مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۲: از ۲۹-۳۵
تابستان ۱۳۸۸

تغییرات سطح برخی آنزیم‌های سرمی در آلودگی تجربی رت‌ها به توکسوپلاسما گوندیی

لیلا جلیلی‌سندج‌خواه[1]، عبدالحسین دلیمی[2]*

۱- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۴/۱۴ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۶/۰۷

چکیده

هدف: ورود توکسوپلاسما گوندیی به خون و سایر بافت‌های بدن (مانند کبد، عضلات، قلب و ...) و تکثیر آن در تمام سلول‌های هسته‌دار ممکن است باعث آسیب‌های بافتی و در نتیجه بروز برخی تغییرات در سطح آنزیم‌های سرمی شود.

در این مطالعه میزان تغییرات سطح آنزیم‌های سرمی AST، ALT، ALK/P، CPK، LDH و ACP رت‌هایی که به‌طور تجربی به توکسوپلاسما گوندیی آلوده شده‌اند، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور تعداد ۱۱۶ سر رت عاری از آلودگی را به دو گروه ۸۷ سر رت مورد و ۲۹ سر رت شاهد تقسیم شدند. گروه مورد با تزریق ۵۰۰۰۰ عدد تاکی‌زوئیت از طریق داخل صفاقی آلوده شدند. در سه روز اول هر ۸ ساعت یک‌بار و سپس هر سه روز یک‌بار تا مدت ۶۰ روز هر بار از یک گروه مورد به همراه شاهد آن نمونه‌برداری و میزان تغییرات سطح آنزیم‌های مذکور بررسی شد.

نتایج: طبق نتایج به‌دست آمده، آنزیم AST طی ۸ ساعت اول و ساعات ۳۲-۴۰ و ۴۸-۵۶، آنزیم ALT طی ۸ ساعت اول و ساعات ۲۴-۴۰ و ۴۸-۶۴، آنزیم ALK/P طی ساعات ۲۴-۴۰ و ۴۸-۶۴، آنزیم‌های CPK و LDH طی ساعات ۲۴-۴۰ و ۴۸-۵۶ و آنزیم ACP طی ساعات ۱۶-۴۸ افزایش داشتند، ولی پس از آن همگی به حالت طبیعی برگشتند.

نتیجه‌گیری: تغییرات سطح آنزیم‌های سرمی رت‌ها در خلال آلودگی به توکسوپلاسما کاملاً موقتی است.

کلیدواژگان: توکسوپلاسما گوندیی، رت، آنزیم‌های سرمی

۱- مقدمه

توکسوپلاسموز (Toxoplasmosis)، عفونت انگلی ناشی از تک‌یاخته‌ای به‌نام توکسوپلاسما گوندیی (*Toxoplasma gondii*) است که در انسان و بسیاری از حیوانات رخ می‌دهد. ابتلا به این عفونت در انسان اغلب بدون نشانه بوده یا تنها با التهاب غدد لنفاوی یا شبیه منونوکلئوز عفونی (Infectious mononucleosis) همراه با تب و لنفادنوپاتی (Lymphadenopathy) است. معمولاً با ظهور آنتی‌بادی از تعداد انگل‌ها در خون کاسته می‌شود و انگل در عضلات یا

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

مغز کیسته شده و برای سالیان متمادی زنده باقی می‌ماند. در صورتی‌که مصونیت بدن کاهش پیدا کند، ممکن است کیست‌ها مجدداً فعال شوند. عفونت اولیه یا فعال شده در افراد مبتلا به نارسایی ایمنی ممکن است به‌صورت التهاب نیمکره‌های مغز، التهاب شبکیه-مشیمیه، ذات‌الریه، ابتلای عمومی عضلات و استخوان‌ها تظاهر نماید [۱].

ورود توکسوپلاسما به خون و سایر بافت‌های بدن (کبد، عضلات، قلب و ...) و تکثیر آن در تمام سلول‌های هسته‌دار به دلیل برخی آسیب‌های بافتی ممکن است باعث تغییر سطح بعضی آنزیم‌ها از جمله آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (Aspartate Aminotransferase: AST)، آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (Alanine Aminotransferase: ALT)، آنزیم آلکالن فسفاتاز (Alkaline phosphatase: ALK/P)، آنزیم کرآتین فسفوکیناز (Creatine phosphokinase: CPK)، آنزیم لاکتات دهیدروژناز (Lacate Dehydrogenase: LDH)، و آنزیم اسیدفسفاتاز (Acid phosphatase: ACP) شود [۲، ۳]. البته میزان این تغییرات آنزیمی و طول مدت دوام آن‌ها کاملاً مشخص نیست. با آلوده‌سازی تجربی حیوانات عاری از آلودگی، این موضوعات را می‌توان بررسی و مطالعه کرد. در بین حیوانات آزمایشگاهی، روند توکسوپلاسموز در موش صحرایی (رت) بسیار مشابه انسان است. به همین دلیل، رت مدل حیوانی مناسبی برای بررسی توکسوپلاسموز است. از طرفی در توکسوپلاسموز میزان آسیب بافتی براساس زمان پس ازآلودگی، مرحله بیماری (حاد یا مزمن) و میزبان متفاوت است. امروزه به دلیل افزایش مبتلایان به ایدز (Acquired Immune Deficiency Syndrome: AIDS) و یا سایر بیماری‌های نقص ایمنی، دریافت‌کنندگان پیوند و مصرف‌کنندگان داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی، اهمیت توکسوپلاسموز روزافزون شده است و شناخت میزان تأثیر توکسوپلاسما بر بافت‌ها و تغییرات آنزیمی آن‌ها می‌تواند به تشخیص سریع و درمان به موقع عفونت کمک نماید.

نکته قابل توجه این است که آیا انگل توکسوپلاسما در ضمن عبور از اندام‌هایی مانند کبد، عضلات، قلب و .. باعث اختلال در سیستم عملکرد آن‌ها می‌شود؟ و این اختلال تا چه مدت ادامه دارد؟ هدف از این پژوهش تعیین تغییرات سطح آنزیم‌های سرمی ناشی از این اختلال در رت‌هایی است که به‌طور تجربی به توکسوپلاسما گوندیی آلوده می‌شوند.

۲- مواد و روش‌ها

در مرحله اول تعداد ۱۱۶ سر رت عاری از آلودگی، با فراهم نمودن غذا و پوشال اتوکلاو شده تکثیر و نگهداری شدند. سپس تعداد ۸۷ سر رت در ۲۹ گروه سه‌تایی تقسیم شدند. برای هر گروه یک سر رت شاهد نیز در نظر گرفته شد. رت‌های شاهد و مورد از نظر نژاد، سن، وزن و شرایط تغذیه مشابه بودند. در این تحقیق از تاکی‌زوئیت (Tachyzoite) سوش RH توکسوپلاسما گوندیی استفاده شد که قبل از تزریق، با پاساژ دادن در حفرهٔ صفاقی موش‌های سوری به تعداد کافی تکثیر شدند. رت‌های مورد طی یک روز توسط تزریق داخل صفاقی ۴۰-۵۰ هزار تاکی‌زوئیت آلوده شدند. طی سه روز اول پس از آلودگی، هر ۸ ساعت یک‌بار و از آن پس، هر سه روز یک‌بار از یک گروه مورد به همراه شاهد آن، خون‌گیری به‌عمل آمد (خون‌گیری از قلب انجام شد) و سرم آن‌ها جدا شد.

روش اندازه‌گیری تغییرات سطح آنزیم‌های AST، ALT، CPK، LDH، و ALK/P بدین صورت بود که پس از تهیهٔ محلول کار مصرفی طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت‌های آزمایشگاهی آنزیم‌های مورد نظر، مقدار یک میلی‌لیتر از محلول کار مصرفی هر آنزیم را با میزان معینی از نمونه سرم رت‌ها مخلوط کرده و به کمک زمان‌سنج میزان تغییرات سطح آنزیم‌های AST، ALT، CPK، LDH در مدت زمان ۳ دقیقه در طول موج ۳۶۵ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و میزان تغییرات سطح آنزیم ALK/P در مدت زمان ٤ دقیقه در طول موج ٤٠٥ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد توسط

اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. روش اندازه‌گیری تغییرات سطح آنزیم ACP بدین صورت بود که پس از تهیه محلول کار و سوبسترای آنزیم طبق دستور کیت آزمایشگاهی مورد نظر، برای هر نمونه سرم، دو لولهٔ آزمایش (یکی به‌عنوان شاهد و دیگری به‌عنوان آزمون) و برای استاندارد نیز یک لولهٔ آزمایش در نظر گرفته شد. در لوله‌های شاهد و آزمون هرکدام ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترا به همراه ۵۰ میکرولیتر آب مقطر و در لولهٔ استاندارد ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد موجود در کیت آزمایشگاهی ریخته و این لوله‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت این مدت زمان، بدون در آوردن لوله‌ها، در لوله‌های آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر نمونه سرم اضافه شد؛ سپس به سرعت مخلوط شده و دقیقاً پس از گذشت ۳۰ دقیقه، با اضافه نمودن ۲/۵ میلی‌لیتر سود رقیق شده (۰/۵ درصد) واکنش متوقف شد. میزان جذب نوری (Optical Density: OD) استاندارد در مقابل آب مقطر و لوله‌های آزمون در مقابل شاهد، در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

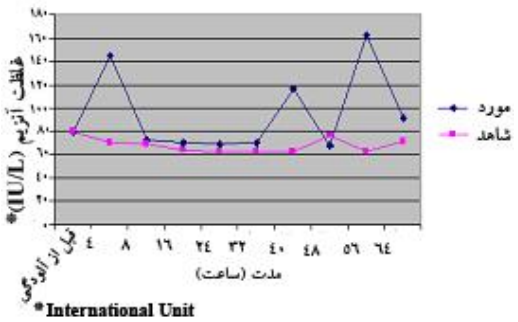
برای محاسبهٔ آماری اطلاعات به‌دست آمده و مقایسه میانگین‌های مقادیر در دو گروه مورد و شاهد، از آزمون T-student به کمک نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۱۱/۵و برای رسم منحنی و نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

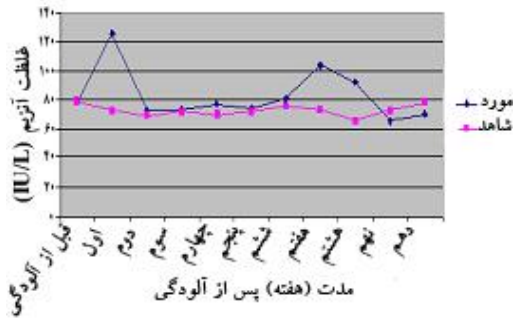
۳- نتایج

از لحاظ بالینی بین رت‌های آلوده و غیرآلوده اختلاف قابل توجهی مشاهده نشد ولی در سنجش میزان آنزیم‌های سرمی مورد و شاهد موارد زیر مشاهده شد.

۳-۱- آنزیم AST

این آنزیم طی ۸ ساعت اول بعد از آلودگی و ساعات ۳۲-۴۰ و ۴۸-۵۶ افزایش داشت (نمودار ۱). ولی تغییرات سطح این آنزیم در هفته‌های پس از آلودگی بین مورد و شاهد، از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبود.





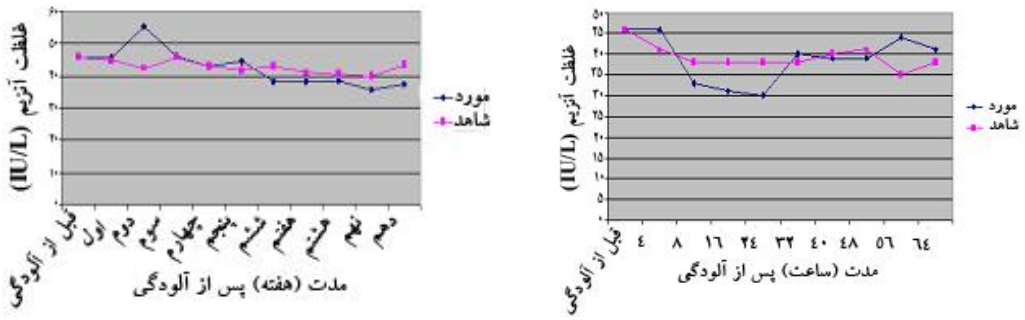
نمودار ۱ منحنی تغییرات آنزیم AST در طول ساعات اولیه و هفته‌های پس از آلودگی در سرم رت‌های آلوده به توکسوپلاسموز تجربی

۳-۲- آنزیم ALT

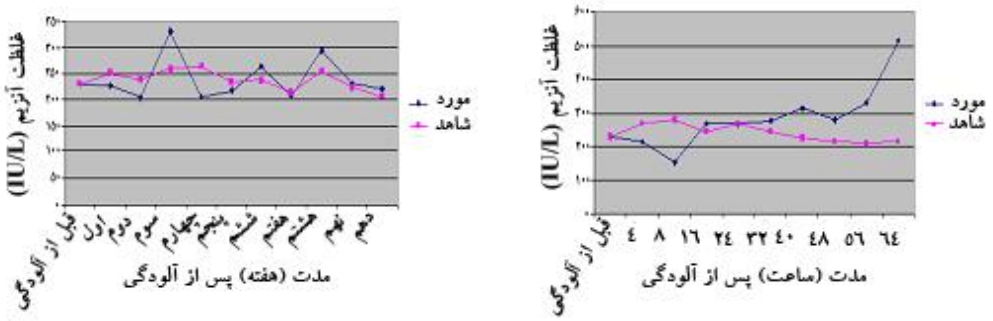
این آنزیم طی ۸ ساعت اول بعد از آلودگی و همچنین ساعات ۴۸-۵۶ افزایش نشان داد (نمودار ۲). ولی اختلاف تغییرات این آنزیم در هفته‌های پس از آلودگی بین مورد و شاهد معنی‌دار نبود.

۳-۳- آنزیم ALK/P

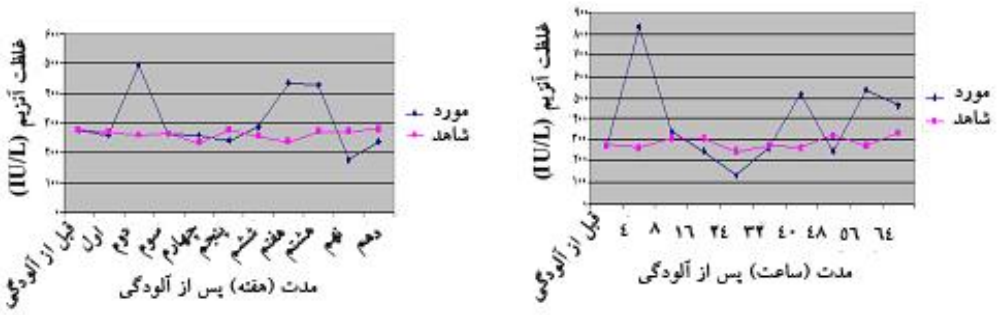
این آنزیم طی ساعات ۲۴-۴۰ و۴۸-۶۴ پس از آلودگی افزایش داشت (نمودار ۳). تغییرات سطح این آنزیم در هفته‌های پس از آلودگی، از اختلاف معنی‌داری بین مورد و شاهد برخوردار نبود.



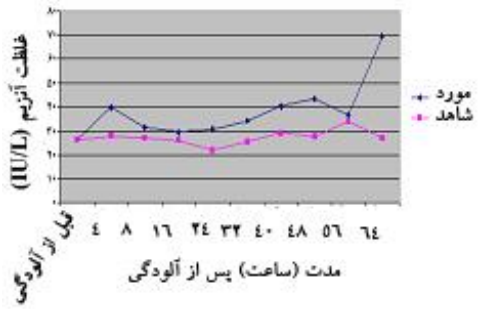
نمودار ۲ منحنی تغییرات آنزیم ALT در طول ساعات اولیه و هفته‌های پس از آلودگی در سرم رت‌های آلوده به توکسوپلاسموز تجربی

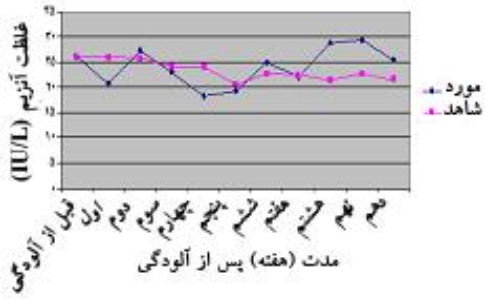


نمودار ۳ منحنی تغییرات آنزیم ALK/P در طول ساعات اولیه و هفته‌های پس از آلودگی در سرم رت‌های آلوده به توکسوپلاسموز تجربی



نمودار ٤ منحنی تغییرات آنزیم CPK در طول ساعات اولیه و هفته‌های پس از آلودگی در سرم رت‌های آلوده به توکسوپلاسموز تجربی





نمودار ۵ منحنی تغییرات آنزیم ACP در طول ساعات اولیه و هفته‌های پس از آلودگی در سرم رت‌های آلوده به توکسوپلاسموز تجربی

۳-٤- آنزیم CPK

این آنزیم طی ساعات ٢٤-٤٠ و٤٨-٥٦ پس از آلودگی افزایش نشان داد (نمودار٤). ولی در هفته‌های پس از آلودگی، اختلاف این آنزیم بین گروه‌های مورد و شاهد معنی‌دار نبود.

۳-٥- آنزیم LDH

تغییرات این آنزیم کاملاً مشابه آنزیم CPK بود.

۳-٦- آنزیم ACP

این آنزیم طی ساعات ١٦-٤٨ پس از آلودگی افزایش نشان داد (نمودار ٥). ولی تغییرات آن در بین گروه‌های مورد و شاهد از اختلاف معنی‌دار برخوردار نبود.

٤- بحث

آنزیم‌های مورد مطالعه در این تحقیق، از آنزیم‌های مهم بافتی هستند که در اثر آسیب‌های وارد بر بافت به داخل خون آزاد می‌شود و مقادیر آن‌ها در سرم خون قابل اندازه‌گیری است. هر اندازه آسیب و ضایعهٔ بافتی شدیدتر باشد، امکان آزادسازی این آنزیم‌ها به خون بیشتر شده و مقادیر آن‌ها در سرم خون افزایش می‌یابد. برعکس، اگر عامل بیماری‌زا به هر دلیل نتواند به قدر کافی سلول‌های بافت را تخریب کند، افزایش مقادیر این آنزیم‌ها در سرم خون قابل توجه نبوده و احتمالاً با روش‌های متداول قابل اندازه‌گیری نیست.

در مطالعهٔ حاضر طی هفته‌های متوالی پس از آلودگی تجربی رت‌ها به توکسوپلاسما گوندیی، گرچه تغییراتی در آنزیم AST مشاهده نشد ولی طی ساعات اولیه بعد از آلودگی، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در آن دیده شد. این افزایش را می‌توان به دلیل آسیب‌های شدید حاصل از انگل در اوایل آلودگی در بافت‌های مختلف بدن به‌ویژه قلب و کبد دانست. اورتگو (Ortego) و همکاران (۱۹۹۰) گزارشی از یک بیمار ۷۱ ساله با سابقهٔ ابتلای ۲ ماهه به تب، ضعف و کاهش وزن ارائه نمودند. معاینات پزشکی روی این بیمار، کوریورتینیت (Chorioretinitis) و آزمایش سرولوژیکی وجود IgG ضد توکسوپلاسما گوندیی را تأیید نمودند. درآزمایش بیوشیمیایی، آنزیم AST در حد طبیعی بوده است [٦]. گایکواد (Giakwad) و راوت (Raote) (۲۰۰۰) طی مطالعه‌ای روی جوجه‌های مرغ که به‌طور تجربی به توکسوپلاسما گوندیی آلوده شده بودند، نشان دادند که آنزیم AST تغییرات قابل توجهی پس از آلودگی به این انگل نشان نمی‌دهد [۳].

مطالعه اورتگو و همکاران (۱۹۹۰) عدم تغییر آنزیم‌های ALT و ALK/P را با وجود علائم توکسوپلاسموز تأیید می‌نمایند [٦]. گایکواد و راوت (۲۰۰۰) طی مطالعه‌ای، عدم تغییر آنزیم ALT را گزارش نمودند [۳]. در مطالعهٔ حاضر نیز طی هفته‌های پس از آلودگی تجربی رت‌ها، آنزیم ALT

تغییرات خاصی نشان نداد. ولی در ساعات اولیه بعد از آلودگی، این آنزیم افزایش داشت که احتمالاً به دلیل آسیب‌های شدید بافت‌های مختلف بدن به‌ویژه کبد است.

یامادا (Yamada) و همکاران (۱۹۸۹) با مطالعه‌ای که روی یک بیمار ۵۵ ساله مبتلا به توکسوپلاسموز با علائم کوریوریتینت و پلی‌میوزیت حاد (Acute polymyositis) انجام دادند به افزایش میزان آنزیم CPK در این بیمار اشاره کردند [۲]. در مطالعهٔ حاضر، آنزیم CPK طی ساعات اولیه پس از آلودگی افزایش نشان داد ولی طی هفته‌های پس از آلودگی، تغییر قابل توجهی نداشت. احتمالاً در ساعات اولیه آلودگی به دلیل تهاجم شدید انگل به بافت‌های عضلانی، میزان تخریب سلول‌ها زیاد و در نتیجه مقدار آنزیم CPK آزاد شده به خون نیز بالا بوده است.

افزایش آنزیم LDH در ساعات اولیه بعد از آلودگی، احتمالاً به دلیل ضایعات شدید حاصل از انگل در سلول‌های تمام بافت‌های بدن (به‌ویژه قلب، طحال، ریه، کبد، کلیه، مغز، عضلات) است.

در مطالعهٔ گایکواد و همکاران (۲۰۰۰) مشخص شد که آنزیم ACP در هفته‌های اول و دوم پس از آلودگی افزایش دارد. این محققین دلیل افزایش آنزیم ACP را به ضایعات کلیوی نسبت دادند. پاگانا (Pagana) و پاگانا (۲۰۰۰) نیز افزایش آنزیم ACP را در طی آسیب‌های کلیوی تأیید نمودند [۷]. در مطالعهٔ حاضر نیز این آنزیم فقط طی ساعات اولیه بعد از آلودگی افزایش داشت.

به‌طور کلی، برخی آنزیم‌های مورد مطالعه طی ساعات اولیه پس از آلودگی در سرم خون افزایش نشان دادند، ولی پس از مدتی از مقادیر آن‌ها کاسته شد. دلیل احتمالی افزایش این آنزیم در اوایل آلودگی، بالا بودن میزان آسیب‌های وارد بر بافت‌ها و شدت تخریب سلولی است. ولی پس از مدتی که از آلودگی می‌گذرد به دلیل محدود شدن آسیب‌های بافتی توسط سیستم ایمنی بدن، از تخریب سلول‌های بافتی کاسته می‌شود در نتیجه میزان آنزیم‌های آزاد شده به خون کاهش یافته و به حالت طبیعی برمی‌گردد. بنابراین می‌توان گفت که تغییرات سطح آنزیم‌های سرمی رت‌های دارای سیستم ایمنی فعال در خلال آلودگی به توکسوپلاسما کاملاً موقتی است و از آن‌ها نمی‌توان به‌عنوان شاخص آلودگی استفاده کرد زیرا که در طول زمان تغییر می‌یابند.

۵- تشکر و قدردانی

مقاله حاضر قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است و کلیه هزینه‌های آن توسط دانشگاه مذکور تأمین شده است بنابراین نویسندگان از کلیه همکاران محترم معاونت پژوهشی دانشکده تشکر می‌نمایند. ضمناً از همکاران محترم گروه انگل‌شناسی به‌ویژه خانم دکتر غفاری‌فر و خانم قاسمی‌نیکو و همچنین آقای دکتر شریفیان تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Chin J. Control of communicable disease manual. Sabaghian H, 1th edition, Tehran, Porsina Press, 2001; p: 696-701. (In Persian)

[2] Yamada T, Nakagawa Y, Komiya T, Sakuma A, Mizuno Y. Acute acquired toxoplasmosis presenting as polymyositis and chorioretinitis in a Japanese male. Rinsho Shinkeigaku 1989; 29 (10): 1283-6.

[3] Gaikwad AV, Raote YV. Haematological and biochemical alterations in experimental toxoplasmosis of poultry. Indian J Anim Sci 2000; 70(11): 1138-40.

[4] Dubey 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): 1-32.

[5] Amir-Rasooli H. Clinical biochemistry. 2th edition, Tehran, Jaffary Press, 1999; p: 22-46. (In Persian)

[6] Ortego TJ, Robey B, Morrison D, Chan C. Toxoplasmic chorioretinitis and hepatic granulomas. Am J Gastroentrol 1990; 85(10): 1418-20.

[7] Pagana KD, Pagana TJ. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. 3rd edition, 2000; p: 24-6.