

مقایسه سویه حاد و تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندئی در پاسخ ایمنی و ایجاد تغییرات هورمون تستوسترون در موش صحرایی

• زهره دیور

گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، ایران

• هانیه رضایی

دانشجوی دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد کازرون، ایران

• مهدی نام‌آوری (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۹-۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۲-۲۴

Emali: namavari@yahoo.com



چکیده

توکسوپلازما گوندئی تک‌یاخته بیماری‌زا با گسترش جهانی می‌باشد. از آنجا که این انگل قادر به ایجاد تغییرات هورمون تستوسترون است و از طرفی این تغییرات نقش مهمی در سلامتی دارد در این مطالعه به مقایسه سویه حاد و تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندئی در ایجاد تغییرات هورمون تستوسترون و پاسخ ایمنی در موش صحرایی خواهیم پرداخت. بدین منظور ۲۱ سر موش صحرایی به سه گروه هفت تایی تقسیم شدند. گروه اول سویه حاد، گروه دوم سویه تخفیف حدت یافته و گروه سوم محیط کشت دریافت کردند. خون‌گیری برای بررسی تغییرات هورمون تستوسترون و آنتی‌بادی انجام گرفت و یک ماه پس از چالنج نمونه‌های بافت مغز و کبد برای بررسی پاتولوژیکی گرفته شد. نتایج نشان داد که پاسخ آنتی‌بادی گروه تزریق شده با سویه تخفیف حدت یافته در مقایسه با گروه کنترل بطور معناداری افزایش یافته است ($P \leq 0/05$). همچنین این سویه قادر به جلوگیری از تغییرات هورمون تستوسترون پس از چالنج بود که در مقایسه با گروه کنترل از تفاوت معناداری برخوردار بود ($P \leq 0/05$). در بررسی‌های پاتولوژیکی سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندئی ضایعات التهابی کمتری نسبت به گروه حاد در بافت کبد نشان داد. علائم در این بافت شامل خونریزی خفیف و نفوذ کم سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای چند کانونی در بافت بود. نتایج نشان داد که سویه تخفیف حدت یافته تا حدود زیادی موش‌ها را در مقابل بیماری‌زایی و تغییرات هورمون تستوسترون ناشی از چالنج با توکسوپلازما گوندئی محافظت نموده است. از این رو این سویه می‌تواند برای تحقیقات تکمیلی در راستای تهیه واکسن در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: توکسوپلازما گوندئی، تستوسترون، موش صحرایی، واکسن

- Veterinary Researches & Biological Products No 131 pp: 50-60

Comparison of acute strain and attenuated *Toxoplasma gondii* strain in immune response and induction of testosterone changes in rats

By: Divar, Z., Biochemistry Department, Fars Science & Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran. Rezaei, H., School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon, Iran. and Namavari, M., (Corresponding Author) Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.

Received: 2019-12-02 Accepted: 2020-03-14

Emali: namavari@yahoo.com

Toxoplasma gondii is a pathogenic protozoan with a worldwide spread. Since this parasite is capable of producing testosterone hormone changes and has an important role in health, in this study we will investigate the immune response and testosterone changes in rats after immunization with *Toxoplasma gondii* attenuated strain. For this purpose, 21 rats were divided into three groups (each n=7). The first group received the acute strain with low dose and the second group received the attenuated strain and the third group was considered as the control. One month after the immunization, mice were challenged. Blood samples were collected to investigate changes in testosterone and antibodies. One month after challenge, brain and liver tissue samples were taken for pathological examination. The results showed that the antibody response was significantly different in the group injected with the attenuated strain compared to the control group. The attenuated strain was also able to prevent changes in testosterone after challenge, which was significantly different ($P \leq 0.05$) from the control group. In pathological findings the least pathogenic changes were observed in the tissues of the group injected with the attenuated strain. Symptoms in this tissue included mild bleeding and low infiltration of multifocal inflammatory mononuclear cells. The results showed that the attenuated strain protected the mice against the pathogenicity and alterations of testosterone induced by challenge with *Toxoplasma gondii*. The results of this study confirm that the attenuated strain can be considered for further vaccine researches.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Testosterone, Rat, Vaccine

دید شده است در انسان یک مطالعه نشان داد غلظت تستوسترون بزاق در مردان آلوده به انگل افزایش یافته (۵). توکسوپلاسموز، باعث تغییرات رفتاری و هورمونی در انسان و جوندگان می‌گردد. این تک‌یاخته به صورت نهفته قادر به تغییر غلظت هورمون تستوسترون در انسان و حیوان است و حتی قادر به افزایش نسبت جنسیت نر در هر تولد می‌باشد (۶ و ۵). از آنجا که این انگل قادر به ایجاد تغییرات در مکانیزم داخل سلولی است و از طرفی تغییرات هورمونی جنسی نقش مهمی در سلامتی انسان‌ها دارند، (۷) در این مطالعه به بررسی میزان پاسخ ایمنی در بدن موش رت پس از آلودگی با سویه جدید و تخفیف حدت یافته توکسوپلاسمای گوندئی که در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی تهیه گردیده است، خواهیم پرداخت، و تأثیر آلودگی با این سویه جدید را بر روی سطح سرمی تستوسترون موش صحرایی بررسی خواهیم نمود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه سویه حاد RH توکسوپلاسمای گوندئی و سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلاسمای گوندئی موجود در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی

مقدمه

توکسوپلاسموز عفونت مشترک بین انسان و حیوانات است که دارای گستردگی جغرافیایی وسیعی در سطح جهان می‌باشد. این بیماری توسط تک‌یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکسا به نام توکسوپلاسمای گوندئی ایجاد می‌شود. اگرچه تنها میزبان اصلی این تک‌یاخته گربه می‌باشد اما این تک‌یاخته طیف وسیعی از پستانداران و پرندگان را آلوده می‌سازد. آلودگی به این تک‌یاخته تاکنون در ۲۰۰ گونه جانوری گزارش شده است (۱). توکسوپلاسمای گوندئی باعث ایجاد کیست در مغز می‌شود که ایجاد این کیست در مغز می‌تواند باعث افزایش سطح دوپامین و ایجاد التهاب در مغز شود. التهاب ایجاد شده، سایر قسمت‌های مغز بخصوص تولید هورمون‌های استروئیدی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). مطالعات قبلی نشان داده که سطوح بالای هورمون استروئیدی همراه با پاسخ ایمنی پایین در افراد، به بقای این انگل در بدن کمک می‌کنند (۳). بعبارتی بین ابتلا به توکسوپلاسمای گوندئی و افزایش میزان تستوسترون پلاسمای خون، رابطه مستقیمی وجود دارد (۶ و ۴). همچنین شواهدی مبنی بر افزایش غلظت تستوسترون در انسان و حیوانات مبتلا به آلودگی توکسوپلاسموز

توکسوپلازما گوندنی به میزان 10×10^6 در حجم $50 \mu\text{l}$ PBS به صورت زیر جلدی تلقیح شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان تغییر ضخامت در مقایسه با پای چپ موش‌ها که با $50 \mu\text{l}$ PBS تلقیح شده بودند، توسط کولیس دیجیتال با دقت $0/01$ میلی‌متر تعیین و ثبت گردید. براساس مطالعه قبلی یک ماه پس از چالنج کلیه موش‌ها طبق اصول اخلاقی کشته شدند و نمونه‌های بافت کبد و مغز برای تهیه اسلاید پاتولوژی برداشته شد (۷). برای اندازه‌گیری هورمون تستوسترون از کیت تجاری الیزا محصول شرکت ZellBio استفاده شد. به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی علیه توکسوپلازما نیز الیزا طبق روش داویسون و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد (۷۱۰) در این روش از 2×10^6 تاکی زوایت توکسوپلازما فیکس شده توسط فرمالین سه بار با PBS شست‌وشو داده و در هر چاهک پلیت ELISA به عنوان آنتی‌ژن الصاق گردید همچنین از آلبومین سرم گاو یک درصد بعنوان بافر پوشاننده استفاده شد. یکصد میکرولیتر از سرم‌های رقیق شده با رقت $1/25$ مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنتی‌بادی کونژوگه با آنزیم پراکسیداز به اندازه 100 میکرولیتر به هر چاهک اضافه شده و یک ساعت انکوبه می‌شود. شایان ذکر است که در هر مرحله از بافر PBS tween جهت شست‌وشو استفاده شد. سپس به هر چاهک 100 میکرولیتر رنگ OPD اضافه می‌شود و به مدت 15 دقیقه در تاریکی قرار می‌گیرد. پس از طی مدت‌زمان موردنظر، 100 میکرولیتر اسیدسولفوریک 12.5% به هر چاهک اضافه می‌شود. برای قرائت نتایج، چاهک‌ها در دستگاه ELISA reader و طول‌موج 450 نانومتر قرار داده می‌شود.

ارزیابی آماری

نتایج بدست آمده به وسیله آنالیزهای آماری Anova توسط برنامه spss مورد بررسی آماری قرار گرفت و مرز استنتاج آماری برای بررسی اختلاف معنی‌دار میانگین بین گروه‌های تجربی در سطح $(P \leq 0/05)$ نسبت به گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

رازی شعبه شیراز، کشت داده شدند و برای تزریق به موش صحرایی آماده شدند. مراحل کشت و آماده سازی تک‌یاخته طبق روش دوبئی و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد. (۸) بطور خلاصه از محیط کشت DMEM همراه با تاکی‌زوایت‌های توکسوپلازما به فلاسک کشت سلولی Vero اضافه گردید. پس از مشاهده CPE (بیش از 80%)، تاکی‌زوایت‌های موجود در هر فلاسک جمع‌آوری و پس از سانتریفیوژ، با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید و تنظیم رقت دوز مناسب برای تزریق آماده می‌شد. در این پژوهش تعداد 21 موش صحرایی نر از نژاد وستار با وزن 10 ± 160 گرم موجود در مؤسسه رازی شیراز استفاده شد. حیوانات در قفس‌هایی مخصوص و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند. همه حیوانات از شرایط یکسان محیطی و غذایی برخوردار بودند. حیوانات به صورت تصادفی انتخاب و به گروه‌های 7 تایی تقسیم بندی شدند سپس تزریق زیر پوستی به گروه‌های مورد آزمایش انجام گرفت. گروه اول به هر موش تعداد 2×10^4 تاکی‌زوایت سویه حاد توکسوپلازما گوندنی، گروه دوم به هر موش تعداد 2×10^6 تاکی‌زوایت سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندنی و گروه سوم مقدار 1 میلی‌لیتر محیط کشت استریل DMEM به هر موش تزریق شد. موش‌ها در همه گروه‌ها روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و هر گونه نشان‌های ظاهری و تلفات ثبت گردید. یک ماه بعد از تزریق به موش‌های صحرایی، چالنج با سویه حاد به میزان حاوی 100 هزار تاکی‌زوایت به صورت زیرپوستی انجام گرفت موش‌ها روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. در ضمن خون‌گیری سه هفته پس از تزریق اولیه برای ارزیابی پاسخ ایمنی و میزان هورمون تستوسترون انجام گرفت. همچنین یک هفته بعد از انجام چالنج نیز خون‌گیری و جداسازی سرم انجام شد در دمای $20-2$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمون جلدی جهت بررسی ایمنی سلولی طبق روش فرنکل انجام شد (۹)، برای آزمایش جلدی یک روز قبل از چالنج انجام شد بدین منظور ابتدا به کف پای راست هر موش تاکی‌زوایت‌های فیکس شده با فرمالین

جدول ۱- تغییرات بافتی در گروه‌های مورد مطالعه.

گروه	علامت	کیست	التهاب	خونریزی	تراکم
گروه تخفیف حدت	کید	-	+	+	-
	مغز	+	-	-	-
گروه حاد	کید	-	++	+	+
	مغز	++	-	-	-
کنترل	کید	-	++	+++	+++
		+++	-	-	-

- به معنای عدم مشاهده، + به معنی مشاهده به صورت کم، ++ مشاهده به صورت متوسط، +++ مشاهده به صورت شدید.

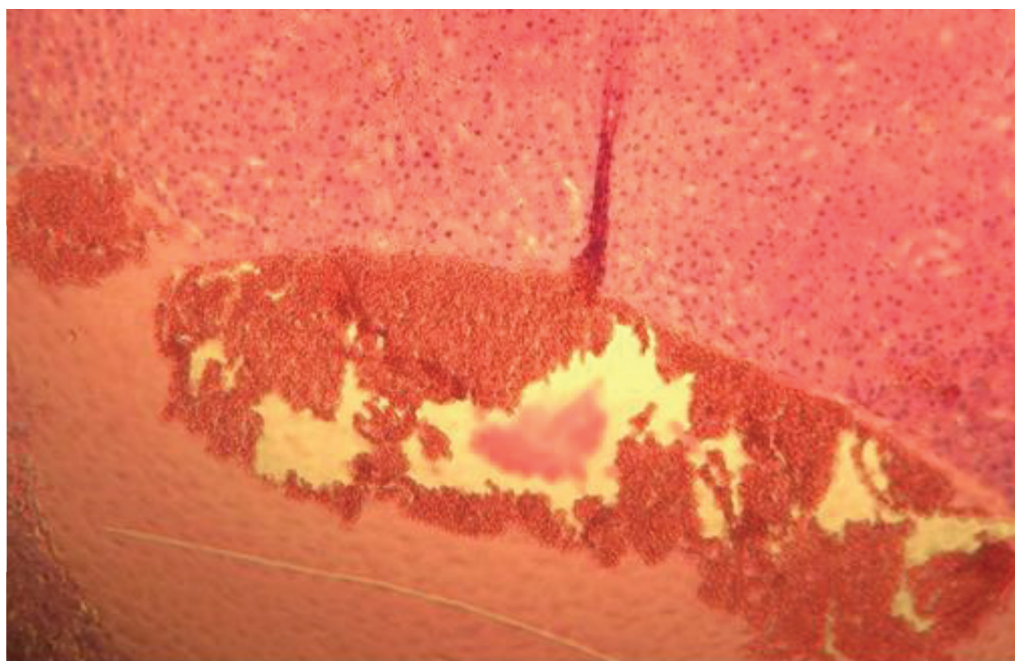
دو گروه مورد آزمایش، افزایش معناداری را در میزان آنتی‌بادی بر علیه توکسوپلاسما گوندئی، یک هفته پس از چالنج بروز داده‌اند. اندازه‌گیری هورمون تستوسترون در سه گروه مورد مطالعه طی دو مرحله (سه هفته بعد از تزریق و یک هفته بعد از چالنج)، انجام گرفت. مقایسه گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه نشان داد اختلاف معنادار بین هیچ یک از گروه‌ها وجود ندارد (نمودار ۴). بیشترین تغییرات هورمون تستوسترون بعد از چالنج مشاهده گردید به طوری که میزان این هورمون بعد از چالنج افزایش معناداری را در همه گروه‌ها نشان داد. مقایسه آماری سه گروه از نظر تیتراژ هورمون تستوسترون بعد از چالنج نشان داد کمترین میزان تیتراژ هورمون را گروه حاد نشان می‌دهد. گروه تخفیف حدت یافته نیز نسبت به گروه کنترل از کاهش معناداری برخوردار بود ($p \leq 0/05$) ولی میزان تیتراژ هورمون تستوسترون در این گروه در مقایسه با گروه حاد بالاتر بوده و اختلاف معنادار بین این دو گروه مشاهده گردید ($p \leq 0/05$)، (نمودار ۵). بیشترین افزایش در گروه کنترل که سابقه ایمنی با توکسوپلاسما را نداشته پدید آمده است بطوریکه میزان تستوسترون در مقایسه با قبل از چالنج تا بیش از سه برابر افزایش یافته است. مطالعات بافتی پس از چالنج بر روی بافت کبد و مغز از سه گروه کنترل، تزریقی با تاکی‌زوایت سویه حاد انگل و سویه تخفیف حدت یافته انجام گرفت (جدول ۱). بررسی‌های بافتی بیشترین آسیب را در گروه کنترل

نتایج

نتایج از مون پستی نشان داد که بین دو گروه تخفیف حدت یافته و گروه حاد تفاوت معناداری وجود ندارد ($p \leq 0/05$) این یافته بدان معنی است که بین دو گروه ایمن شده در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی تفاوتی وجود ندارد. در عین حال بین گروه‌های تزریق شده با سویه تخفیف حدت یافته و سویه حاد با گروه کنترل تفاوت معنادار وجود دارد ($p \geq 0/05$) (نمودار ۱).

پاسخ آنتی‌بادی در هفته سوم پس از تزریق افزایش قابل ملاحظه‌ای را در دو گروه تزریق شده با تاکی‌زوایت‌های سویه حاد و سویه تخفیف حدت یافته نشان داد. طبق نتایج آماری بدست آمده، افزایش میزان آنتی‌بادی در گروه حاد نسبت به گروه کنترل معناداری بود، این تفاوت در مقایسه با گروه تخفیف حدت یافته معنادار نبود ($p \geq 0/05$) همچنین با بررسی گروه تخفیف حدت یافته مشخص شد که پاسخ آنتی‌بادی در این گروه در مقایسه با گروه کنترل از اختلاف معنی‌داری برخوردار است ($p \leq 0/05$)، (نمودار ۲).

نتایج آزمایش الیزا در مورد پاسخ ایمنی یک هفته پس از چالنج، نشان داد که بین دو گروه تزریقی با کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p \leq 0/05$)، (نمودار ۳). همچنین تفاوت معناداری بین دو گروه تزریق شده با تاکی‌زوایت سویه حاد و تاکی‌زوایت سویه تخفیف حدت یافته مشاهده نگردید ($p \geq 0/05$)؛ بدین ترتیب می‌توان بیان داشت که هر



شکل ۱- نمای میکروسکوپی از بافت کبد گروه کنترل. پرخونی و خونریزی شدید و نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای به صورت چند کانونی مشاهده می‌شود. بزرگنمایی ۱۰۰×. رنگ آمیزی H&E.

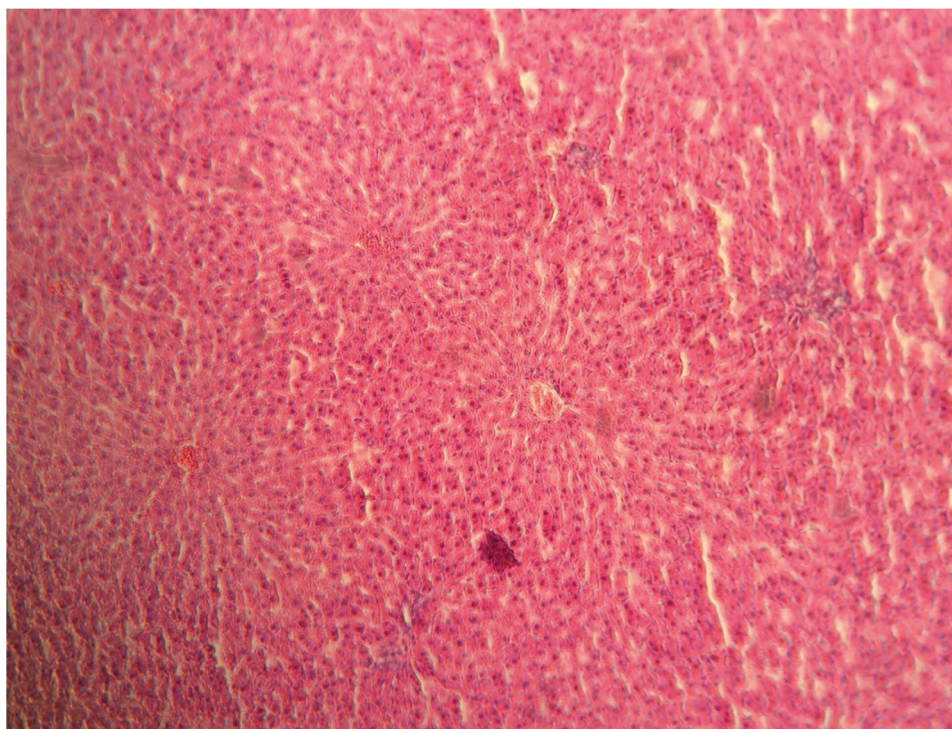
ایمنی‌زایی سویه توکسوپلازما گوندنی که قبلا در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز با پاساژهای متوالی روی کشت سلولی تخفیف حدت یافته بود (۷) با سویه حاد توکسوپلازما گوندنی مقایسه گردید. علت استفاده ما از این روش برای دستیابی واکسن این است که در حال حاضر تنها واکسنی که اجازه مصرف برای مصارف دامپزشکی دارد واکسن Toxovax است، این واکسن نیز از طریق تخفیف حدت یافتن طی پاساژهای متوالی در موش تهیه شده است و سویه زنده S۴۸ می‌باشد که برای کاهش سقط جنین در گوسفند به کار می‌رود (۱۱). گرچه واکسن‌های مورد مطالعه برای توکسوپلازما گوندنی در کاهش مرگ و میر و ایجاد کیست در بافت‌های بدن موش مؤثر بوده است ولی تاکنون ایمنی کامل بدست نیامده است ولی یکی از مؤثرترین استراتژی‌ها استفاده از سویه تخفیف حدت یافته است که باعث ایجاد ایمنی محافظتی می‌گردد (۴). از این‌رو در مطالعات قبلی ما و این مطالعه نیز از سویه تخفیف حدت یافته زنده استفاده شد (۷ و ۱۱).

در این بررسی نتایج ایمنی هومورال با استفاده از پاسخ آنتی‌بادی در خون موش‌ها اندازه‌گیری شد و پاسخ ایمنی سلولی با استفاده از انجام آزمون

نشان داد. دو گروه تخفیف حدت یافته و حاد نیز ضایعاتی را نشان دادند که از شدت کمتری برخوردار بود. کمترین شدت ضایعات در گروه تزریقی با سویه تخفیف حدت یافته مشاهده شد. (شکل ۱، ۲، ۳). طبق نتایج بدست آمده از بررسی‌های بافت کبد در گروه تزریق شده با سویه حاد ضایعات التهابی شامل خون‌ریزی، پرخونی عروق، نفوذ خفیف سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای دیده شد. در بافت مغز این گروه ضایعاتی نظیر پرخونی عروق و PVC و ساختارهایی مشابه کیست (کیست کاذب) توکسوپلازما گوندنی مشاهده شد. سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندنی ضایعات التهابی کمتری نسبت به گروه حاد در بافت کبد نشان داد. علائم در این بافت شامل خون‌ریزی خفیف و نفوذ کم سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای چند کانونی در بافت بود در بافت مغز این گروه ساختارهای کیست کاذب تاکی‌زوایت توکسوپلازما گوندنی مشاهده شد.

بحث

در مطالعه حاضر میزان تغییرات سرمی هورمون تستوسترون و پاسخ

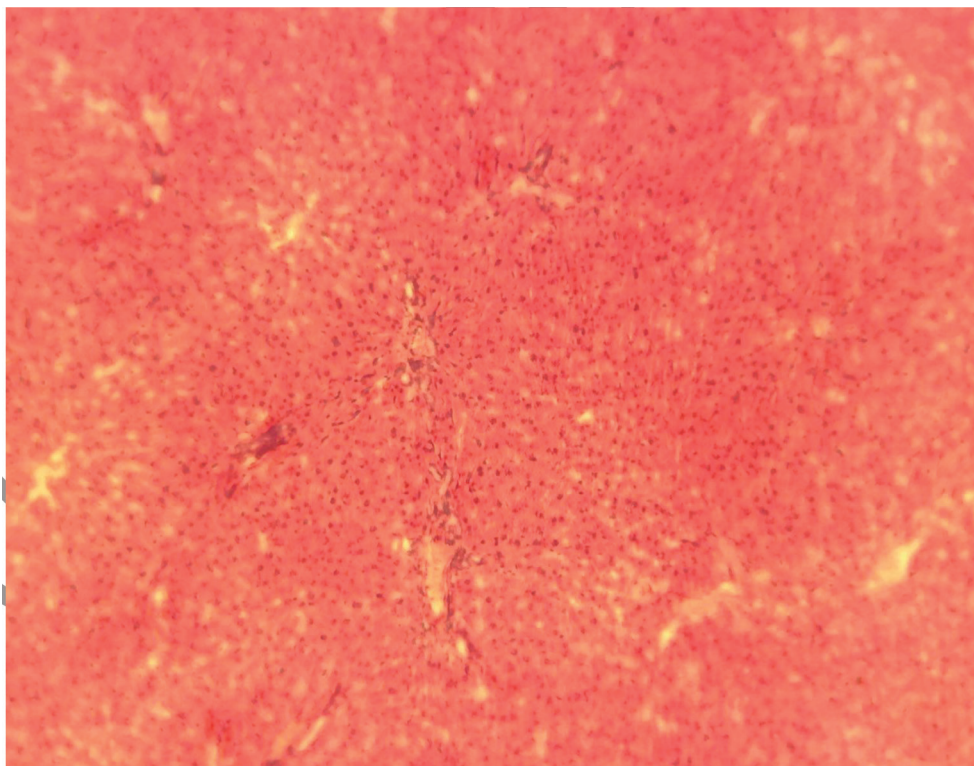


شکل ۲- نمای میکروسکوپی از بافت کبد گروه تخفیف حدت یافته. پرخونی و نفوذ سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای چند کانونی مشاهده می‌شود. بزرگنمایی ۱۰۰×. رنگ آمیزی H&E.

سطح آنتی‌بادی در گروه تزریقی با سویه تخفیف حدت یافته، برای ایجاد محافظت در برابر دوز چالنج توکسوپلازما گوندنی به خوبی بالا رفته است به طوری که در مقایسه با گروه کنترل این افزایش تیتراژ اختلاف معناداری برخوردار بود (۱۵).

همچنین برای بررسی پاسخ ایمنی سلولی از تست پوستی استفاده گردید (۱۲). پاسخ ایمنی سلولی به صورت افزایش تورم پوستی در موش‌های ایمن شده مشاهده گردید و این تورم در گروه تزریق شده با سویه تخفیف حدت یافته در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری داشت. در مطالعات قبلی نیز دیده شده سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندنی قادر به ایجاد ایمنی سلولی در موش Balb/C می‌باشد و پاسخ تست پوستی در این موش‌ها نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نشان داده (۷)، که با نتایج این مطالعه در تطابق می‌باشد. بدین ترتیب می‌توان بیان داشت که ایمنی ایجاد شده توسط سویه تخفیف حدت یافته در این مطالعه به صورت ایمنی هومورال و ایمنی سلولی خود را نشان داده است. در توکسوپلازموز هر دو پاسخ ایمنی، هم هومورال و هم سلولی، برای ایجاد محافظت کافی ضروری هستند، در نتیجه یک واکنش بایستی بتواند هر دو ایمنی را تحریک کند. (۱۶) در مطالعه حاضر

پوستی بررسی گردید. مطالعات نشان داده توکسوپلازما گوندنی موجب ازدیاد حساسیت تأخیری می‌شود که از طریق تست پوستی تشخیص داده می‌شود، و برای تشخیص آلودگی این انگل در حیوان و همچنین انسان نیز به کار گرفته شده است (۱۲). در این مطالعه ما نشان دادیم که سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندنی قادر به ایجاد آنتی‌بادی بر علیه تک‌یاخته توکسوپلازما گوندنی در موش صحرایی می‌باشد. در بررسی تیتراژ آنتی‌بادی سه هفته بعد از تزریق با سویه حاد و سویه تخفیف حدت یافته، افزایش قابل ملاحظه در تیتراژ آنتی‌بادی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. قبلاً ثابت شده که آلودگی با توکسوپلازما گوندنی موجب تحریک پاسخ آنتی‌بادی می‌شود که این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند در ایجاد ایمنی محافظت‌کننده در مقابل توکسوپلازما نقش بسزایی ایفا کنند (۱۳). در حقیقت اندازه‌گیری تیتراژ آنتی‌بادی‌های تولید شده در اثر آلودگی با انگل روش تشخیصی بسیار مناسبی برای این تک‌یاخته بوده و حتی با تعیین نوع آنتی‌بادی می‌توان مرحله عفونت را نیز تشخیص داد (۱۴). از آنجا که آنتی‌بادی‌ها می‌توانند از طریق مختلف از جمله مهار تهاجم تک‌یاخته و فعال نمودن سیستم کمپلمان، بر روی بیماری‌زایی انگل توکسوپلازما گوندنی اثر بگذارند، می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که

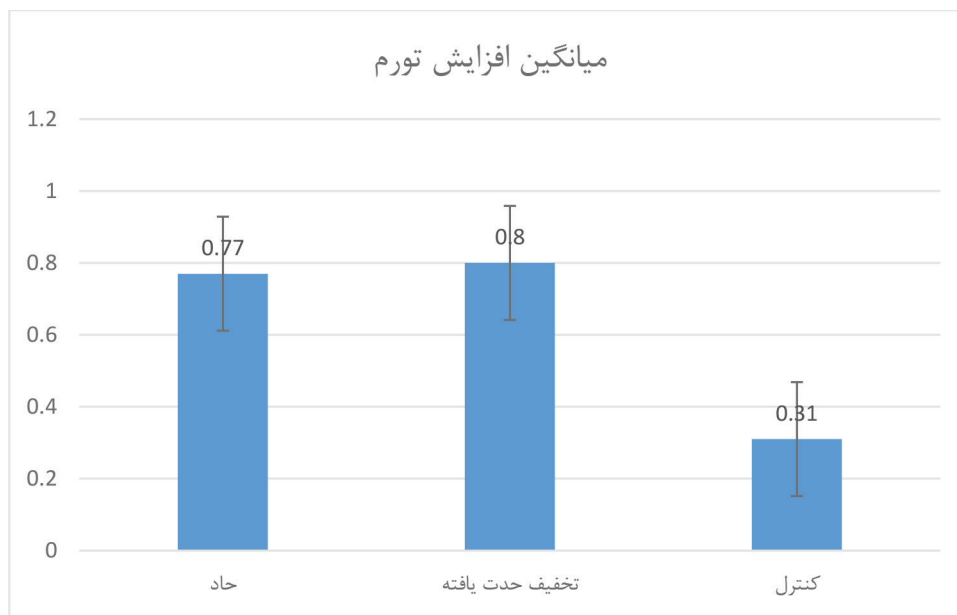


شکل ۳- نمای میکروسکوپی از بافت کبد گروه حاد. نفوذ خفیف سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای مشاهده می‌شود. بزرگنمایی ۱۰۰×. رنگ آمیزی H&E.

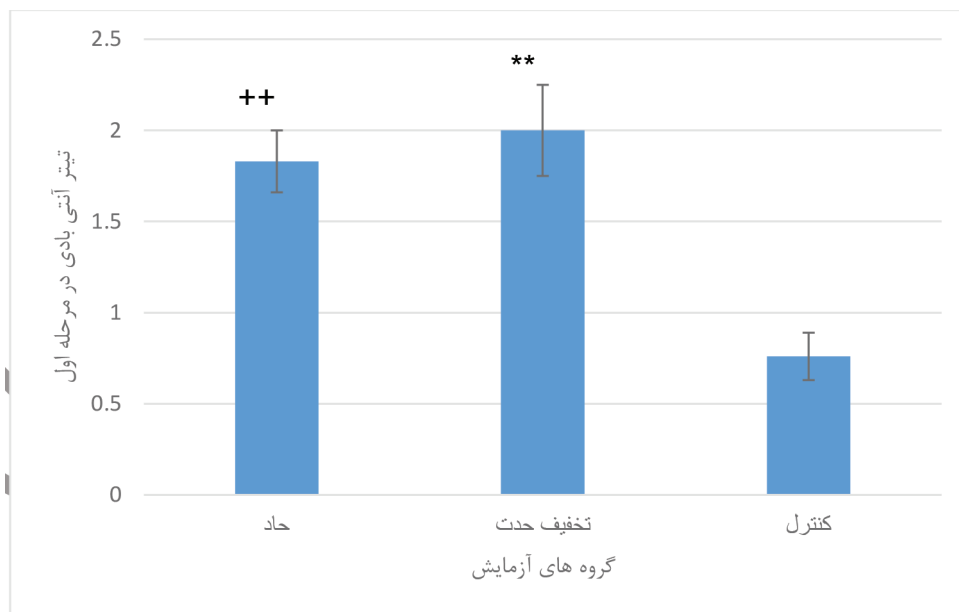
در این مطالعه تغییرات هورمون تستوسترون در موش‌های ایمن شده با توکسوپلازما بررسی گردید. توکسوپلازموز قادر به تغییر غلظت هورمون تستوسترون در انسان و حیوان است و حتی قادر به افزایش نسبت جنسیت نر در هر تولد می‌باشد (۶)؛ توکسوپلازموز، مخصوصاً به صورت نهفته، قادر به ایجاد تغییرات رفتاری و هورمونی در انسان و جوندگان می‌گردد (۵). لیم و همکاران (۲۰۱۳)، در مقاله‌ای وجود ارتباط بین توکسوپلازموز و تغییرات هورمون تستوسترون و تغییرات رفتاری را نشان دادند (۱۹). در مطالعه حاضر، میزان هورمون تستوسترون در گروه تزریق شده با سویه تخفیف حدت یافته و همچنین سویه حاد افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل قبل از چالنج نشان دادند که مطالعات قبلی را که فعالیت این تک‌یاخته باعث افزایش تستوسترون و افزایش تولید هورمون LH می‌شود را تایید می‌کند (۲۰۰۴). پس از چالنج نیز در این مطالعه میزان هورمون در گروه کنترل که تا قبل از آن با توکسوپلازما برخوردی نداشته بشدت بالا می‌رود که مجدداً تاییدی است بر اثر افزایش دهنده توکسوپلازما روی هورمون تستوسترون در حالی که در دو گروه دیگر که پاسخ ایمنی تحریک شده است و می‌توانند در مقابل چالنج مقاومت کنند این اثر تا حدود زیادی مهار شده است. گرچه مطالعه حاضر نشان داد که میزان این هورمون بعد از چالنج در گروه تزریق شده با سویه تخفیف حدت یافته نسبت به گروه حاد افزایش بیشتری داشته و دارای تفاوت معنادار است. شواهد زیادی مبنی بر افزایش غلظت تستوسترون در انسان و حیوانات مبتلا به آلودگی توکسوپلازموز

سویه تخفیف حدت یافته قادر به تحریک هر دو پاسخ ایمنی بود. البته فاکتورهای زیادی مانند سویه انگل، دوز تزریق، محل تزریق، سویه موش و دوز چالنج می‌توانند ایمنی ایجاد شده را تحت تأثیر قرار بدهند. (۱۷) توکسوپلازما گوندنی موجب آسیب شدید به بافت‌های مختلف بدن میزبان از جمله کبد و مغز می‌گردد پاسخ ایمنی بوجود آمده در بدن می‌تواند تکثیر تک‌یاخته در بدن و به دنبال آن آسیب رساندن آن به بافت‌ها را کاهش دهد. در این مطالعه همان‌گونه که در نتایج بافتی مشاهده شد، سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندنی در مقایسه با گروه کنترل در کاهش ایجاد آسیب‌های بافتی تقریباً موفق عمل کرده بود بطوری‌که علائم آلودگی در بافت مانند خون‌ریزی و پرخونی و نفوذ سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای به شدت کاهش یافته بود. این کاهش با افزایش پاسخ ایمنی در ارتباط بوده و می‌توان از این مشاهدات به عنوان یکی از آثار ایجاد ایمنی این سویه یاد نمود.

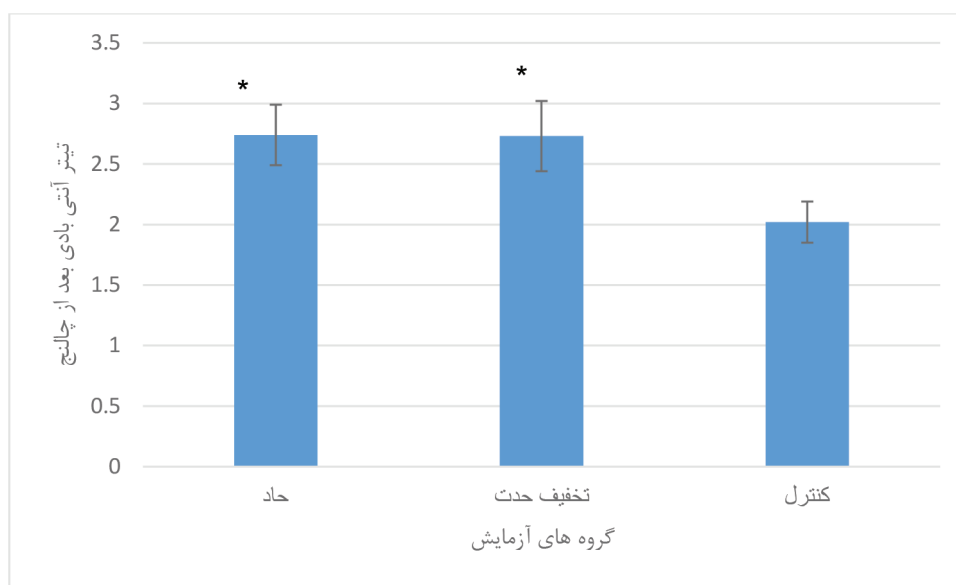
در مطالعات قبلی که در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز، بر روی این سویه تخفیف حدت یافته انجام گرفته نیز نتایج مشابه‌ای مشاهده شده است. ستاسیمی و نام اوری (۲۰۱۶)، بیماری‌زایی سویه تخفیف حدت یافته توکسوپلازما گوندنی را در تخم‌مرغ جنین‌دار مورد بررسی قرار دادند که نتایج مرگ و میر در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار نشان داد که حدت این سویه کاهش یافته است. (۱۸) همچنین عباسی‌فر کاهش بیماری‌زایی و پاسخ ایمنی محافظت‌کننده همین سویه تخفیف حدت یافته را در موش Balb/C نشان داد (۷).



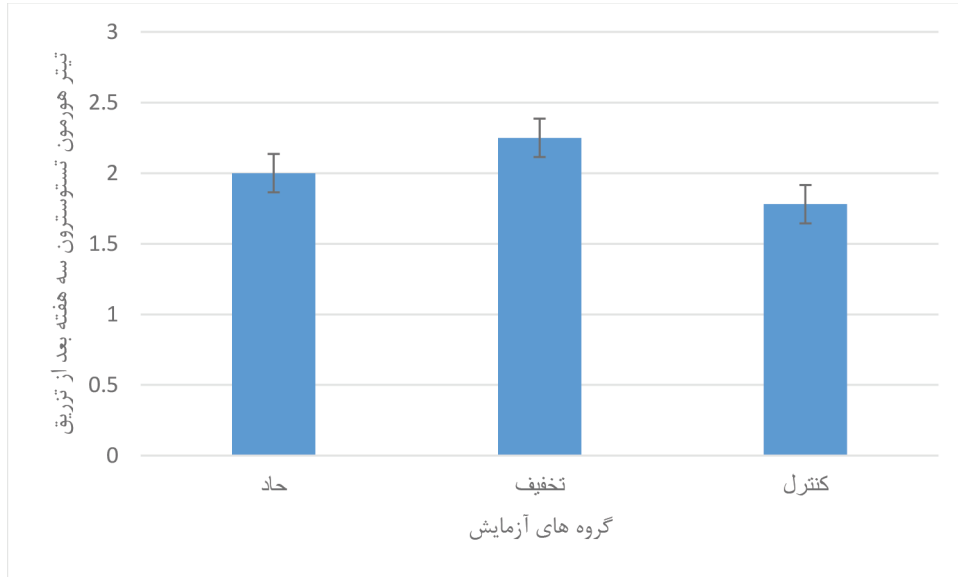
نمودار ۱- میانگین تغییرات تورم کف پا در گروه‌های مختلف برحسب میلی‌متر. افزایش تورم در تمام گروه‌ها مشاهده شد. این تغییر در گروه تزریقی با تاکی‌زوایت تخفیف حدت یافته و حاد نسبت به گروه کنترل از تفاوت معناداری برخوردار بود ولی بین این دو گروه تفاوت معناداری مشاهده نگردید.



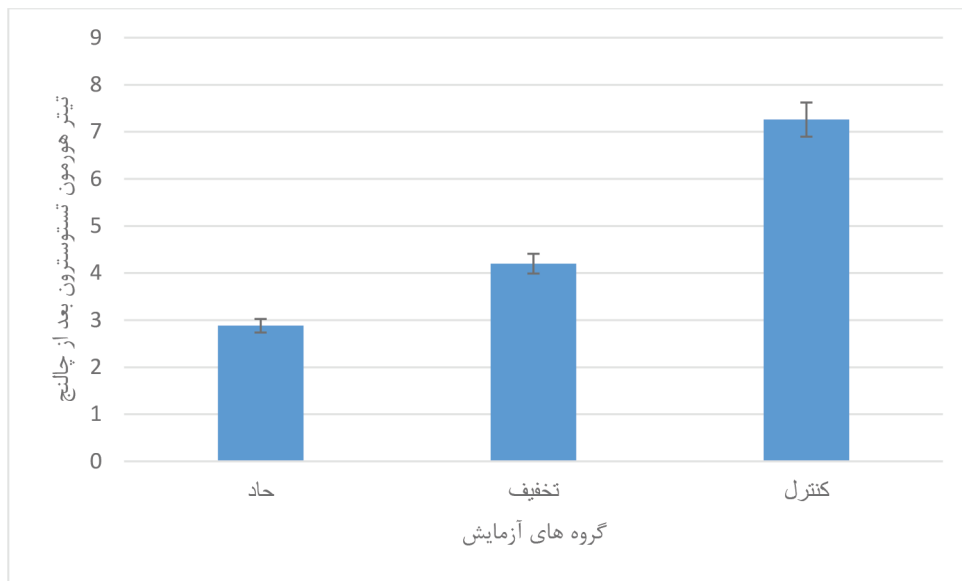
نمودار ۲- همایش میانگین تغییرات تیتراژ آنتی بادی در مرحله اول خون گیری (سه هفته بعد از تزریق) اختلاف معناداری بین دو گروه تخفیف حدت یافته و حاد مشاهده نگردید.



نمودار ۳- همایش میانگین تغییرات تیتراژ آنتی بادی پس از چالنج (با آنتی ژن. اختلاف معناداری بین دو گروه تخفیف حدت یافته و حاد مشاهده نگردید.



نمودار ۴- نمایش میانگین تغییرات تیتراژ هورمون تستوسترون سه هفته بعد از تزریق. بیشترین میزان هورمون در گروه تخفیف حدت یافته مشاهده گردید.



نمودار ۵- نمایش میانگین تغییرات تیتراژ هورمون تستوسترون پس از چالنج. کمترین میزان هورمون در گروه حاد مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۵۰۰۶۱-۰۰۹-۱۸-۸۴-۲-۲ شماره ۹۵۰۰۶۱-۰۰۹-۱۸-۸۴-۲ تامین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی آن انجام گرفته است.

منابع مورد استفاده

1. Hooshyar, H., Rostamkhani, P., & Arbabi, M. (2009). Study on growth of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in laboratory mouse. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2(4), 140-143.
2. Stibbs, H. H. (1985). Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 79(2), 153-157.
3. Flegr, J., & Hrdý, I. (1994). Evolutionary papers: Influence of chronic toxoplasmosis on some human personality factors. *Folia Parasitologica*, 41, 122-126.
4. Lim, S. S. Y., & Othman, R. Y. (2014). Recent advances in *Toxoplasma gondii* immunotherapeutics. *The Korean journal of parasitology*, 52(6), 581.
5. Flegr, J. (2013). Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. *Journal of experimental Biology*, 216(1), 127-133.
6. Flegr J, Lindová J, Kodym P. (2008). Sex-dependent toxoplasmosis-associated differences in testosterone concentration in humans. *Parasitology*. 135(4):427-31. Brief Communication: latent toxoplasmosis and salivary testosterone concentration—important confounding factors in second to fourth digit ratio studies. *American Journal of Physical Anthropology*, 137(4), 479-484.
7. Abbasifar, A., Namavari, M., Rezayian, A. (2017). Evaluation of Razi attenuated variety of *Toxoplasma gondii* in Balb/c mice. Page 107-113
8. Dubey, J. P., & Beattie, C. P. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc. pages: 1-35.
9. Frenkel, J. K. (1948). Dermal hypersensitivity to *Toxoplasma* antigens (toxoplasmins). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 68(3), 634-639.
10. Davison, H.C., Guy, F., Trees, A.J. 1999. In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Research in Veterinary Science*. 67: 103-105
11. Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, Sidney J, Alexander J, Sette A, Grigg ME, Maewal A, McLeod R. (2010). Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine*. 28(23):3977-89.

دید شده است (۴۰۵۰۶). برای مثال لیم و همکاران (۲۰۱۳)، افزایش قابل توجه هورمون تستوسترون را در موش صحرایی آلوده به توکسوپلازما گوندئی گزارش دادند. در انسان یک مطالعه بر روی ۹۱ مرد نشان داد غلظت تستوسترون بزاق در مردان آلوده به انگل افزایش یافته (۶). میزان شیوع سرمی توکسوپلازما گوندئی و اثر آن بر روی هورمون‌های جنسی را در بغداد مورد بررسی قرار دادند (۲۱). نتایج آن‌ها نشان داد که مردهای سرم مثبت دارای غلظت بالایی از هورمون تستوسترون آزاد و تستوسترون کلی هستند. همچنین افزایش غلظت تستوسترون در زن‌ها و مردهای آلوده در ایران نیز گزارش شده است (۲۲). با توجه به این موضوع می‌توان بیان داشت که سویه تخفیف‌حده یافته مورد استفاده در این مطالعه توانسته با ایجاد ایمنی در بدن موش‌های صحرایی تا حدود زیادی از افزایش غلظت هورمون تستوسترون جلوگیری نموده و این موضوع در مقایسه با گروه کنترل بسیار مشهود است. بهتر است در مطالعات بعدی بافت بیضه نیز مورد بررسی قرار گیرد تا میزان محافظت در برابر تخریب‌های احتمالی در سویه تخفیف‌حده یافته مشخص گردد. با ایجاد آلودگی توکسوپلازما گوندئی در بدن میزبان، پاسخ ایمنی بالا می‌رود که این خود بر روی تغییرات هورمونی اثرگذار است. پاسخ هورمونی میزبان آلوده که توسط پاسخ ایمنی تحریک شده موجب فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال می‌گردد (۳۲). در حقیقت فعال شدن این محور قویا با تغییراتی که عفونت توکسوپلازما گوندئی در بدن ایجاد می‌کند در ارتباط است (۲۳ و ۲۴). قبل از ثابت شدن که الودگی به توکسوپلازما باعث افزایش تستوسترون و منجر به تحریک جنسی در موش صحرایی می‌گردد (۲۴). با توجه به گزارشات منتشر شده قبلی این احتمال تایید می‌شود که دلیل بالا رفتن هورمون تستوسترون در این مطالعه افزایش قابل ملاحظه در میزان پاسخ ایمنی در بدن موش باشد (۲۳ و ۲۴).

نتیجه‌گیری نهایی

با بررسی نتایج کسب شده در این مطالعه که شامل بررسی پاسخ ایمنی هومورال و سلولی، تغییرات بافتی و تغییرات ایجاد شده در هورمون تستوسترون می‌باشد، می‌توان بیان داشت سویه تخفیف‌حده یافته توکسوپلازما گوندئی که در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی در شرایط آزمایشگاهی با پاساژهای متوالی تهیه شده است، تا حدود بسیار خوبی قادر به تحریک سیستم ایمنی، بخصوص ایمنی سلولی، بوده و قابلیت ایجاد ایمنی در میزبان، در اینجا موش صحرایی، را دارد. در مورد تغییرات در هورمون تستوسترون نیز نتایج بعد از چالنج به خوبی نشان داد که سویه تخفیف‌حده یافته تا حد بسیار زیادی مانع از افزایش تستوسترون گردید در صورتی که در گروه کنترل، تستوسترون به شدت افزایش یافته است؛ لذا می‌توان گفت این سویه تا حدود زیادی در مقابل اثرات مخرب توکسوپلازما گوندئی محافظت نموده است. بررسی بیشتر برای تعیین دقیق تغییرات ایجاد شده در سویه مورد مطالعه، مورد نیاز است و همچنین برای تعمیم نتایج به گوسفند و انسان نیاز به تحقیقات بیشتر هم بر روی دیگر حیوانات آزمایشگاهی و هم با تغییر در شرایط انجام آزمایش مورد نیاز می‌باشد.

12. Ourth, D. D., Lunde, M. N., & Watsonč, R. R. (1976). Cell-Mediated Hypersensitivity in Guinea-Pigs Infected with *Toxoplasma gondii*. *Zeitschrift für Immunitätsforschung, Experimentelle und Klinische Immunologie*, 151(3), 254-262.
13. Sabin, A. B., & Feldman, H. A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108(2815), 660-663.
14. Remington, J. S., Thulliez, P., & Montoya, J. G. (2004). Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), 941-945.
15. Mousavi, A. (1395). Use of Iranian *Toxoplasma varicella* in the detection of *Toxoplasmosis* in sheep by agglutination method and its comparison with molecular method. Supervisor Dr. Mohammad Mehdi Namavari. Islamic Azad University of Shiraz Branch. Dissertation for master's degree (M.Sc.). Biology-biochemistry major.
16. Robinson HL. Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine* 1997; 15(8): 785-7.
17. Jongert, E., Roberts, C. W., Gargano, N., Förster-Waldl, E., & Petersen, E. (2009). Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Memórias do instituto oswaldo cruz*, 104(2), 252-266.
18. Setasimy, A., & Namavari, M. (2016). Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4), 1223-1225.
19. Lim A., Kumar V., Arundathi Hari Dass S., Vyas A. (2013). *Toxoplasma gondii* infection enhances testicular steroidogenesis in rats. *Molecular Ecology*, 22(1), 102-110.
20. Lim A., Kumar V., Arundathi Hari Dass S., Vyas A. (2013). *Toxoplasma gondii* infection enhances testicular steroidogenesis in rats. *Molecular Ecology*, 22(1), 102-110.
21. Zghair KH, Al-Qadhi BN, Mahmood SH. (2015). The effect of toxoplasmosis on the level of some sex hormones in males' blood donors in Baghdad. *J Parasit Dis*. 39(3):393-400.
22. Shirbazou, S., Abasian, L., & TALEBI, M. F. (2011). Effects of *Toxoplasma gondii* infection on plasma testosterone and cortisol level and stress index on patients referred to Sina hospital, Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4(3), 167-174.
23. Bellavance, M. A., & Rivest, S. (2014). The HPA-immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. *Frontiers in immunology*, 5, 136.
24. House PK, Vyas A, Sapolsky R. (2011). Predator cat odors activate sexual arousal pathways in brains of *Toxoplasma gondii* infected rats. *PLoS One*. 6(8), e23277.

