Archive of SID

تغییرات شاخص‌های کبدی در موش‌های آلوده به توکسوپلاسما گوندیی سویهRH

دکتر عبدالحسین دلیمی اصل[1] ، اکرم فرهادی مفتخر[2] ، فرشته زارع سورکالی[2] ، دکتر محمود شریفیان[3]

۱- استاد گروه انگل شناسی, دانشکده علوم پزشکی, دانشگاه تربیت مد رس

۲- کارشناس ارشد انگل شناسی, دانشکده علوم پزشکی, دانشگاه تربیت مدرس

۳- متخصص انگل شناسی, دانشکده علوم پزشکی , دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت۸٤/۱/۲۹ ، تاریخ پذیرش۸٤/۵/۹

چکیده

مقدمه: توکسوپلاسموز نوعی بیماری انگلی است که توسط تک یاخته توکسوپلاسما گوندیی ایجاد می‌شود. مهاجرت توکسوپلاسما به خون و سایر بافت‌های بدن مانند کبد و تکثیر انگل در این سلول‌ها، ممکن است باعث بروز تغییرات فیزیولوژیک سلولی و بیوشیمیایی در بدن از جمله کبد شود. در نتیجه شاخص‌هایی از قبیل اوره، بیلی روبین ، پروتئین تام و آلبومین ممکن است تغییر نمایند. در این تحقیق تغییرات ایجاد شده در برخی از شاخص‌های کبدی طی آلودگی تجربی رت به توکسوپلاسما گوندیی مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش کار: تعداد ۸۰ سر رت و٦۰ سر موش سوری عاری از آلودگی انتخاب شدند. رت‌ها به دو گروه ٦۰ سر رت مورد و ۲۰ سر رت شاهد تقسیم شدند. گروه مورد با تزریق ۵۰۰۰۰ عدد تاکی زوئیت از طریق داخل صفاقی آلوده شدند و هر سه روز یک‌بار تا مدت ٦۰ روز از یک گروه سه تایی مورد به همراه یک رت از گروه شاهد نمونه‌برداری و میزان سطوح مقادیر پروتئین تام، آلبومین، بیلی روبین و اوره با روش‌های استاندارد بررسی شد. علاوه بر این کبد رت‌های آلوده از لحاظ آلودگی به توکسوپلاسما با روش تلقیح داخل صفاقی موش سوری مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده، انگل از روز ششم آلودگی در بافت کبد ظاهر و تا روز بیست و هفت قابل مشاهده بود که پس از این مدت انگل از کبد محو گردید. اوره از روز ششم بعد از آلودگی شروع به افزایش کرد که این افزایش تا روز شصتم ادامه داشت. بیلی روبین تام از روز ششم تا بیست و هفتم و پروتئین تام و آلبومین سرم از روز ششم تا دوازدهم دچار افزایش و از آن به بعد یعنی تا روز شصتم تا مقدار طبیعی دچار کاهش شدند.

نتیجه گیری: بطور کلی آلودگی رت به توکسوپلاسموزیس می‌تواند سبب ایجاد تغییرات موقت در برخی شاخص‌های بیوشیمیایی کبد شود. این تغییرات عمدتاً به علت عبور انگل از بافت کبد است. متعاقب استقرار انگل در مغز و یا عضلات و تشکیل کیست نسجی این تغییرات روند طبیعی بخود می‌گیرند.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسما گوندیی، پروتئین تام، آلبومین، بیلی روبین، اوره، رت

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

توکسوپلاسموز نوعی بیماری انگلی است که توسط تک یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکسا بنام توکسوپلاسما گوندیی ایجاد می‌شود(۱، ۲). انسان از دو راه اکتسابی و مادرزادی به این بیماری مبتلا می‌گردد. توکسوپلاسموزیس اکتسابی در افراد دارای سیستم ایمنی سالم، بیماری خفیف یا بدون علائم ایجاد می‌کند ولی در افراد با اختلال سیستم ایمنی، عوارض و علائم شدید و حتی مرگ را باعث می‌شود(۳). توکسوپلاسموزیس مادرزادی زمانی بروز می‌کند که مادر طی دوران بارداری به توکسوپلاسما مبتلا و یا دچار ضعف سیستم ایمنی گردد. این انتقال انگل از جفت به جنین، عوارض شدیدی به دنبال دارد (۳).

امروزه به دلیل افزایش مبتلایان به ایدز و سایر بیماری‌های نقص سیستم ایمنی، دریافت کنندگان پیوند و مصرف کنندگان داروهای سرکوب کننده ایمنی، اهمیت توکسوپلاسموزیس نیز افزایش یافته است. لذا شناخت میزان تاثیر توکسوپلاسما بر بافت‌ها از جمله تاثیر انگل بر کبد می‌تواند راه گشای شناخت بیشتر ارتباط انگل- میزبان باشد(٤،٥). ورود توکسوپلاسما به خون و سایر بافت‌های بدن مانند کبد و تکثیر انگل در این سلول‌ها، ممکن است باعث بروز تغییرات فیزیولوژیک سلولی و بیوشیمیایی در بدن از جمله کبد شود، در نتیجه ممکن است شاخص‌هایی از قبیل پروتئین تام، آلبومین، بیلی روبین و اوره تغییر نمایند. الگوی تغییرات سرمی این شاخص‌ها طی آلودگی میزبانان مختلف از جمله انسان به توکسوپلاسما گوندیی کاملاً مشخص نیست. مهم‌ترین علت این ابهام این است که در واقع زمان دقیق شروع آلودگی انسان به توکسوپلاسما نامشخص است و علائم بیماری هنگامی ظهور می‌کند که از شروع آلودگی زمان زیادی گذشته است. از طرفی مطالعات بر روی این شاخص‌ها در حیوانات آلوده به توکسوپلاسموز نیز بسیار محدود و کم است. یکی از مطالعات انجام شده در این زمینه مطالعه گایک وارد و روت[1] است که بر روی جوجه‌های آلوده شده به صورت تجربی انجام شده است(٦). از آنجایی که در میان حیوانات آزمایشگاهی، توکسوپلاسموز در موش صحرائی (رت) روندی بسیار مشابه انسان دارد، رت مدل حیوانی مناسبی برای بررسی توکسوپلاسموزیس انسانی بشمار می‌آید(۷، ۸). همچنین از سویه RH توکسوپلاسما که یک سویه استاندارد و بیماری‌زاست استفاده گردید. در این تحقیق تغییرات ایجاد شده در شاخص‌های کبدی نظیر پروتئین تام، آلبومین، بیلی روبین و اوره و هم‌چنین زمان حضور انگل در کبد طی آلودگی تجربی رت به توکسوپلاسما گوندیی مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش کار

این بررسی، مطالعه‌ای تجربی می‌باشد که طی آن تعداد ۸۰ سر رت و٦۰ سر موش سوری عاری از آلودگی، با فراهم نمودن غذا و پوشال اتوکلاو شده تکثیر شدند. این موش‌ها پس از آزمایش Dye Test همگی از لحاظ آلودگی به توکسوپلاسما منفی بوده‌اند و در طول آزمایش با بستر، غذا و آب اتوکلاو شده، نگهداری می‌شدند. ٦۰ سر رت به عنوان گروه مورد، در ۲۰ گروه سه تایی تقسیم شدند و برای هر گروه مورد یک سر رت شاهد نیز در نظر

[1]- Gaikward and Rote.

www.SID.ir

Archive of SID

گرفته شد. رت‌های شاهد از نظر سن و شرایط فیزیولوژیک بدن مشابه رت‌های مورد بودند.

جهت آلوده سازی حیوانات، در این پژوهش از تاکی زوئیت‌های سویهRH توکسوپلاسما گوندیی استفاده شد که قبل از تزریق، با پاساژ دادن در حفره صفاقی موش‌های سوری به تعداد کافی تکثیر شدند(۹). ۶۰ سر رت مورد، طی یک روز از طریق داخل صفاقی با ۵۰-۴۰ هزار توکسوپلاسما گوندیی آلوده شدند و ۲۰ سر رت غیر آلوده به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند(۱۰).

طی ۶۰ روز، هر سه روز یک بار از سه رت مورد و یک رت شاهد خون‌گیری به عمل آمد و از سرم جدا شده مقادیر پروتئین تام، آلبومین، بیلی روبین و اوره آنها اندازه‌گیری شد. تعیین مقادیر پروتئین تام و آلبومین سرم با استفاده از کیت زیست شیمی، بیلی‌روبین با استفاده از کیت آزمایشگاهی درمان کاو و اوره با کیت پارس آزمون انجام شد که با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و نتایج حاصله ثبت شد.

در این بررسی برای شناسایی آلودگی اندام‌های مختلف رت نظیر کبد در مدت زمان ۶۰ روز، از روش تلقیح اندام‌ها به صفاق موش سوری استفاده شد. هر بار بعد از انجام خون‌گیری، سه سر رت مورد، توسط کلروفرم کشته و قفسه سینه آنها باز شده و سرم فیزیولوژی به داخل آئورت آنها انفوزیون می‌شد. بدین ترتیب خون از رگ‌ها خارج و اطمینان حاصل می‌شد که در صورت وجود آلودگی، این آلودگی مربوط به خود بافت می‌باشد. پس از انفوزیون رت‌ها، بافت کبد جدا، با سرم فیزیولوژی شستشو و با استفاده از تیغ بیستوری کاملا تکه تکه گردید. نمونه‌ها در هاون له و به نسبت ۱/۲۰ با سرم فیزیولوژی استریل مخلوط شد. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و ایجاد اختلال در آزمایش به مخلوط حاصل آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی سیلین به اندازه ۱۰۰ میلی گرم برای هر میلی‌لیتر محلول اضافه و بعد از حل شدن آنتی‌بیوتیک‌ها، عصاره حاصله به صورت داخل صفاقی به سه موش سوری تزریق می‌شد(۱۱).

در زمانی که علائم بیماری مانند بی اشتهایی، لاغری، خواب آلودگی، ژولیدگی موها و کز کردن حیوان ظاهر می‌شد از مایع صفاقی سوری نمونه‌برداری صورت می‌گرفت. بعد از سانتریفوژ، رسوب حاصله در زیر میکروسکوپ از لحاظ وجود یا عدم وجود انگل بررسی و در صورت منفی بودن لام با رنگ گیمسا رنگ شده و مجدداً مورد بررسی قرار می‌گرفت.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از اندازه‌گیری مقادیر مختلف، پس از محاسبه میانگین و خطای معیار، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و روش LSD برای مقایسه میانگین‌ها، توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ استفاده گردید.

نتایج

طبق نتایج به دست آمده از تلقیح کبد رت‌های آلوده به موش‌های سوری، انگل از روز ششم آلودگی در بافت کبد ظاهر و تا روز ۲۷ قابل مشاهده بود. پس از این مدت انگل از کبد محو گردید. لذا برای سهولت اعلام نتایج، دوره حضور انگل در کبد به سه دوره، دوره اول: عدم حضور انگل در کبد(۵-۱ روز پس از آلودگی)، دوره دوم: حضور انگل در کبد (۲۷-۶ روز پس از آلودگی) و

www.SID.ir

Archive of SID

دوره سوم: عدم حضور انگل در کبد (۲۸ روز پس از آلودگی به بعد) تقسیم گردید.

در جدول (۱) تغییرات مقادیر سرمی تست‌های کبدی در رت های آلوده به توکسوپلاسما گوندیی در طول ٦٠ روز (طی سه دوره) نشان داده شده است. تغییرات مشاهده شده در شاخص‌های مختلف به شرح زیر است:

اوره: طبق جدول ۱ و نمودار ۱ مقدار اوره خون در رت‌های آلوده در دوره دوم نسبت به گروه شاهد و هم‌چنین نسبت به دوره اول افزایش نشان داده که این افزایش تا روز شصتم نمونه‌گیری ادامه داشت.

بیلی روبین تام: طبق جدول ۱ و نمودار ۲ مقدار بیلی روبین تام سرم در رت‌های آلوده در دوره حضور انگل در کبد (دوه دوم) نسبت به گروه شاهد و هم‌چنین نسبت به دوره اول و سوم افزایش یافته و در دوره سوم به حد طبیعی خود بازگشته است. اختلاف این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۵ >p).

حداکثر افزایش مشاهده شده بیلی روبین تام در روز ۱۲ آلودگی بوده است (۰/۸ ± ۰/۷٦).

آلبومین: بر طبق جدول ۱ و نمودار ٤ مقدار آلبومین سرم در رت‌های آلوده در نیمی از حضور انگل در کبد یعنی از روز ششم تا دوازدهم پس از آلودگی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داده و پس از آن کاهش یافت. آلبومین سرم در دوره سوم نسبت به دو دوره قبل کاهش نشان داد (جدول ۱). اختلاف این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۵ >p).

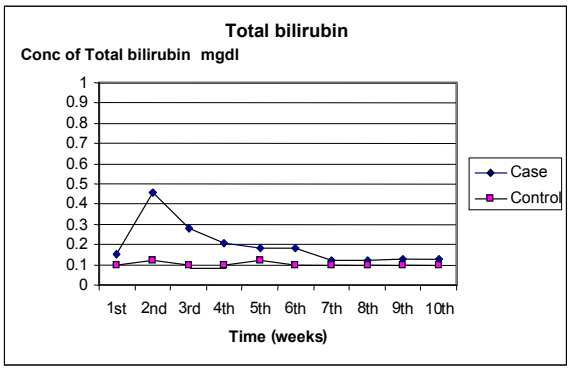
پروتئین تام: بر طبق جدول ۱ و نمودار ۳ مقدار پروتئین تام سرم در رت‌های آلوده از روز ششم تا دوازدهم پس از آلودگی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داده و پس از آن کاهش یافت. طبق جدول ۱ اختلاف این تغییرات در سه دوره از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۵ >p).

جدول ۱. تغییرات مقادیر سرمی تست‌های کبدی در رت های آلوده به توکسوپلاسما گوندیی در طول سه دوره

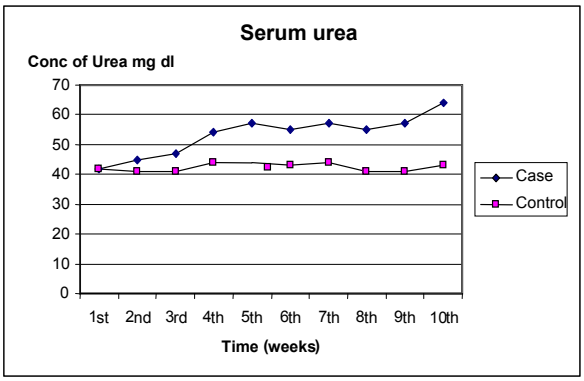
دوره	مدت (روز)	حضور انگل در کبد	اوره (mg/dl)		بیلی روبین تام (mg/dl)		پروتئین تام (mg/dl)		آلبومین (mg/dl)	
			رت آلوده	رت شاهد	رت آلوده	رت شاهد	رت آلوده	رت شاهد	رت آلوده	رت شاهد
اول	۱-۵	-	٤۲±۱	٤۲/±۰	/۱۳±۰/۰۳ ۰	۰/۱۰ ± ۰	۵/۲±۰/۲	٦/۲±۰	٤/٦±۰/۱	٤/۸±۰
دوم	٦-۲۷	+	٤۹±۱/٦	/٤٤±۱/۹ ٤۲	/۳۰±۰/۰۳۸ ۰	/۱۱±۰/۰۱ ۰	٦/۸±۰/۲	/۵±۰/۲٦ ٦	۵±۰/۱۳	/۹±۰/٤۲ ٤
سوم	٦۰- ۲۸	-	۵۷±۱/٦	/۲۰±۲/۱ ٤۳	/۱٦±۰/۰۰۵ ۰	/۱۱±۰/۰۱ ۰	۵/٦±۱۲	/۱۵±۰/۲۸ ٦	/٤±۰/۱۵ ٤	/۷±۰/۲۷ ٤

www.SID.ir

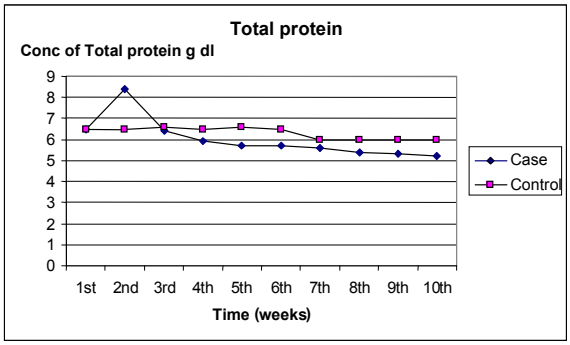
Archive of SID



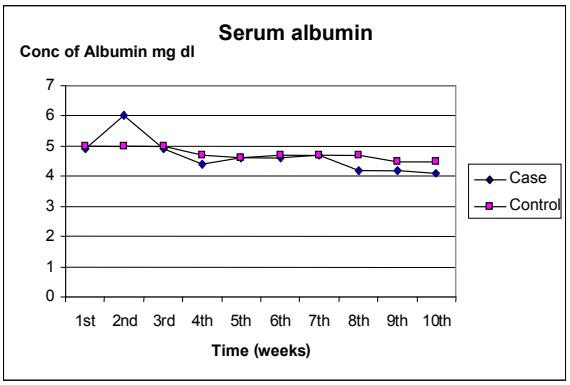
نمودار ۱. منحنی تغییرات مقادیر اوره در طول هفته‌های پس ازآلودگی درسرم رت‌های مورد مطالعه



نمودار ۲. منحنی تغییرات مقادیر بیلی روبین تام در طول هفته‌های پس از آلودگی درسرم رت‌های مورد مطالعه



نمودار ۳. منحنی تغییرات مقادیر پروتئین تام در طول هفته‌های پس از آلودگی درسرم رت‌های مورد مطالعه



نمودار ٤. منحنی تغییرات مقادیر آلبومین در طول هفته‌های پس از آلودگی درسرم رت‌های مورد مطالعه

بحث

تزریق توکسوپلاسما گوندیی به صفاق رت باعث تکثیر انگل در ماکروفاژهای صفاقی و ورود انگل به خون می‌شود. انگل سپس از طریق خون وارد اندام‌هایی از قبیل کبد می‌گردد. زمان ورود انگل و مدت زمان بقای آن در کبد چندان روشن نیست و تاکنون هیچ گزارشی در این مورد منتشر نشده است. در مطالعه حاضر از روش تلقیح بافت کبد به صفاق موش سوری استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده کبدهای رت روز ششم پس از آلودگی، موش‌های سوری را به توکسوپلاسما مبتلا ساختند. این نشان می دهد که از روز ششم پس از آلودگی، انگل در کبد رت حضور دارد و این حضور تا روز بیست و هفتم ادامه داشته است. نتایج این مطالعه با نتایج اخیر شریفیان که از روش مولکولی برای یافتن انگل در کبد رت آلوده به توکسوپلاسما استفاده کرده بود مطابقت کامل دارد(۱۳). در مطالعه شریفیان پس از روز ۲۸ هیچ آثاری از انگل در کبد مشاهده نشد و این نشان دهنده حضور موقت انگل در حین عبور از

www.SID.ir

Archive of SID

کبد است. با توجه به دقت بالای روش مولکولی و مقایسه آن با روش تلقیح داخل صفاقی می‌توان گفت که روش تلقیح داخل صفاقی در تشخیص آلودگی بافتی هم‌چنان دارای ارزش بالایی است.

ورود توکسوپلاسما به کبد و تکثیر انگل در سلول‌های آن، می‌تواند باعث بروز تغییراتی در شاخص‌های کبدی نظیر پروتئین تام، آلبومین، بیلی روبین و اوره شود. دامنه و مدت زمان بقای این تغییرات بستگی به عوامل متعددی از قبیل نوع میزبان، وضعیت ایمنی میزبان، سویه انگل و شدت آلودگی دارد. در این مطالعه از رت‌هایی با وضعیت سیستم ایمنی سالم به عنوان نزدیک‌ترین مدل آزمایشگاهی به انسان و سویه بیماری‌زا واستاندارد RH با شدت متوسط استفاده شد. طبق نتایج این مطالعه دامنه و مدت زمان بقای تغییرات شاخص‌های کبدی بر حسب نوع شاخص متفاوت بوده است. بیلی‌روبین تام در گروه مورد در دوره دوم هم زمان با حضور انگل در کبد افزایش نشان داد. بیلی روبین تام معمولاً در اثر بیماری‌های حاد یا مزمن کبدی افزایش می‌یابد. تورم سلول‌های کبدی همراه با بیماری‌های حاد یا مزمن کبدی باعث بازگشت بیلی روبین کونژوگه به خون و افزایش غلظت بیلی روبین کونژوگه می‌شود. علاوه بر این برخی عفونت‌ها نیز جذب و ترشح کبدی بیلی روبین را تغییر می‌دهند(۱۲). احتمالاً حضور انگل در کبد باعث آسیب موقتی در برخی از سلول‌های کبدی شده که متعاقب آن غلظت بیلی روبین سرمی تغییر کرده است.

از طرفی پروتئین تام سرم از روز ششم تا دوازدهم پس از آلودگی افزایش نشان داد. این افزایش احتمالاً به دلیل بالا رفتن پروتئین‌های اصلی مرحله حاد مثل پروتئین واکنش‌دار C ، فیبرینوژن و گلوبولین‌های خون می‌باشد(۱۲) و پس از این دوره یعنی از روز دوازدهم به بعد مقدار پروتئین سرم کاهش یافت. این کاهش احتمالاً به دلیل کاهش تولید آلبومین سرم می‌باشد(۱۲). طبق نتایج این تحقیق مقدار آلبومین سرم از روز ششم تا دوازدهم پس از آلودگی افزایش یافت که این افزایش احتمالاً به صورت کاذب همراه با افزایش غلظت گلوبولین رخ داده است و پس از این دوره یعنی از روز دوازدهم به بعد مقدار آلبومین سرم کاهش یافت. معمولا بیماری مزمن کبدی، سوء جذب روده‌ای و یا نارسایی پانکراس برون ریز باعث کاهش آلبومین می‌شوند(۱۲). مقدار اوره خون از دوره دوم (دوره حضور انگل در کبد) به بعد افزایش نشان داد که این افزایش احتمالاً به دلیل آسیب موقتی برخی از سلول‌های کبدی می‌باشد.

نتایج این مطالعه با تحقیقات انجام شده توسط گایک وارد و روت متفاوت است. آنها طی ٦ هفته مطالعه بر روی جوجه‌ها متوجه شدند که مقدار پروتئین تام در هفته‌های سوم، چهارم و ششم کاهش می‌یابد ولی در بقیه هفته‌ها طبیعی است و مقدار آلبومین در طول ٦ هفته دچار کاهش می‌شود(٦). علت این تفاوت احتمالاً مربوط به گونه میزبان است.

به طور کلی آلودگی رت به توکسوپلاسموزیس می‌تواند سبب ایجاد تغییرات موقت و غیر اختصاصی در برخی شاخص‌های بیوشیمیایی کبد شود. این تغییرات عمدتاً به علت عبور انگل از بافت کبد می‌باشد. متعاقب استقرار انگل در مغز و یا عضلات و تشکیل کیست نسجی، این تغییرات روند طبیعی به خود می‌گیرند. مسلماً برای تشخیص آلودگی باید از روش‌های سرولوژیک حساس و اختصاصی همانند روش الایزا استفاده کرد و روش‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شاخص‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کبدی در زنان باردار و بیماران دچار ایدز که از گروه‌های تحت خطر این بیماری هستند فقط تا حدود کمی می‌تواند به پزشکان در جهت مشکوک شدن به توکسوپلاسموزیس کمک نماید.

منابع

1. Araujo F, Slifer T, Kim S . Chronic infection with Toxoplasma gondii dose not pre-acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following re-infection with different strains of the parasite. J Parasitol 1997; 83(3):521-522.

2. Charift M, Darcy F, Torrier G. Toxoplasma gondii: Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. Exp Parasitol 1999; 71:114-124.

3. Fuentes I, Rodriguez M, Domingo C. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. J Clin Microbiol 1996; 34(10):2368-71.

4. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell mediated immunity during Toxoplasma gondii infection. Clin Microbiol Rev 1998;11(4):569-588.

5. Robert TC, Gregory AS. Muliplex PCR for diagnosis of AIDS related central nervous system lymphoma and Toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1997; 35(1):268-269.

6. Gaikward AV, Roate YV. Haematological and biochemical alterations in experimental toxoplasmosis of poultry. Ind J Anim Sci 2000; 70(11):1138-40.

7. Dubey JP. Pathogenicity and infectivity of Toxoplasma gondii oocysts for rats. J Parasitol 1996; 82(6):951-956.

8. Duby JP, Frenkel JK. Toxoplasmosis of rats: A review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. Vet Parasitol 1998;77: 1-32.

9. Dubey JP, Urban JF, Davis SW. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non persistent strain of Toxoplasma gondii. Am J Vet Res 1991; 52(8): 1316-1319.

10. Duquesne V, Claude A, Francoise D, Jean PD, Andre C. Protection of nude rats against Toxoplasma infection by excereted-secreted antigen specific helper T cells. Infect Immune 1990; 58: 2120-2126.

۱۱. دوبی جی پی و سی پی بی تی. توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات. ترجمه اسماعیل ذوقی . جلد ۱ ، تهران، دفتر نشر فرهنگ اسلامی،۱۳۷۲.

۱۲ . دانکن جی آر، پراس ک دبلیو، ماهافی ای ا (مولف). علوم آزمایشگاهی دامپزشکی. ترجمه نظیفی س. چاپ۱، شیراز، انتشارات دانشگاه شیراز،۱۳۸۰.

۱۳. شریفیان ، م. مطالعهٔ سیر حرکت انگل توکسوپلاسما گوندیی در رت با روش PCR و RT-PCR.. پایان نامه برای دریافت دکترای تخصصی انگل شناسی ، تهران، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۳.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir