دانشکده دامپزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی

# بررسی تاثیر آنتی ژن های لایه زایای کیست هیداتید بر بیان ژنهای گیرنده شبه تول۲ و۴ (TLR2 & TLR4) درسلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) گوسفندان سالم با روش Real-time quantitative PCR (qPCR)

**به کوشش :**

**فاطمه تاران**

**اساتید راهنما :**

**دکتر حسن برجی و دکترعلیرضا حق پرست**

**استاد مشاور :**

**مریم ترابی**

**بهمن ماه ۱۳۹۰**

# اظهار نامه

اینجانب فاطمه تاران دانشجوی دوره ی کارشناسی ارشد انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده ی پایان نامه بررسی تاثیر آنتی ژن های لایه زایای کیست هیداتید بر بیان ژنهای گیرنده شبه تول۲ و۴ ( TLR2 & TLR4) درسلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) گو سفندان سالم با روش

Real-time quantitative PCR (qPCR)

تحت راهنمایی دکتر **حسن برجی و دکتر علیرضا حق پرست** متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه فردوسی مشهد » و یا « Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

امضا دانشجو و تاریخ

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمیباشد. باشد.

به نام خدا

گواهی اعضای کمیته‌ی پایان نامه

# بررسی تاثیر آنتی ژن های لایه زایای کیست هیداتید بر بیان ژنهای گیرنده شبه تول۲ و۴ ( TLR2 & TLR4) درسلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) گو سفندان سالم با روش Real-time quantitative PCR (qPCR)

به کوشش

**فاطمه تاران**

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی

لازم جهت اخذ کارشناسی ارشد

در رشته‌ی انگل شناسی دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

---

این پایان‌نامه در جلسه‌ی مورخ ۱۳۹۰..... با درجه‌ی ..... و نمره‌ی.....به تصویب هیئت محترم داوران رسید.
اساتید راهنما: جناب آقای دکتر حسن برجی ، استادیار بخش انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی
جناب آقای دکتر علیرضا حق پرست ، استادیار بخشهای ایمونولوژی و بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
استاد مشاور: سرکار خانم مریم ترابی، کارشناس ارشد آزمایشگاههای اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی
داور: جناب آقای دکتر غلامرضا رزمی، استاد بخش انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
داور: جناب آقای دکتر جلیل مهرزاد، استادیار بخشهای ایمونولوژی و بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده


**بررسی تاثیر آنتی‌ژن‌های لایه‌ی زایای کیست هیداتید بر بیان ژن‌های TLR2 و TLR4 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی گوسفند سالم(بره‌های تازه متولد شده) با روش**

**Real-time quantitative PCR (qPCR)**

اکینوکوکوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز در سراسر جهان و از جمله ایران است که به طور جدی بهداشت عمومی را تهدید می کند. این انگل در انسان‌ها و حیوانات اهلی سبب کیست هیداتید می‌شود. اثر کیست هیداتید بر میزبان واسط بستگی به اندازه و محل کیست دارد. پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی اولین سد دفاعی بدن میزبان در مقابل آنتی‌ژن‌های خارجی است.در سالیان اخیر اهمیت پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی در شناسایی آنتی‌ژن‌ها و تکوین پاسخ‌های محافظتی ایمنی اکتسابی، به علت کشف گیرنده‌های شناسایی الگو (PRRs)بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. گیرنده‌های شبه تول(TLRs) شاخص‌ترین و مهم‌ترین PRRs می‌باشند که توسط سلول‌های مختلف سیستم ایمنی بیان گردیده و در شناسایی الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن‌ها(PAMPs) نقش دارند. با توجه به نقش احتمالیTLRs در شناسایی آنتی‌ژن‌های کرمی و پاسخ‌های ایمنی در مقابل بیماری‌های کرمی، ما در این بررسی به تاثیر آنتی ژن های لایه زایای کیست هیداتید گوسفند بر میزان بیان ژن های TLR2 وTLR4 در سلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) بره های سالم پرداختیم. در این مطالعه ابتدا جمع آوری کیست هیداتید از کشتارگاه، سپس استخراج آنتی‌ژن‌های لایه‌زایای کیست هیداتید و تعیین غلظت آنها به روش برادفورد انجام گرفت. سپس، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(PBMCs) بره های سالم کمتر از یک ماه با روش فایکول جداسازی گردید. پس از آن، لنفوسیت‌ها و منوسیت‌های استخراج شده در محیط کشت سلولی با غلظت‌های 50 و 100µg(گروه تیمار) و بدون آنتی‌ژن (گروه کنترل) به مدت 2ساعت و 18 ساعت کشت داده شدند. سپس استخراج RNA تام از PBMCs انجام گرفته و سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهایOligo-dT صورت پذیرفت. در نهایت تغییرات میزان بیان TLR2 و TLR4 نسبت به ژن کنترل داخلی GAPDH با روش Real-time quantitative PCR Comparative انجام گرفت. آنالیز نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که بیان ژن TLR2 و TLR4در گروه تیمار نسبت به کنترل، افزایش یافته که این افزایش بیان ژن در مورد TLR4 بیشتر بود. نتایج حاصل از این مطالعه در شناسایی عمیق‌تر مکانیسم‌های سلولی مولکولی دخیل در ایمونوپاتوژنز و تکوین راهکارهای نوین پیشگیری از هیداتیدوزیس مؤثر خواهد بود.



کلید واژه: هیداتیدوزیس، اکینوکوکوس گرانولوزوس، TLRs، PBMCs، Real-time qPCR Comparative، بیان ژن

فهرست جداول


| عنوان | شماره صفحه |
|---|---|
| جدول ۱-۱: انواع گیرندههای شبه تول (TLRs) و لیگاندهای مربوط به آنها | ۲۶ |
| جدول۲-۱: میزان آنتی ژنهای تزریق شده به چاهک های پلیت محیط کشت | ۳۹ |
| جدول۲-۲: مواد مورد نیاز و حجم مورد استفاده آنها برای انجام واکنشRT( reverse transcription) | ۴۰ |
| جدول ۲-۳: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی | ۴۱ |
| جدول ۲-۴: ترکیب مواد مورد استفاده در PCR با گرادیانت دمایی به منظور تعیین دمای اتصال هر پرایمر | ۴۲ |
| جدول ۲-۵-: برنامه حرارتی مورد استفاده در PCR | ۴۲ |
| جدول ۲-۶: برنامه حرارتی برای بررسی پرایمرها در واکنش qPCR ورسم منحنی ذوب | ۴۳ |
| جدول۲-۷: برنامه حرارتی ثانویه برای بررسی پرایمرها در واکنش qPCRو منحنی ذوب | ۴۴ |
| جدول ۲-۸: ترکیب مواد مورد استفاده در واکنش های نهایی qPCR | ۴۵ |
| جدول ۳-۱: ارزیابی کمی RNA استخراج شده و cDNA هر نمونه با استفاده از دستگاه نانودراپ | ۴۹ |
| جدول ۳-۲: دمای مناسب برای مرحله اتصال سه جفت پرایمر بر اساس گرادیانت دما و طول قطعات محصول آنها | ۵۰ |
| جدول ۳-۳: ترکیب مواد بهینه شده برای واکنشهای qPCR | ۵۱ |
| جدول ۳-۴: برنامه حرارتی ثانویه برای بررسی پرایمرها در واکنش qPCR و منحنی ذوب | ۵۳ |
| جدول ۳-۵: میانگین ct ژن GAPDH | ۵۶ |
| جدول ۳-۶: میانگین ctژن TLR2 و نتایج حاصل از محاسبات Pfaffl | ۵۶ |
| جدول ۳-۷:میانگین ctژن TLR4 و نتایج حاصل از محاسبات Pfaffl | ۵۶ |

# فهرست تصاویر و نمودارها


عنوان و شماره صفحه

فصل اول

تصویر شماره ۱-۱: انگل بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس ۵

تصویر شماره ۱-۲: تصویر شماتیک کیست هیداتید و اجزاء آن ۸

تصویر شماره۱- ۳: چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس ۱۱

تصویر شماره ۱-۴: پاسخ های ایمنی در طی گسترش کیست هیداتید در میزبان واسط ۲۰

تصویر شماره ۱-۵:مسیر پیام‌رسانی وابسته به MyD88 و وابسته به TRIF برای TLR4 و هتروداایمرهای TLR2 ۲۵

تصویر شماره ۱-۶:TLRs در پستانداران در تمام سلول‌های ایمنی میزبان بیان می‌شوند که شامل DC و مونوسیت‌ها می‌باشد ۲۶

تصویر شماره ۱-۷ : تولید التهاب بوسیله TLRs در آلودگی انگلی ۲۷

تصویر شماره۱-۸:تحریک TLRs از سایتوکاین‌های پیش التهابی ۲۸

فصل سوم

تصویر ۳-۱: ارزیابی کیفی نمونه هایی از RNA های استخراج شده (با باندهای ریبوزومی s ۱۸ وs ۲۸ مشخص)

بر روی ژل آگاروز ۴۸

تصویر شماره ۳-۲: تصویر ژل محصولات PCR دو ژن TLR2&TLR4 مورد مطالعه در این بررسی ۵۰

تصویرشماره ۳-۳: تصویر ژل محصول PCR ژن GAPDH مورد مطالعه در این بررسی ۵۰

تصویر شماره ۳-۴ : نمودار منحنی استاندارد سریال رقت پرایمر GAPDH ۵۱

تصویر شماره ۳-۵: نمودار منحنی استاندارد سریال رقت پرایمر TLR2 ۵۲

تصویر شماره ۳-۶ : نمودار منحنی سری رقت پرایمر TLR4 ۵۲

تصویر شماره ۳-۷ :نمودار تکثیر (الف)و منحنی ذوب (ب)واکنش دوتایی مربوط به پرایمر GAPDH ۵۴

تصویر شماره ۳-۸ : نمودار تکثیر (الف)و منحنی ذوب (ب)واکنش دوتایی مربوط به پرایمر TLR2 ۵۴

تصویر شماره ۳-۹ : نمودار تکثیر (الف)و منحنی ذوب (ب)واکنش دوتایی مربوط به پرایمر TLR4 ۵۵

تصویر شماره ۳-۱۰ : ژل محصول واکنش qPCR مربوط به ژن GAPDH ۵۵

تصویر شماره ۳-۱۱ : تصویر ژل محصول واکنش qPCR مربوط به ژن TLR2 ۵۵

تصویر شماره ۳-۱۲: ژل محصول واکنش qPCR مربوط به ژن TLR4 ۵۵

تصویر شماره ۳-۱۳ نمودار نتایج حاصل از تغییرات میزان بیان ژن TLR2 با استفاده از qPCR دوبار تکرار ۵۷

تصویر شماره ۳-۱۴: نمودار نتایج حاصل از تغییرات میزان بیان ژن TLR4 با استفاده از qPCR دوبار تکرار ۵۷

# فهرست ضمائم


| عنوان و شماره | صفحه |
| --- | --- |
| پیوستI: لوازم و تجهیزات | ۶۹ |
| پیوستII : مواد مورد استفاده | ۷۰ |
| پیوستIII:روش برادفورد | ۷۱ |
| پیوستIV: اصول و شرایط کار با RNA | ۷۲ |
| پیوستV: استخراج RNA با کیتHigh-pure Roche | ۷۳ |
| پیوستVI: ژل-الکتروفورز | ۷۵ |
| پیوستVII: منحنی تکثیر و ذوب سریال رقت پرایمرهای TLR2,TLR4,GAPDH | ۷۶ |
| پیوستVIII : تصویر PBMC در محیط کشت سلولی | ۷۹ |

# «مقدمه»

## مقدمه

بیماری هیداتیدوز[1] یکی از مهمترین و قدیمی ترین بیماری های مشترک انسان و دام است که توسط مرحله لاروی سستودی به نام اکینوکوکوس گرانولوزوس[2] ایجاد می شود، مرحله لاروی کرم اکینوکوکوس به شکل کیسه‌ای چند جداره و پر از مایع است که در جداره داخلی آن جوانه‌هایی کیسه‌ای شکل ایجاد می‌شود. تعداد این کیسه‌ها معمولا خیلی زیاد است و در هر کیسه نیز ۳ تا ۳۰ پروتواسکولکس[3] تشکیل می‌شود، که یک مشکل اقتصادی و بهداشتی برای کشور هایی است که بیماری بصورت بومی در آن جا وجود دارد. این بیماری در سراسر دنیا گزارش شده است ولی بالاترین نسبت آلودگی مربوط به منطقه مدیترانه که ایران یکی از کشور های آن می باشد، دیده شده است. انگل در اکثر مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشور باعث ایجاد بیماری شده است. اهمیت این بیماری در این است که اولاً آلودگی بیشتر در دو عضو کبد و ریه که دو عضو حساس بدن هستند بوجود می آید. ثانیاً با وجود داروهایی که تا حدودی بر روی بیماری موثرند هنوز تنها راه درمان «عمل جراحی» می باشد. از نظر اقتصادی طبق برآوردی که شده است زیان مربوط به این بیماری در انسان و حیوان سالانه نزدیک به ۲ میلیارد ریال می باشد که در صورت ریشه کن شدن بیماری این مبلغ می تواند در سایر هزینه ها بکار گرفته شود (۱, ۲).

میکروارگانیسم های پاتوژن انسانی و حیوانی از راه های گوناگون وارد بدن شده با مکانیزم های مختلف موجب بیماری می شوند. مهمترین استراتژی مهره داران در مقابله با این تهاجم، مکانیزم دفاع غیر اختصاصی (ایمنی ذاتی[4]) همیشه مهیا بوده در افراد مختلف وجود داشته و در طول چند دقیقه پس از عفونت وارد عمل می شود. اجزای اصلی پاسخ ایمنی ذاتی شامل سد های فیزیکی_شیمیایی مثل سلول های پوششی و مواد آنتی میکروبیال ساخته شده در سطح آنها، سلول های فاگوسیتیک[5] (نوتروفیل_ماکروفاژ) و سلول های NK[6]، پروتئین های خونی شامل اعضای سیستم کمپلمان[7] و سایر واسطه های التهابی، پروتئین هایی به نام سایتوکاین[8] که وظیفه هماهنگی بین سلول های ایمنی ذاتی را بر عهده دارند (۳, ۴). اجزاء متعدد دیگر سیستم ایمنی ذاتی عبارتنداز:تب، اینترفرونها[9]، سایر مواد رها شده از سلولهای سفید خون. گیرنده های شناساگر الگو[10](PRRs) ، مانند گیرنده های شبه تول[11] (TLRs) و انواعی از پروتئینهای سرمی، مانند بتا لایزین، پلی آمینها و کینین ها می‌باشند (۵).

1 .hydatidos
2 .Echinococcus granulosous
3. protoscolex
4. innat immunity
5. phaagocytic
6. Natural Killer cells
7. complement
8. cytokine
9. interferons
10 Pattern recognition receptors

## « مقدمه »

سلول های دندریتیک[12] (DCs) سلولهای کلیدی سیستم ایمنی ذاتی می باشند که به واسطه TLRs موجب تکوین پاسخهای ایمنی اکتسابی توسط لنفوسیتهای B و T می گردند (۶).TLRs خانواده ای از پروتئین ها در پستانداران هستند که همولوگ گیرنده تول در مگس سرکه می باشند، TLRs به عنوان مهمترین گیرنده های شناساگر الگو یا PRRs در سلولهای بسیاری از موجودات بیان می شوند. در مهره داران، بیان TLRs در ابتدا در سلول های ایمنی بویژه ماکروفاژها و نوتروفیل ها گزارش گردید، اما اکنون مشخص شده است که این گیرنده ها در بسیاری از انواع سلول های بدن یافت می گردند. گیرنده های شبه تول شباهت های ساختاری زیادی با یکدیگر دارند اما در لیگاندها و الگوی بیان و جایگاه عملکرد در سلول متفاوتند. تا کنون سیزده TLRs در پستانداران شناخته شده که TLR3، TLR7، TLR8 و TLR9 در وزیکول های اندوزمی داخل سلول دیده می شوند، درحالیکه TLR1، TLR2، TLR4، TLR5، TLR6 و TLR10 در سطح سلول حضور دارند(۳).

فعال شدن TLRs در سلول های ایمنی منجر به آغاز مسیر پیامدهی داخل سلولی می گردد، این آبشار یا توسط فاکتور تمایز میلوئیدی ۸۸ (MyD88[13]) که یک مولکول آداپتور می باشد و یا مولکول فعالگر اینترفرون مرتبط با گیرنده تول (TRIF) تحریک شده و منجر به راه انداختن مسیر های پیام رسانی درون سلولی گوناگون وبعضی اوقات متضاد می‌شود.

PAMPs[14] یاMAMPs [15] مولکول های خارجی خاصی وابسته به عوامل بیماریزا می باشند که توسط گیرنده های شناساگر الگو مثل TLRs، مورد شناسائی قرار گرفته و در نهایت، با فعالیت TLRs فعالیت سیگنالینگ سلولی برای تحریک ایمنی ذاتی و تولید سایتوکاین های التهاب زا مثل TNF-α, IL-6,IL-1β IL-8 و اینترفرونهای تیپ I شروع شده که در نهایت منجر به ایجاد پاسخهای ایمنی اکتسابی خواهد شد.

TLR2 وTLR4 که در سطح سلول حضور دارند یک ناحیه خارج سلولی غنی از تکرارهای اسید آمینه لوسین، یک سیگنال انتقال غشائی و یک بخش سیگنالی کوچک درون سیتوپلاسمیک دارند که به آداپتور پروتئین MyD88 متصل می گردد. TLR4 برای پاسخ به لیپو پلی ساکارید باکتری های گرم منفی لازم و ضروری می‌باشد و TLR2 در شناسایی پپتیدوگلیکان و ساختارهای لیپوپپتیدی میکروارگانیسمها نقش دارد (۷, ۸).

11. Toll like receptors
12. dendritic cells
13. Myeloid differentiation primary response protoin 88
14. Pathogen associated molecular patterns
15. Microbial-associated molecular patterns

# « مقدمه »

همه روزه شواهد بیشتری از نقش TLRs در ایجاد کنترل پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی بدست مـی آینـد (۹-۱۱). TLR2 و TLR4 که در سطح سلولها در این زمینه یکی از نقش های کلیدی در پاسخ های ایمنی ذاتی و متعاقب آن ایمنی اکتسـابی را نسـبت بـه سـاختارهای لیپیـدی، لیپـو پپتیـدی، پپتیـدوگلیکان و پلـی ساکاریدی موجود در میکروارگانیسمها دارد.

با توجه به اهمیت بسیار زیاد TLRs در شناسایی آنتی ژنهای مختلف و القائ پاسخ های ایمنی ذاتی و متعاقب آن ایمنی اکتسابی و بالاخص اهمیت TLR2 و TLR4 که در سطح سلولهای ایمنی به وفور یافت شده و در شناسایی ساختارهای لیپیدی، لیپو پپتیدی، پپتیدوگلیکان و پلی ساکاریدی موجود در پاتوژنها دارای نقش می باشد و با توجه به عدم وجود اطلاعات کافی در مورد پاسخهای مولکولی ایمنی ذاتی در مقابل آنتی ژنهای کیست هیداتید، در این مطالعه، اثر آنتی ژنهای لایه زایای کیست هیداتید بر روی بیان ژنهای TLR2وTLR4 در سلولهای سیستم ایمنی خون محیطی گوسفندان سالم در شرایط برون تنی (*in vitro*) به روش realtime quatitative PCR (qPCR) مورد بررسی قرار گرفت. قدمه خود را در این مکان وارد نمایید. دقت کنید که مقدمه فاقد هر گونه شماره گذاری است.

# «فصل اول»

# مروری بر تحقیقات انجام شده

## ۱-بیماری کیست هیداتید

کیست هیداتیک (بیماری هیداتیدوز Hydatidosis) از قدیمی ترین بیماریهای قابل انتقال بین انسان و حیوانات است که اولین بار بعنوان (کیسه پر از آب) از آن یاد شده است. ارسطو و جالینوس در قرن اول میلادی و رازی در قرن نهم به این بیماری اشاراتی داشته اند (۱۲).

## ۱-۱-اکینوکوکوس گرانولوزوس

اکینوکوکوس کوچکترین کرم پهن نواری است که نام آن از دو کلمه یونانی اکینوس به معنی خار و کوکوس به معنی دانه گرفته شده است. این کرم در روده سگ و سگ سانان (گرگ، روباه و بندرت گربه) زندگی می کند و سرش را عمیقا داخل مخاط روده میزبان فرو می برد و بدنش بین پرزهای روده قرار می گیرد. نوزاد آن به نام کیست هیداتیک در اندامهای مختلف پستانداران و انسان (میزبانهای واسط) زندگی می کند .

تصویر شماره ۱-۱: انگل بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس(۱۳)

### ۱-۱- ۱-طبقه بندی اکینوکوکوس:

انگل اکینوکوکوس ازتحت شاخه[۱۶] کرمهای پهن[۱۷] و در رده[۱۸] سستودا[۱۹] و در زیر رده[۲۰] یوسستودا[۲۱] و راسته[۲۲] سیکلوفیلیده[۲۳] و خانواده[۲۴] تنیده[۲۵] می‌باشد. در حال حاضر جنس[۲۶] اکینوکوکوس دارای پنج گونه[۲۷] می‌باشد که عبارتند از :

۱: اکینوکوکوس گرانولوزوس Echinococcos granulosus(باتش،۱۷۸۶)

۲: اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس Echinococcos multilucolaris(لوکارت،۱۸۶۳)

۳: اکینوکوکوس اولیگارتروس Echinococcos oligarthrus (دیزینگ،۱۸۶۳)

۴: اکینوکوکوس فوگلی Echinococcos vogeli(روش و برنشتاین،۱۹۷۲) (۱)

### ۱-۱-۲-مورفولوژی اکینوکوکوس گرانولوزوس

کرم بالغ: کرم بالغ به طول ۷-۳ میلی متر است و معمولا ۴-۳ بند (ندرتا ۶ بند) دارد. بند ماقبل آخر بالغ و بند آخر که طول آن تقریبا برابر نصف طول بدن است، بارور می‌باشد دارای اسکولکس[۲۸] کروی و یک روستلوم[۲۹] با دو رج قلاب است که تعداد آنها بین ۳۰ تا ۵۰ عدد و اندازه آنها بین ۲۰ تا ۴۰ میکرون تغییر می‌کند. بدن کرم شامل سر، گردن[۳۰] و بندها[۳۱] میباشد که دارای سه بند و ندرتا چهار بند است. بیضه ها به تعداد ۶۵-۴۵ عدد در دو طرف بند پراکنده هستند، تخمدانها شبیه کلیه می‌باشند، منافذ تناسلی متناوب نامرتب و معمولا در قسمت وسط و یا خلف لبه بندهای رسیده و بارور به خارج باز می‌شود. در بندهای بارور انشعابات جانبی رحم رشد زیادی کرده ۱۲ تا ۱۵ عدد می‌باشند. بند آخر یا بند بارور دارای رحم میانی منشعب با ۱۵-۱۲ شاخه متصل و به طور متوسط حدود ۵۰۰ عدد تخم دارد، واژن دارای اسفنکتر و واجد رسپتاکل سمینال می‌باشد. تخم این سستود مانند تخم سایر تنیاها گرد مایل به بیضی بوده، قطر آنها ۵۰-۴۰ میکرون می‌باشد. دارای یک

---

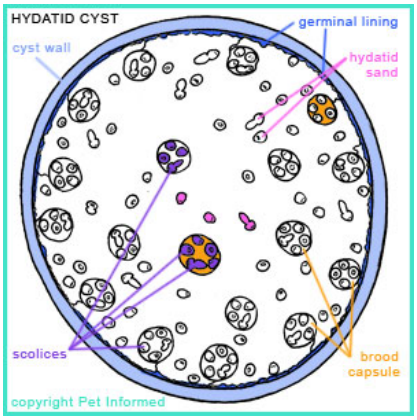
16. sub phylum
17. platy helminthes
18. class
19. cestoda
20. sub class
21. Eucestoda
22. order
23. cyclophilidea
24. family
25. taeniidae
26. Genus
27. Species
28. scolex
29. Rostellum
30. Neck
31. Proglottid

امبریفور[۳۲] (لایه داخلی) مخطط است که جنین شش قلابی[۳۳] (انکوسفر) را احاطه کرده است، تخم این تنیا به آسانی از تخم سایر تنیاها قابل تشخیص نیست (۱۴, ۱۵) .

مرحله لاروی یا متاسستود[۳۴] : مرحله لاروی اکینوکوکوس گرانولوزوس، کیست هیداتید نامیده میشود و در بدن انواع مختلف پستانداران و همچنین انسان که میزبان واسط هستند، تشکیل می‌شود. کیست هیداتید دارای ساختمانهایی می‌باشد که عبارتند از: ۱) غشای خارجی[۳۵] ارتجاعی و سخت از جنس هیالن، چند لایه و بدون هسته، به قطر یک میلی‌متر میباشد. این لایه نسبت به میکروبها غیرقابل نفوذ می‌باشد ولی مواد کریستالوئیدی و کلوئیدی را به طریق اسمز از خود عبور می‌دهد. این لایه توسط لایه زایا ترشح می‌شود. ۲) غشاء داخلی یا زایا[۳۶] :لایه ای است بسیار نازک و دانه دار، ضخامت این لایه ۱۵-۲۵ میکرون است و دارای سلولهای اپیتلیوئید و تعداد زیادی هسته میباشد که در سطح آن کیسه های زایا شکل می گیرد. این لایه مانند تگومنت کرم بالغ از سنسیتیوم سیتوپلاسمی تشکیل شده و میکروتریکسهااز آن وارد لایه مطبق فوقانی می‌شوند. ۳) کیسه زایا[۳۷] : از لایه زایا منشا می‌گیرد که توسط رشته هائی به جدار داخلی غشاء زایا متصل می‌باشد و قطر آنها ۲۵۰-۵۰۰ میکرون می‌باشد، جدار داخلی هر کیسه از اپیتلیوم زایا پوشیده شده که پروتواسکولکسها (۳-۴ عدد در هر کیسه) به وسیله تقسیم غیرجنسی[۳۸] از آن بوجود میایند. قطر آنها ۱۶۰ میکرون و دارای ۴ بادکش و نیز روستلوم مسلح[۳۹] که در ۲ ردیف دارای ۲۴ تا ۴۲ عدد قلاب می‌باشند. سر پروتواسکولکس معمولا همیشه به داخل فرو رفته و شکل گرد تا بیضی دارند، معمولا تعداد پروتواسکولکسها در هر کیست بسیار زیاد و تا ۴ میلیون نیز می‌رسد. ۴) مایع کیست هیداتید: مایعی است صاف، شفاف، زرد روشن تا بیرنگ که حاصل تراوش سرم میزبان و فعالیت خود کیست می باشد و وزن مخصوص آن ۱/۰۰۷ تا ۱/۰۱۵ می-باشد. این مایع بصورت مایع آمنیوتیک برای تغذیه و حفاظت پروتواسکولکسها که در آن شناور میباشند، عمل مینماید. این مایع حاوی اسید استیک، اسید والریک، اسید پروپیونیک، اسید سوکسینیک، اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، کلرید سدیم، فسفات سدیم، سولفات سدیم، سولفور و کلسیم میباشد. میزان سولفور کیست هیداتید بیشتر از سایر کیستها می باشد. pH مایع کیست هیداتید کمی اسیدی می باشد. رشد پیوسته کیست هیداتید به افزایش مداوم حجم مایع درون آن بستگی دارد. ۵) اطراف کیست هیداتید را بویژه در کبد یک غشای فیبروزی سه لایه، که واکنش آماسی سلولی میزبان در برابر انگل است و معمولا چسبیده به آن نمی باشد، احاطه کرده است. این لایه کمی بعد از شروع رشد انکوسفر به دور آن تشکیل می شود. شدت این واکنش بر حسب میزبانهای

[32] .Embryophore
[33] . Oncosphere
[34] .Metacestode
[35] .Laminated membrane
[36] .Germinal membrane
[37] .Brood capsules
[38] .Asexual
[39] .Armed

مختلف متفاوت است و تعیین کننده سرنوشت کیست می‌باشد، واکنش شدید موجب دژنرسانس و مرگ انگل خواهد شد. در صورتی که در میزبانهای مناسب، همین واکنشها موجب تشکیل لایه فیبروزی شده وانگل به رشد خود ادامه می‌دهد (۱, ۱۶, ۱۷).




تصویر شماره ۱-۲: تصویر شماتیک کیست هیداتید و اجزاء آن(۱۸)

### ۱-۱-۳-بیولوژی اکینوکوکوس گرانولوزوس

در جنس اکینوکوکوس چهار مرحله تکاملی وجود دارد. این مراحل از (۱) تخمک یا تخم، که به وسیله کرم بالغ تولید شده و پس از لقاح تغییرات تدریجی سلولی را طی می‌نماید، (۲) اونکوسفر (رویان)، یا لارور، که به موضع نفوذی مناسب در میزبان واسطه مهاجرت نموده، (۳) متاسستود، که در شکل تکامل‌یافته دارای اسکولکس‌های اولیه (پروتواسکولکس‌ها) بوده و (۴) کرم بالغ از نظر جنسی، می‌باشند. به دنبال بلع متاسستود به وسیله میزبان قطعی (نهایی) مناسب، پروتواسکولکس‌ها به تولید پروگلوتید امتداد یافته و انگل از نظر جنسی تکامل می‌یابد (۱۶).

تکامل از تخمک به تخم حاوی انکوسفر یا رویان شش وجهی در رحم اکینوکوکوس بالغ (در روده میزبان قطعی) صورت می‌پذیرد. اونکوسفر به وسیله چهار پوشش یا غشاء رویانی محافظت می‌شود. اندازه تقریبی اونکوسفر ۱۸٪ میلیمتر بوده، دارای قرینه دو طرفه با سه جفت قلاب (شش وجهی)، فیبرهای عضلانی، و غدد می‌باشد، که به نفوذ و حرکت آن در میزبان واسطه دخالت می‌کنند. آمبریوفور به صورت کپسول مخطط ضخیم از پوشش داخلی تکامل یافته و پوشش اصلی و مقاومترین محافظ اونکوسفر می‌باشد. غالبا اونکوسفر و غشاهای پوششی آن (به قطر ۳۰٪ تا ۶۰٪ میلیمتر) به عنوان تخم سستود درنظر گرفته می‌شوند (۱۶).

تخم‌ها با مدفوع به محیط خارج دفع شده و پس از بلع به وسیله میزبان واسط مناسب، اونکوسفرها از تخم آزاد شده و فعال می‌گردند. آزاد شدن کامل اونکوسفر از پوششهای رویانی در نتیجه هضم غشاها بدون دخالت

آنزیمهای میزبان، و همچنین فعالیت لیزکنندگی اونکوسفر فعال شده از درون، صورت می‌پذیرد. فاکتورهای موجود در محیط روده آزادسازی و فعال شدن اونکوسفر را تسهیل نموده، لیکن ممکن است این فرایند به طور خودبخودی و در مواضع خارج روده‌ای نیز اتفاق افتد. ترشحات لیزه‌کننده ممکن است عبور اونکوسفر متحرک را از مخاط روده به سیستم جریان خون میزبان (از طریق وریدی و رگهای لنفاوی) تسهیل نماید. بدین ترتیب، اونکوسفرها از سیستم خون به دیگر نقاط انتشار یافته و تکامل بعدی ادامه می‌یابد. فاکتورهای تشریحی و فیزیولوژی میزبان، و همچنین سویه سستود را شامل می‌گردد. در خلال چند روز پس از رسیدن اونکوسفرها به موضع تدریجی مناسب، تکامل کیستی آغاز می‌شود. این فرایند دژنراسیون مرحله اونکوسفر و ظهور مرحله متاسستود را دربر می‌گیرد. کشت آزمایشگاهی موفقیت آمیز اونکوسفرهای اکینوکوکوس گرانولوزوس نشان داد که در خلال ۴ تا ۷ روز لارو یک کیسه تاول مانند با لایه زاینده تغییر می‌یابد. در طی ۱۰ روز، لایه اخیر ورقه-های بی یاخته تشکیل می‌شود. رشد آزمایشگاهی افزایش قطر کیست به طور متوسط ۴ میلیمتر در ماه بوده، لیکن در میزبان واسط بسیار کندتر و از نوعی به نوع دیگر به حد وسیعی متغیر است عموما، قطر کیستهای هیداتید از ۱ تا ۵ سانتیمتر در سال (در ارتباط با فاکتورهای تاکنون ناشناخته) افزایش می‌یابد. تشکیل پروتواسکولکس در طی ۴ ماه در موش سفید صورت پذیرفته، لیکن در گوسفند ممکن است به بیش از یکسال نیاز باشد (۱۴, ۱۶).

متاسستود تکامل یافته (هیداتید) اکینوکوکوس گرانولوزوس تک حفره‌ای[40] بوده و از مایع پر شده است. از نظر ساختمانی کیست از یک لایه سلولهای زاینده درونی تشکیل شده و از قسمت خارج به وسیله غشاء بدون سلول اسیدوفیلیک ویژه‌ای با ضخامت متغیر احاطه گردیده است. گسترش لایه زاینده به تشکیل سنسیتیوم منجر گردیده، که با رشته‌های مویی متعدد مشخص می‌شود. زائده‌های مویی محیطی در جهت بافتهای میزبان، کیست را احاطه می‌نمایند. اطراف کیست در نتیجه واکنش بسیار متغیر میزبان به وسیله غشاء گرانولوماتوزی پوشیده می‌شود. کیستهای ثانوی کوچک با نام (کپسولهای زاینده) یا کیسه های زایا از داخل لایه زاینده، جوانه زده، به طریق چند رویانی، پروتواسکولکس‌های متعدد تولید می‌نمایند. پروتواسکولکس، اسکولکسی با روستلوم و مکنده بوده که عمیقا در ناحیه خلفی مکنده عقب کشیده است. در انسان، رشد کند کیستهای هیداتید ممکن است به حجم چندین لیتر و حاوی چندین هزار پروتواسکولکس منجر شود (۱۴, ۱۶).

با بلع متاسستودهای گونه‌های اکینوکوکوس به وسیله میزبانان قطعی مناسب، پروتواسکولکس‌های تحریک شده به وسیله صفرا، PH، و احتمالا فاکتورهای دیگر میزبان، در قسمت بالای دئودنوم آزاد می‌شوند. بر طبق نظر اسمیت، بعدا پروتواسکولکس‌ها مسیر خود را در بین پرزها پیموده و ممکن است وارد کریپت‌های لیبرکون شده، تماس نزدیکی با مخاط روده میزبان بدست آورند. تشکیل پروگلوتید شروع شده، و تکامل استروبیلار تا

[40] Unilocular hydatid cyst

مرحلـه بـالغ بـاروری ادامـه یافتـه کـه تقریبـا ۳۲ روز بـرای اکینوکوکـوس مـولتی لوکـولاریس، ۴۸ روز بـرای اکینوکوکوس گرانولوزوس، و ۸۰ روز برای اکینوکوکوس اولیگارتروس به طول می‌انجامد (۱, ۱۶).

### ۱-۱-۴-راه‌های انتقال بیماری به انسان

الف) تماس نزدیک و مستقیم با سگ‌های آلوده

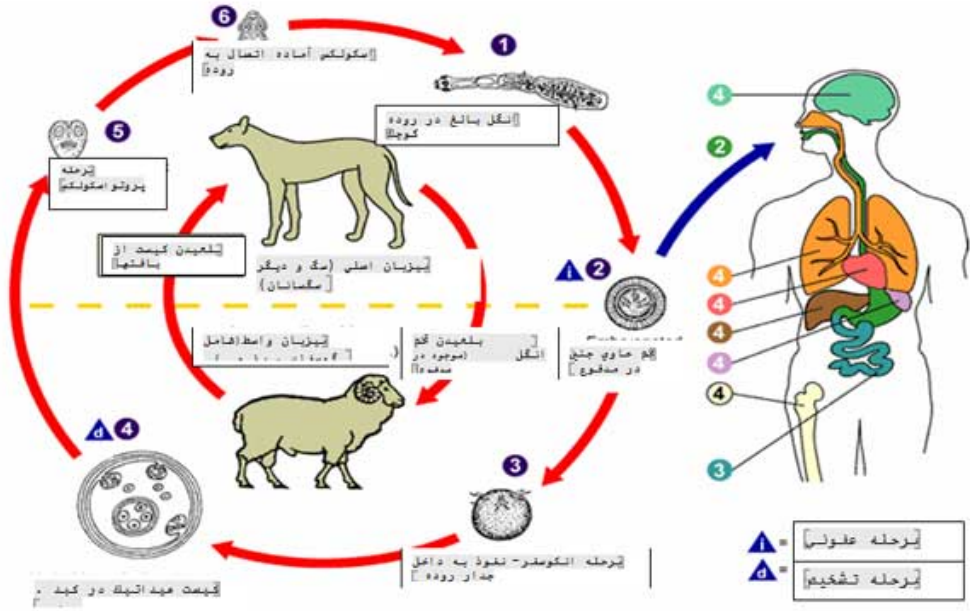
ب) تماس مستقیم با مدفوع سگ‌های آلوده

ج) مصرف آب، غذا و سبزیجات آلوده شده به مدفوع سگ. لازم به توضیح است که انسان با خوردن گوشت آلوده به کیست به این بیماری دچار نمی‌شود. براساس اطلاعات موجود، عمده‌ترین راه انتقال، مصرف سبزیجات آلوده و عدم شستشو دست‌ها با آب و صابون بعد از پاک کردن سبزی و قبل از غذا خوردن می‌باشد (۱۹).

### ۱-۱-۵-سیر تکاملی و مرحله بیماری‌زایی

در بند آخر کرم بالغ (بند بارور) تعداد زیادی تخم وجود دارد که به همراه مدفوع سگ دفع می‌شود. تخم انگل بسیار کوچک و غیرقابل رؤیت است. تخم‌ها در خاک مرطوب و سایه به مدت چند مـاه بـه حیـات خـود ادامـه می‌دهند. تخم‌ها دارای چند لایه و لایه‌ها از جنس کراتین و نسبت به تغییرات محیط بسیار مقاوم و مـی‌تواننـد در ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ سال و در طبیعت برحسب درجه حرارت و شـرایط جـوی ۳ تـا ۸ مـاه زنـده بمانند. اما در مقابل نور خورشید ظرف چند ساعت قابلیت اتصال به سلول‌های میزبان را از دست می‌دهند. هـر ۷ تا ۱۴ روز یکبار یک بند بارور حاوی حدود ۱۳۰۰ تخم انگل دفع می‌کند که در داخل روده یا خارج پاره شده و تخم‌ها در محیط پراکنده می‌شوند. گاهی یک قلاده سگ به ۱۰۰۰-۵۰۰ عدد اکینوکوک مبتلا است و بـدین ترتیب هر روز تعداد زیادی بند بارور و تخم انگل از طریق مدفوع دفع نموده و آلودگی شدید محیط را به همراه دارد. تخم‌ها پس از خورده شدن توسط انسان یا دام در روده بازشده و جنین کوچکی از آن خـارج شـده کـه ۶ قلاب دارد. جنین قلابدار (انکوسفر) در مخاط روده نفوذ کرده و از طریق عروق خونی می‌توانـد بـه کلیـه نقـاط بدن برود. انکوسفر پس از توقف در اعضا مختلف بدن (کبد، ریه، مغز، اسـتخوان، طحـال و ...) شـروع بـه رشـد می‌کند و به شکل کیسه‌ای در می‌آید که به آن کیست هیداتیک گویند. هر کیست، پر از مایع شفاف است کـه حاوی جنین یا لاروهای متعدد می‌باشد. کیست‌ها به مرور رشد کرده و قطر آن به ۵ تا ۲۰ سانتی‌متـر افـزایش می‌یابد و گاهی حجم درون کیست به ۲ لیتر نیز می‌رسد. در صورتی که کبد یـا ریـه عضـو مبـتلا بـه کیسـت هیداتیک در گاو و گوسفند و ... به نحوی مورد تغذیه حیوانات دیگر مانند سگ قرار گیرد، کیست‌هـا در داخـل روده کوچک باز شده و جوانه‌های داخل کیست (اسکولکس) به جدار روده کوچک می‌چسبند و بالغ می‌شـوند و سرانجام کرم بالغ با تولید تخم، چرخه را در طبیعت ادامه مـی‌دهـد. از هنگـامی‌کـه سـگ احشـاء کیسـتیک را

می‌خورد تا تشکیل کرم بالغ و بند بارور حدود ۷ هفته طول مـی‌کشـد کـه ایـن زمـان در پیشـگیری و درمـان سگ‌های صاحب‌دار بسیار اهمیت دارد (۱۴, ۱۵).



تصویر شماره ۱- ۳: چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس(۲۰)

### ۱-۱-۶-دوره کمون بیماری

دوره کمون ممکن است ۵ تا ۲۰ سال طول بکشد و برحسب محل، نوع و شدّت ضایعات، علایم بیماری فرق می‌کند (۱۶).

### ۱-۱-۷ علائم بیماری در انسان

بیماری در سگ هیچ علامت مشخصه‌ای معمولاً ندارد. علائم کیسـت در انسـان بسـتگی بـه انـدازه و محـل جایگزینی آن دارد. حدود ۹۰٪ کیست‌ها در ریه و کبد تشکیل می‌شوند. اگـر بافـت اطـراف کیسـت نـرم باشـد کیست می‌تواند بزرگ و حتی به اندازه یک توپ فوتبال نیز برسد. کیسـت تشـکیل شـده در اسـتخوان معمـولاً کوچک و مایع داخلی آن کم می‌باشد و عمدتاً حفره میانی استخوان را مورد تهاجم قرار داده و باعث فرسـودگی و شکستگی استخوان می‌گردد. در کیست‌های کبدی، علائمی مثل: بزرگی کبـد، قـولنج کبـدی و زردی دیـده می‌شود و در کیست‌های ریه، علائم مختلفی از جمله سرفه، تنگی نفس، دردهای قفسـه سـینه و خلـط خـونی دیده می‌شود. کیست در مغز، موجب اختلالات عصبی، تاری دید، لرزش و صرع می‌گـردد. کیسـت در کلیـه بـا سوزش ادرار و وجود خون در ادرار خودنمایی می‌کند. کیست قلبی ممکن است باعث تپش قلب، تنگی نفـس و