‌ها تزریق شد. با توجه به یافته‌های مطالعه قبلی ما [۱۰] در این مطالعه تا آخر هفته سوم پس از تزریق کیست به‌عنوان فاز حاد عفونت توکسوپلازما و پس از آن به‌عنوان فاز مزمن در نظر گرفته شد.

### درمان با کوتریموکسازول

به‌منظور درمان عفونت توکسوپلازما گوندی، کوتریموکسازول (۴۰۰ میلی‌گرم سولفامتوکسازول و ۸۰ میلی‌گرم تری‌متوپریم؛ شرکت دارویی کاسپین، ایران) به ۸۰۰ میلی‌لیتر از آب آشامیدنی معادل مصرف ۲۴ ساعت آب موش‌های سوری (برابر با ۹۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در ۲۴ ساعت) به مدت ۱۰ روز اضافه شد [۱۱]. دو گروه از موش‌های سوری با کوتریموکسازول تحت درمان قرار گرفتند (جدول ۱). درمان ده روز قبل از هفته چهارم و هشتم پس از تزریق کیست آغاز شد. دو گروه دیگر هم به‌عنوان گروه کنترل هم‌سن بدون درمان، در نظر گرفته شد. موش‌ها در زمان تزریق کیست و ده روز پس از درمان با کوتریموکسازول، توزین شدند و بعد از قربانی کردن مغز آن‌ها جدا و در نیتروژن مایع نگهداری شد.

### انجام RT-qPCR

یکی از روش‌های بسیار دقیق و کاربردی برای انجام کمی فرایند real time-PCR، استفاده از پلاسمیدهای حاوی ژن هدف می‌باشد. در این تکنیک پلاسمید حاوی ژن هدف ساخته شده، تعداد دقیق پلاسمید در هر میکرولیتر بدست آمده و از آن برای تهیه منحنی استاندارد استفاده می‌شود. برای اندازه‌گیری کاملاً کمی<sup>۱۶</sup>، دو قطعه  $TNF-\alpha$  و REP-529 در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد (داده‌ها و نتایج ارائه نشده است). به‌طور خلاصه، پس از تعیین غلظت هر پلاسمید، و با داشتن تعداد دقیق نوکلئوتیدهای هر پلاسمید، مقادیر پلاسمید موجود برای هر یک از پلاسمیدهای نوترکیب محاسبه شد [۱۲]. نمونه DNA و RNA مغز موش‌ها تخلیص شد و cDNA از نمونه‌های RNA سنتز شد. با تهیه سه غلظت دقیق از هر پلاسمید و انجام RT-qPCR مقادیر دقیق و کمی رونویسی ژن  $TNF-\alpha$  میزبان، و همچنین تغییرات مقادیر DNA ژنومی انگل توکسوپلازما به کمک توالی تکراری REP-529، در دو فاز حاد و مزمن عفونت مورد سنجش مطلق قرار گرفت.

موسکولوس<sup>۱۳</sup> (۲۰ تا ۲۵ گرمی، انستیتو پاستور تهران، تعداد ۹۸ سر) در گروه‌های ۷ تایی در قفس‌های پلی پروپیلنی استاندارد قرار داده شد و در حیوانخانه‌ای با دما ( $23 \pm 2/0^{\circ}C$ ) و دوره‌های روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (۶:۰۰ تا ۱۸:۰۰) کنترل شده نگهداری شدند. تمامی حیوانات یک هفته قبل از شروع مطالعه در حیوانخانه جهت سازگاری با محیط جدید نگه داشته شدند. جهت جلوگیری از تأثیرات تغییرات وابسته به دوره جنسی، از جنس نر موش‌ها در مطالعه استفاده شد. حیوانات به‌صورت تصادفی گروه‌بندی شده و هر حیوان فقط یک بار در آزمایشات استفاده شد. تمام آزمایشات در دوره روشنایی و مطابق با راهنمایی‌های کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران<sup>۱۴</sup> و راهنمایی‌های<sup>۱۵</sup> ECCD ۲۴ نوامبر ۱۹۸۶ (86/609/EEC) جهت به حداقل رساندن تعداد حیوانات و درد آن‌ها انجام گرفت. این مطالعه دارای مصوبه کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران (نامه شماره ۱۳۰۸۵-۲۰۱-۹۳، سال ۱۳۹۳) می‌باشد.

### ایجاد توکسوپلازما

جهت ایجاد توکسوپلازما از کیست توکسوپلازما گوندی سوش تهران استفاده شد. این سوش از تیپ نوع II انگل بوده و در سال ۱۳۵۲ (۱۹۷۳) به‌وسیله دکتر قربانی و سامی از لنفادنیت یک بیمار جدا شده است [۱۰]. این تیپ از انگل در موش سوری منجر به ایجاد کیست مغزی و انسفالیت-مشابه انسفالیت توکسوپلاسمایی در انسان-می‌شود. کیست از کتابخانه بیولوژیک بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور تهیه شد. گروه‌های مورد آزمایش مطابق جدول ۱ تقسیم‌بندی شد و برای آلوده‌سازی موش‌های سوری تعداد ۱۰ کیست به‌صورت داخل صفاقی به

جدول ۱- جدول زمانی گروه‌های مورد مطالعه

هفته عفونت	۰	۱	۲	۳	۴	۸
اندازه‌گیری REP-529	*	*	*	*	*	*
اندازه‌گیری $TNF-\alpha$	*	*	*	*	*	*
درمان با کوتریموکسازول، بررسی وزن و انجام RT-qPCR	*	*				

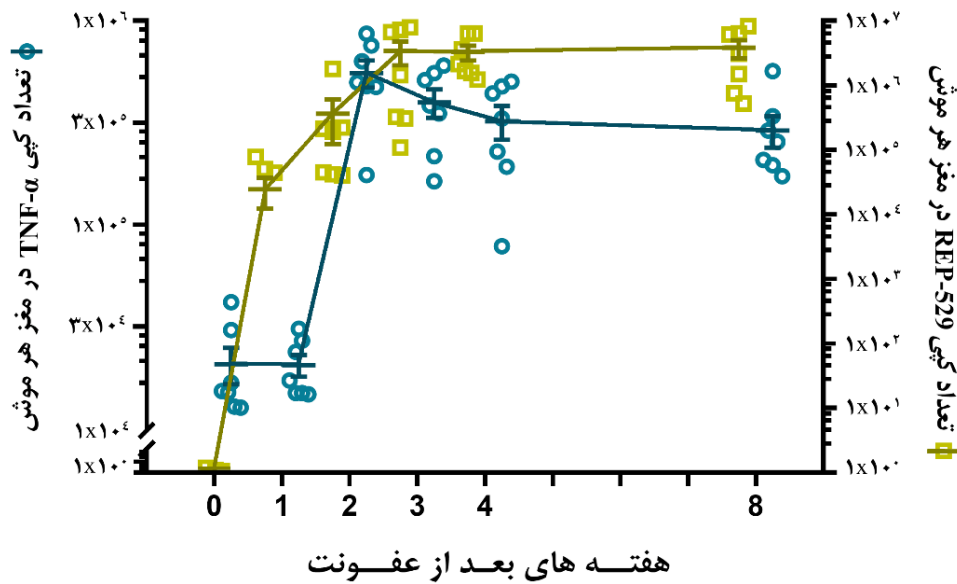
تعداد ۷ سر موش در هر گروه

<sup>13</sup> Mus musculus

<sup>14</sup> Institutional Animals Ethics Committee of Pasteur Institute of Iran

<sup>15</sup> European Communities Council Directive

<sup>16</sup> Absolute quantification



**نمودار ۱-** روند تکثیر توکسوپلازما گوندی و رونویسی TNF-α در مغز موش سوری. میزان رونویسی TNF-α و تعداد توالی قطعه REP-529 در مغز موش‌های سوری آلوده به توکسوپلازما گوندی سویه تهران در هفته‌های مختلف پس از شروع عفونت با استفاده از RT-qPCR اندازه‌گیری شد. هر نقطه نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (تعداد موش ۷ سر در هر گروه). داده‌های مربوط به مقادیر TNF-α و قطعه ژنومی REP-529 به صورت واحد لگاریتمی نشان داده شده‌اند.

حدودی کاهش یافته به طوری که میزان رونویسی در هفته ۸ عفونت به  $10^5 \times 2/89$  کپی در مغز (تقریباً دو برابر کمتر) رسیده بود که هنوز بیشتر از ده برابر هفته‌های اول و دوم بود (نمودار ۱).

### درمان با کوتریموکسازول منجر به کاهش مقادیر قطعه REP-529 شد

نتایج حاصل از RT-qPCR نشان داد که درمان با کوتریموکسازول مقادیر قطعه REP-529 DNA را در هر دو گروه موش‌های آلوده هفته ۴ و ۸ بعد از عفونت، در مقایسه با موش‌های آلوده هم سن به طور قابل توجهی ( $p < 0/05$ ) کاهش می‌دهد. کاهش میانگین برای توالی REP-529 ۱۰ برابر بود. با این حال، هنوز توالی REP-529 در تمام موش‌های درمان شده قابل تشخیص بود (نمودار ۲الف).

### درمان با کوتریموکسازول منجر به کاهش رونویسی TNF-α شد

درمان با کوتریموکسازول در دوره زمانی عفونت حاد و مزمن به طور معنی‌داری (به ترتیب،  $p < 0/001$  و  $p < 0/01$ ) منجر به کاهش مقادیر رونویسی TNF-α شد. همچنین مقادیر رونویسی TNF-α در موش‌های درمان شده

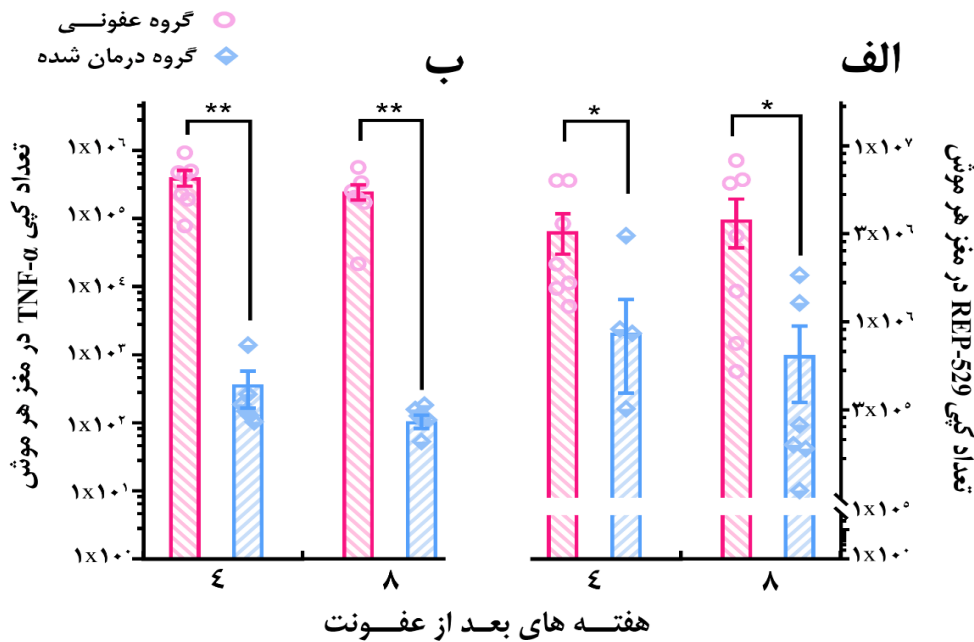
## یافته‌ها

### تظاهرات بالینی در موش‌های آلوده

چندین موش سوری بیمار در عرض ۳ هفته پس از تزریق کیست مردند. پس از تزریق کیست، آبسه و آسیت<sup>۱۷</sup> شدید در ناحیه شکمی موش‌های سوری مشاهده شد. بعد از هفته سوم عفونت، مرگ و میر به ندرت مشاهده شد. اندازه‌گیری تعداد کپی توالی تکراری REP-529 نشان داد در هفته اول انگل وارد مغز شده و توالی REP-529 در سه موش از هفت موش قابل تشخیص است ( $10^4 \times 2/46$  کپی در مغز). با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که تاکی‌زوایت‌ها در مغز حضور دارند. مقادیر توالی REP-529 در هفته دوم و سوم به سرعت افزایش یافته و به ترتیب به  $10^5 \times 3/63$  و  $10^6 \times 3/41$  کپی در مغز (۱۳۸ برابر نسبت به هفته اول عفونت) رسید و تقریباً تا هفته هشتم عفونت به صورت تغییر نیافته باقی ماند (نمودار ۱).

بررسی میزان رونویسی ژن TNF-α نشان داد که رونویسی این ژن از روز اول عفونت تا هفته اول عفونت در مغز تقریباً هیچ تغییری ( $10^4 \times 2/06$  کپی در مغز) نداشته است. رونویسی ژن TNF-α در هفته دوم به اوج خود رسیده و بیش از ۲۶ برابر افزایش یافت و به میزان  $10^5 \times 5/54$  کپی در مغز رسیده است. در هفته سوم و هفته‌های بعد از آن میزان رونویسی آن تا

<sup>17</sup> Ascites



**نمودار ۲-** تاثیر کوتریموکسازول بر تکثیر انگل و رونویسی TNF- $\alpha$  در مغز موش سوری. الف) میزان تکثیر انگل با استفاده از توالی REP-529 و ب) میزان رونویسی TNF- $\alpha$  بعد از درمان با کوتریموکسازول در هفته چهارم و هشتم توکسوپلاسماز در مغز موش‌های سوری با استفاده از RT-qPCR اندازه‌گیری شد. هر نقطه نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (تعداد موش ۷ سر در هر گروه). داده‌های مربوط به مقادیر TNF- $\alpha$  به صورت واحد لگاریتمی نشان داده شده‌اند. \* $p < 0.05$  و \*\* $p < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل بدون درمان هم‌سن.

درمان آنتی بیوتیکی بوسیله کوتریموکسازول در کنترل انگل و تاثیرات آن در کنترل TNF- $\alpha$  به‌عنوان یکی از سایتوکاین‌های اصلی التهابی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که توکسوپلاسما گوندی به سرعت وارد مغز شده و منجر به القا سیستم التهابی می‌شود. همچنین درمان توکسوپلاسماز با کوتریموکسازول تکثیر انگل را متوقف کرده و از پاسخ‌های التهابی شدید در مغز موش‌های آلوده جلوگیری می‌کند.

توکسوپلاسما گوندی از لحاظ بیماری‌زایی به سه تیپ طبقه‌بندی می‌شود. سویه‌های تیپ I انگل که شامل سوش RH می‌باشد بسیار کشنده بوده و قبل از تشکیل کیست، در عرض چند روز میزبان خود را از بین می‌برد [۱۳]. سویه‌های تیپ II و III تا حدودی غیرکشنده هستند. بنابراین، سویه‌های نوع II برای مطالعه اثرات پاتولوژیک توکسوپلاسماز در مغز مناسب هستند. هر چند سویه‌های تیپ II که شامل سوش تهران است در موش‌ها غیرکشنده بوده و عفونت در آن‌ها با تشکیل کیست همراه است [۱۳، ۱۴]. اما مطالعات قبلی ما نشان داده بود که عفونت با سوش تهران در موش‌های سوری NMRI توام با علائم شدید و مرگ و میر در فاز حاد عفونت است [۱۰]. در این مطالعه پس از تزریق کیست، آبسه و افزایش وزن غیرطبیعی

کمتر از موش غیرآلوده سالم هم‌سن بود. به‌طوری‌که مقادیر رونویسی TNF- $\alpha$  در موش‌های سالم  $2/06 \times 10^4$  کپی در مغز بود در حالی که بعد از درمان رونویسی آن به کمتر از ۱۰۰۰ کپی کاهش پیدا کرده بود (نمودار ۲ب).

### درمان با کوتریموکسازول منجر به وزن‌گیری موش‌های سوری شد

درمان با کوتریموکسازول در هر دو دوره زمانی عفونت حاد و مزمن منجر به وزن‌گیری بهتر در موش‌های سوری آلوده به توکسوپلاسما شد. با این حال میزان افزایش وزن فقط در موش‌های سوری دارای عفونت حاد درمان‌شده با کوتریموکسازول (میانگین وزن:  $1/0 \pm 37/7$  گرم) به طور معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) بیشتر از گروه آلوده درمان‌نشده (میانگین وزن:  $2/0 \pm 27/8$  گرم) هم‌سن بود (نمودار ۳).

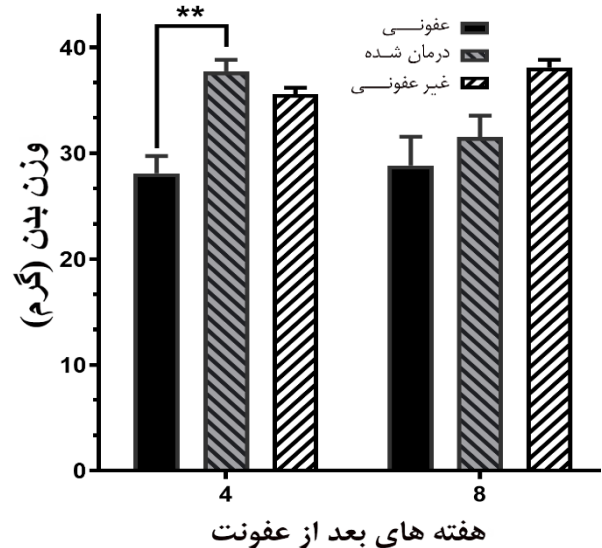
### بحث

در این مطالعه روند ورود توکسوپلاسما گوندی به مغز و تکثیر آن و همچنین تاثیر آن در القا سیستم التهابی به‌واسطه TNF- $\alpha$  در دوره ای ۸ هفته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر



بین هفته‌های دوم و سوم پاسخ مناسب به‌وسیله سیستم ایمنی میزبان ایجاد شده و در نتیجه آن رشد انگل کنترل شده است. کوتریموکسازول از ترکیب دو آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم<sup>۱۹</sup> و سولفامتوکسازول<sup>۲۰</sup> (از گروه سولفونامیدها<sup>۲۱</sup>) ساخته شده است. این دارو از طریق دو مکانیسم متفاوت متابولیسم اسید فولیک را مختل می‌کند. کوتریموکسازول یک ترکیب دارویی موثر و رایج جهت درمان توکسوپلاسموز در جوندگان و انسان می‌باشد [۱۸، ۱۹]. این آنتی‌بیوتیک به خوبی رشد و فعالیت توکسوپلاسم را کنترل می‌کند. در مطالعه ما تجویز ۱۰ روزه کوتریموکسازول در هفته چهارم و هشتم عفونت، به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش مقادیر توالی REP-529 شد. همچنین دوره درمانی یاد شده به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش رونویسی TNF- $\alpha$  شد. به نظر می‌رسد که درمان به‌طور موفقیت‌آمیزی فعالیت مجدد کیست‌ها را مهار کرده است و با جلوگیری از تکثیر انگل منجر به کاهش شدید میزان رونویسی ژن TNF- $\alpha$  شده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر رونویسی TNF- $\alpha$  در موش‌های درمان‌شده حتی کمتر از موش غیرآلوده سالم هم سن بود. مطالعات نشان داده است که کوتریموکسازول جزو آنتی‌بیوتیک‌هایی است که غلظت‌های بالینی آن ترشح TNF- $\alpha$  را سرکوب می‌کند [۲۰]. بنابراین، این احتمال وجود دارد که کوتریموکسازول مستقیماً و بدون دخالت در رشد انگل منجر به کاهش رونویسی TNF- $\alpha$  شده باشد. همچنین نتایج نشان داد که درمان ۱۰ روزه منجر به بهبود عوارض بیماری و وزن‌گیری موش‌ها می‌شود. ولی این افزایش وزن فقط در گروهی که دارای آلودگی حاد بودند منجر به افزایش معنی‌دار شد. طبق جدول وزن‌گیری موسسه تاکنونیک بیوساینس<sup>۲۲</sup> موش‌های سوری NMRI تا هفته‌های ۱۲ بعد از تولد افزایش وزن را تجربه می‌کنند. در مطالعه ما موش‌ها در شروع درمان در فاز حاد تقریباً ۷ هفته ای (۴۶ روزه) و جوان هستند در حالی که سن آن‌ها در شروع درمان فاز مزمن در حدود ۱۴ هفته (۹۵ روزه) می‌باشد. از این رو شاید یکی از دلایل عدم وزن‌گیری مناسب در فاز مزمن پیری موش‌ها بوده باشد. به‌نظر می‌رسد با توجه به مکانیسم اثر کوتریموکسازول، کاهش و یا مهار سنتز DNA انگل را می‌توان یکی دیگر از عوامل وزن‌گیری و رشد موش‌ها دانست. نتایج



**نمودار ۳-** تاثیر درمان با کوتریموکسازول بر وزن موش‌های آلوده. وزن موش‌ها بعد از درمان با کوتریموکسازول در هفته چهارم و هشتم توکسوپلاسموز اندازه‌گیری شد. هر نقطه نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (تعداد موش ۷ سر در هر گروه). \*\*\* $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل بدون درمان هم سن.

به علت آسیب شدید در موش‌های سوری مشاهده شد و همچنین چندین موش سوری بیمار در فاز حاد عفونت مردند. یافته‌های مولکولی هم ایجاد آلودگی شدید را تایید می‌کند به‌طوری‌که عفونت با تکثیر گسترده انگل همراه بود و توکسوپلاسماز همان هفته اول وارد مغز شده و تکثیر پیدا می‌کند. همچنین بررسی مقادیر TNF- $\alpha$  نشان داد که آلودگی منجر به افزایش شدید و ۲۶ برابری در مقادیر این سایتوکاین پیش‌تهابی در مغز شده است که نشان‌دهنده ایجاد التهاب گسترده در سیستم عصبی مرکزی است. TNF- $\alpha$  یک سایتوکاین ضدالتهابی است که توسط ماکروفاژهای فعال‌شده و سلول‌های نوع Th1 ترشح می‌شود و در پاسخ‌های ایمنی میزبان در برابر انگل‌ها دخیل است [۱۶، ۱۵]. میزبان به‌واسطه ایمنی سلولی نوع Th1<sup>۱۸</sup> و تولید سایتوکاین‌های التهابی در برابر عفونت توکسوپلاسماز مقاومت می‌کند. نقش TNF- $\alpha$  در هنگام آلودگی به انگل‌ها تا حد زیادی به سویه انگل، وضعیت عفونت و میزان TNF- $\alpha$  ناشی از آن بستگی دارد [۱۷]. در این مطالعه بعد از هفته دوم که اوج واکنش التهابی دیده شد التهاب کاهش یافت، به‌طوری‌که مقادیر TNF- $\alpha$  در هفته هشتم عفونت تا نصف میزان آن در هفته دوم عفونت کاهش یافته بود. این در حالی بود که در همین دوره زمانی مقادیر انگل در مغز (از هفته سوم تا هشتم) تقریباً ثابت باقی مانده بود. به نظر می‌رسد

<sup>19</sup> Trimethoprim

<sup>20</sup> Sulfamethoxazole

<sup>21</sup> Sulfonamides

<sup>22</sup> Taconic Biosciences

<sup>18</sup> T helper

در درمان توکسوپلاسموز تجربی در موش‌های سوری NMRI را تأیید می‌کند.

### تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

### نقش نویسندگان

ج.ب.: انجام مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله؛ م.س.: ایده و نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ م.گ.: نظارت بر حسن اجرای مطالعه.

مطالعات قبلی نشان داده است که به‌دنبال درمان آنتی‌بیوتیکی با کوتریموکسازول نه تنها رونویسی ژن *BAG1* (آنتی‌ژن اختصاصی برادی‌زوایت) و تکثیر برادی‌زوایت‌ها توقف می‌شود [۱۰] بلکه با توجه به کاهش معنی‌دار تعداد قطعه ژنومی-REP-529 تعداد انگل را نیز کم می‌کند [۱۰]. با تمام این توصیفات افزایش وزن به‌واسطه درمان آنتی‌بیوتیکی را می‌توان ناشی از اثر همزمان کاهش تکثیر انگل، سن حیوانات مورد آزمایش و همچنین مهار پاسخ سیستم ایمنی در مغز دانست.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های حاضر، نشان داد که تکثیر انگل و پاسخ‌های التهابی شدید متعاقب آن نقش بسزایی در بیماری‌زایی توکسوپلاسموز بازی می‌کنند. همچنین این نتایج، کارایی بالای کوتریموکسازول

### فهرست منابع

- [1] Daryani A, Sarvi S, Aarabi M, Mizani A, Ahmadpour E, Shokri A, Rahimi MT, Sharif M, Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Iranian general population: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 137 (2014) 185-194.
- [2] Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA, Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 2 (1998) 267-299.
- [3] Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, Dumon H, Peyron F, Thulliez P, Picot S, Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obst Gynecol* 3 (2004) 797-802.
- [4] Subauste C, Animal models for *Toxoplasma gondii* infection. *Curr Protoc Immunol* 19.3 (2012) 1-23.
- [5] Da Silva RC and Langoni H, *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Res* 4 (2009) 893-898.
- [6] Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ, The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 1 (2011) 31-40.
- [7] Alyu F, Dikmen M, Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms. *Acta Neuropsychiatr* 1 (2017) 1-16.
- [8] Olmos G, Llado J, Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* (2014) 861231.
- [9] Gahring LC, Carlson NG, Kulmar RA, Rogers SW, Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain. *Neuroimmunomodulation* 5 (1996) 289-30.
- [10] Babaie J, Sayyah M, Fard-Esfahani P, Golkar M, Gharagozli K, Contribution of dopamine neurotransmission in proconvulsant effect of *Toxoplasma gondii* infection in male mice. *J Neurosci Res* 95 (2017) 1894-1905.
- [11] Hawk CT, Leary SL, Morris TH, American College of Laboratory Animal Medicine and European College of Laboratory Animal Medicine. *Formulary for laboratory animals*. 3rd ed. 2005, Ames, Iowa: Blackwell Pub. ix, 203 p.
- [12] Staroscik A. *Copy number calculator for real-time PCR*. 2016; Available from: <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>.
- [13] Tavalla M, Oormazdi H, Akhlaghi L, Shojae S, Razmjou E, Hadighi R, Meamar A, Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from soil samples in Tehran, Iran. *Iran J Parasitol* 2 (2013) 227-233.
- [14] Ghorbani M, Samii AH, Toxoplasmic lymphadenitis in Iran. *J Trop Med Hyg* 7 (1973) 158-160.
- [15] Munoz-Carrillo JL, Munoz-Escobedo JJ, Maldonado-Tapia CH, Chavez-Ruvalcaba F, Moreno-Garcia MA, Resiniferatoxin lowers TNF-alpha, NO and PGE2 in the intestinal phase and the parasite burden in the muscular phase of *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol* 39 (2017) e12393.
- [16] Degbe M, Debierre-Grockieo F, Tete-Benissan A, Debare H, Aklikokou K, Dimier-Poisson I, Gbeassor M, Extracts of *Tectona grandis* and *Vernonia amygdalina* have anti-Toxoplasma and pro-inflammatory properties in vitro. *Parasite* 25 (2018) 11.
- [17] El-Sayed NM, Ismail KA, Badawy AF, Elhasanein KF, In vivo effect of anti-TNF agent (etanercept) in reactivation of latent toxoplasmosis. *J Parasit Dis* 4 (2016) 1459-1465.
- [18] Nguyen BT, Stadtsbaeder S, Comparative effects of cotrimoxazole (trimethoprim-sulphamethoxazole), pyrimethamine-sulphadiazine and spiramycin during avirulent infection with *Toxoplasma gondii* (Beverley strain) in mice. *Br J Pharmacol* 4 (1983) 923-928.
- [19] Beraud G, Pierre-Francois S, Foltzer A, Abel S, Liautaud B, Smadja D, Cabie A, Cotrimoxazole for

treatment of cerebral toxoplasmosis: an observational cohort study during 1994-2006. *Am J Trop Med Hyg* 4 (2009) 583-587.  
[20] Vickers IE, Smikle MF, The immunomodulatory effect

of antibiotics on the secretion of tumour necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in response to *Stenotrophomonas maltophilia* stimulation. *West Indian Med J* 3 (2006) 138-141.



## Research paper

**Effect of co-trimaxazole on REP-529 and TNF- $\alpha$  transcription levels in the brain of *Toxoplasma gondii* infected-mice**

Jalal Babaie\*, Mohammad Sayyah\*, Majid Golkar

*Molecular Parasitology Laboratory, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran  
Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

Received: 7 August 2019

Accepted: 16 September 2019

**Abstract**

**Background and aims:** Toxoplasmosis is a globally prevalent parasitic infection caused by *Toxoplasma gondii*. A flu-like syndrome is seen in the acute phase of infection with no obvious symptoms in the chronic phase. In this study effect of co-trimaxazole on parasite load and inflammation in the brain of infected mice was examined.

**Methods:** Mice were infected by intraperitoneal injection *T. gondii* cysts. Transcription of REP-529 (as indicator of parasite load) and TNF- $\alpha$  (as indicator of inflammation) were measured in the mice brain by RT-qPCR, at weeks 1-8 after injection of cysts, and after treatment with co-trimaxazole. Co-trimaxazole was administered 10 days before the weeks 4 and 8 of the infection for 10 days.

**Results:** Severe ascites was observed during 4-14 days after injection of cysts. The REP-529 transcription level indicates that the parasite enters the brain 1 week after cyst injection and proliferated rapidly in the second and third weeks. TNF- $\alpha$  level increased and reached the maximum level in the second week and then decreased in the next weeks. Co-trimaxazole significantly reduced transcription of both REP-529 and TNF- $\alpha$  during 4 and 8 weeks of infection. Co-trimaxazole caused significant ( $p < 0.01$ ) weight gain in mice at the week 4 of infection compared to the untreated group.

**Conclusion** We found chronic administration of co-trimaxazole to mice infected by *T. gondii* can inhibit parasite proliferation and inflammation in the brain and cure the disease.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; Co-trimaxazole; TNF- $\alpha$ ; REP-529

**Please cite this article as follows:**

Babaie J, Sayyah M, Golkar M, Effect of co-trimaxazole on Rep-529 and TNF- $\alpha$  transcription levels in the brain of *Toxoplasma gondii* infected-mice. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 99-107.

\*Corresponding authors:

jalalbabaie@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4989-5998)

sayyahm2@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0003-0603-2444)