

# بررسی سطح سرمی ایزوآنزیم آلکالین فسفاتاز روده‌ای در افراد مبتلا به ژیاوردیازیس

## چکیده

زمینه و هدف: ژیاوردیازیس توسط تک یاخته تاژکداری به نام ژیاوردیا لامبلیا ایجاد می‌گردد که در سیر زندگی خود دارای دو فرم متحرک یا تروفوزوئیت (فرم فعال) و فرم مقاوم یا کیست می‌باشد که انتقال آلودگی از طریق فرم کیست صورت می‌گیرد. از نظر بیماری‌زایی، ژیاوردیازیس تغییرات عدیده‌ای را در روده باریک اعمال می‌کند. یکی از این موارد، تغییر در سیستم آنزیمی میزبان می‌باشد؛ لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی تغییرات پاتوفیزیولوژی سطح سرمی آلکالین فسفاتاز روده‌ای در افراد مبتلا به ژیاوردیازیس می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا ۶۷ نفر از بیماران مبتلا به ژیاوردیازیس که آلودگی انگلی آنها با دو روش گسترش مستقیم و فرمل دترجنت تأیید شده بود، انتخاب شدند و سپس آزمایشات آلانین آمینو ترانسفراز (Alanin = GPT) و گاما گلو تامیل ترانسفراز (amino transfrase) و گاما گلو تامیل ترانسفراز ( $\gamma$ GT =  $\gamma$  Glutamyl transfrase) بر روی سرم این بیماران انجام گرفت، در مرحله بعد میزان آلکالین فسفاتاز توتال نیز در این بیماران ارزیابی شد. درانتها با استفاده از کیت الکتروفورز، نمونه سرم بیماران از نظر باندهای ایزوآنزیمی آلکالین فسفاتاز ارزیابی شد. در این بررسی همچنین ۳۰ نفر از افراد سالم که هیچ گونه آلودگی انگلی نداشتند، جهت مقایسه انتخاب شدند و تمامی آزمایشات ذکر شده در مورد آنها نیز انجام گرفت. این مطالعه از نوع توصیفی Cross-Sectional بود و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که در بیماران که دچار آلودگی شدید ژیاوردیایی هستند و کلونیزاسیون تک یاخته در روده باریک بیش‌تر است، ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز نیز افزایش می‌یابد. نتیجه‌گیری: آلودگی ژیاوردیا سبب می‌شود که جذب روده‌ای یون کلسیم کم شده و متعاقباً مقدار آن در سرم نیز کاهش یابد، که خود باعث افزایش ترشح هورمون پاراتورمون (Parathormone=PTH) از غدد پاراتیروئید می‌شود. این هورمون بر روی ویتامین D3 اثر نموده و آن را فعال می‌کند که اثر این ویتامین بر روی سلولهای اپیتلیال روده باریک از یک سو موجب افزایش ترشح آلکالین فسفاتاز روده‌ای شده و از سوی دیگر منجر به افزایش جذب کلسیم می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ۱- آلکالین فسفاتاز روده‌ای ۲- ایزوآنزیم ۳- ژیاوردیا لامبلیا ۴- الکتروفورز ۵- پی.تی.اچ

\*دکتر لامع اخلاقی I

دکتر هرمزد اورمزدی II

دکتر عبدالوهاب احسانی زنون III

مهدی تولا IV

خدیجه خانعلیها IV

شهاب‌الدین سروی IV

ملوک بیرموند IV

## مقدمه

ژیاوردیا لامبلیا جزء خانواده تاژکداران حیوانی (Zoomastigophora) است که برای اولین بار در سال ۱۶۸۱، وان لیون هوک (Van leeuwen hoek) این ارگانسیم را در مدفوع خودش کشف و گزارش نمود. شرح ساختمان و شکل این ارگانسیم در سال ۱۸۵۹ توسط لامبل (Lambel) ارائه

گردید و آن را سرکوموناس اینتستینالیس (Cercomonas intestinalis) نامید و بعد از مدت‌ها در سال ۱۹۱۵ توسط Stiles، ژیاوردیا لامبلیا نامیده شد.<sup>(۱)</sup> آلودگی به ژیاوردیازیس جهانی است و درایران از شیوع بالایی برخوردار است. براساس گزارش واحد

این مقاله خلاصه پایان نامه آقای مهدی تولا در مقطع کارشناسی ارشد انگل شناسی به راهنمایی آقای دکتر هرمزد اورمزدی و آقای دکتر لامع اخلاقی و مشاوره دکتر عبدالوهاب احسانی زنون می‌باشد.

(I) دانشیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (\*مؤلف مسؤول).

(II) استاد و مدیر گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

(III) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

(IV) دانشجوی دکتری انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

این مطالعه از نوع توصیفی Cross-Sectional بود و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

همچنین در این مطالعه به منظور ارزیابی و مقایسه ایزوآنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز در افراد سالم، یک گروه ۳۰ نفری از افرادی که هیچ‌گونه آلودگی انگلی نداشتند، انتخاب شدند و همانند گروه بیماران از نظر ایزوآنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز با تکنیک الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند.

ابتدا در مراجعه به این مراکز نمونه مدفوع بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه انگل شناسی با دو روش گسترش مستقیم و فرمل - دترجنت، آزمایش و نمونه‌های مثبت از نظر ژیا ردیا لامبلیا که فاقد آلودگی‌های انگلی دیگری بودند، جمع‌آوری شدند. زمانی که آلودگی ژیا ردیا در فرد با این دو روش تایید می‌شد، از بیمار مورد نظر یک نمونه خون تهیه می‌شد و سرم آن جدا شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد.

در مرحله دوم با استفاده از کیت‌های تشخیصی، آزمایش‌های GPT (آلانین آمینو ترانسفراز)،  $\gamma$ GT (گاما گلوتامیل ترانسفراز) و توتال آلکالین فسفاتاز، بر روی نمونه سرم بیماران مبتلا به ژیا ردیازیس انجام داده می‌شد و هر نمونه که از نظر GPT و  $\gamma$ GT در محدوده غیرطبیعی بود، از مطالعه حذف گردید.

لازم به ذکر است که چون آلکالین فسفاتاز علاوه بر روده و استخوان از کبد هم ترشح می‌شود، این دو تست برای اطمینان از کارایی درست کبد در بیمار می‌باشد.

تست‌های تشخیصی GPT و  $\gamma$ GT و TOTAL ALP با استفاده از کیت و به کمک دستگاه حساس اتوآنالیزر از نوع Cobas Mira انجام گرفتند.

در مرحله سوم مطالعه، هدف جداسازی باندهای آلکالین فسفاتاز با استفاده از ژل و تکنیک الکتروفورز بود. الکتروفورز روشی است که برای جداسازی فیزیکی مولکول‌ها براساس بار یونی Ionic-charge بکار می‌رود. هنگامی که مولکول باردار در یک میدان الکتریکی قرار می‌گیرد، شروع به حرکت می‌کند. عوامل مؤثر در الکتروفورز شامل بافر، میدان الکتریکی، محیط نگهدارنده و حرارت می‌باشد. (۷-۱۰)

به این منظور کیت الکتروفورز آلکالین فسفاتاز به نام SAS-MX تهیه شد و جداسازی باندها بر روی آن با

تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۲۲-۱۹٪ مردم در مناطق مختلف کشور به این انگل آلوده هستند<sup>(۲)</sup> که در سنین کودکی میزان شیوع آن بیش‌تر است. این تک‌یاخته، جهان شمول (Wide spread) می‌باشد<sup>(۳)</sup> و در مناطق گرمسیر نسبت به مناطق سردسیر شیوع بیش‌تری دارد.<sup>(۴)</sup> تروفوزوئیت‌ها به کمک تاژک‌های خود حرکت می‌کنند و چون ساکن روده باریک (دئودنوم و ژژنوم) می‌باشند، به کمک تاژک‌ها و با چسباندن صفحات مکنده خود به دیواره روده باریک در مقابل حرکات روده‌ای مقاومت کرده و ثابت باقی می‌مانند.<sup>(۱)</sup> کیست ژیا ردیا معمولاً بیضی شکل است، اندازه طولی آن ۱۲-۸ میکرومتر و عرض آن ۱۰-۷ میکرومتر بوده و دارای سیتوپلاسم دانه‌دار می‌باشد.<sup>(۲)</sup>

بر اساس مطالعات تجربی<sup>(۵)</sup> که بر روی حیوان انجام گرفته است، ژیا ردیا لامبلیا قادر است تغییرات غیر طبیعی در ساختمان مخاط روده باریک ایجاد نماید. در انسان محدوده تغییرات در مخاط روده باریک شامل درجات مختلفی از حالات نرمال تا آتروفی جزئی خمل (Villous) و حتی آتروفی نسبی و کلی خمل می‌باشد.

از تغییرات مهم که در آلودگی رت‌ها به ژیا ردیا دیده شده است، تغییر در ترشح ایزوآنزیم آلکالین فسفاتاز روده‌ای می‌باشد.<sup>(۶)</sup> براساس گزارشات رسیده مطالعات زیادی پیرامون اپیدمیولوژی ژیا ردیا و موضوعات دیگر بر روی این انگل صورت گرفته، اما ارتباط ژیا ردیا لامبلیا با آلکالین فسفاتاز تنها توسط دکتر سفران محمود و بر روی رت‌ها انجام گرفته است و هنوز ارتباط آن در انسان تا قبل از این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته بود.<sup>(۶)</sup>

با توجه به اهمیت ژیا ردیازیس در انسان و از آنجائیکه این پژوهش در انسان انجام نشده است؛ لذا هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات سرمی آلکالین فسفاتاز روده‌ای در افراد مبتلا به این انگل بود.

### روش بررسی

در این بررسی ۶۷ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به ژیا ردیازیس طی ۶ ماه مراجعه به مراکز تشخیصی و خدمات درمانی و بهداشتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران، جمع‌آوری شد و بر روی آنها آزمایش صورت گرفت.

**یافته‌ها**

در این مطالعه سطح سرمی ایزوآنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز در افراد مبتلا به ژیاوردیازیس بررسی شد. تکنیک مورد استفاده، الکتروفورز بر روی ژل آگارز بود. ۶۷ نمونه بیمار مبتلا به ژیاوردیا مورد بررسی قرار گرفت. مقدار نرمال ایزوآنزیم روده‌ای در افراد سالم بین ۱۰-۰٪ بود. در این مطالعه بیماران برحسب تعداد کیست در هر میدان میکروسکوپی طبقه‌بندی شدند.

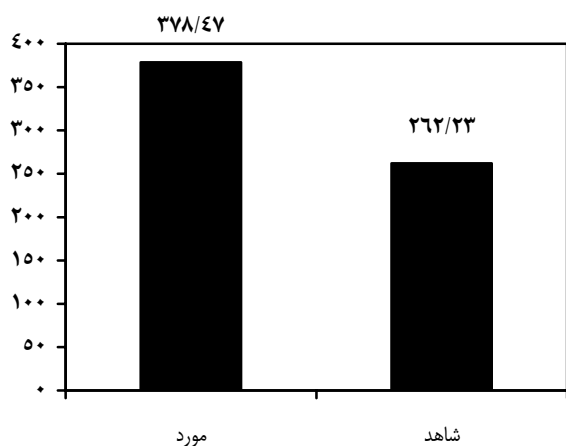
پس از اتمام الکتروفورز مشخص شد که مقدار ایزوآنزیم روده‌ای در بیماران دچار آلودگی شدید با ژیاوردیا بالاتر بود.

میزان نرمال آلکالین فسفاتازتوتال سرم در زنان و مردان به شرح زیر می‌باشد: (۸)

مردان: ۳۰۶ - ۸۰ واحد بر لیتر

زنان: ۳۰۶ - ۶۴ واحد بر لیتر

به منظور بررسی مقدار توتال آلکالین فسفاتاز در دو گروه مورد و شاهد، میانگین این آنزیم در این دو گروه مورد مطالعه قرار گرفت که میانگین آلکالین فسفاتاز توتال در گروه بیماران بیش‌تر از گروه کنترل بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P=0.000$ ) (نمودار شماره ۱).



**نمودار شماره ۱-** مقایسه میانگین آلکالین فسفاتاز توتال در دو گروه بیماران و گروه شاهد

بر طبق ضریب همبستگی پیرسون (Pearson Correlations Index) ارتباط بین شدت آلودگی ژیاوردیا با

استفاده از ژل آگارز انجام شد. برای جداسازی باندها بر روی ژل آگارز در کیت SAS-MX، ابتدا ژل از محفظه، خارج و توسط Blater که روی ژل گذاشته می‌شود، خشک شد، سپس سرم بیماران با نورآمینیداز (Noraminidase) به عنوان Enhancer، مخلوط و در دمای اتاق ۱۰ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعد محلول مورد نظر بر روی ژل برده شد و با سمپلر در جای مخصوص آن قرار گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۲۵۰ ولت در تانک مخصوص الکتروفورز گذاشته شد و در طرفین تانک ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر کیت ریخته شد. آنگاه با افزودن سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز بر روی ژل و انکوبه کردن ژل در زمان و درجه حرارت معین (۳۰ دقیقه در ۴۵ درجه سانتی‌گراد) باندهای ایزوآنزیم‌ها ظاهر شدند. (۷-۱۰) بعد از خشک کردن ژل در دستگاه دانسیتومتر با طول موج ۵۹۰ نانومتر، باندها اسکن شدند و با استفاده از نرم افزار Spss و آزمون همبستگی پیرسون یافته‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در شکل شماره ۱ نمونه‌ای از ژل آگارز که باندهای آلکالین فسفاتاز جدا شده‌اند، نمایش داده شده است. از شماره ۱ تا ۹ مربوط به بیماران مبتلا به ژیاوردیا می‌باشد و شماره ۱۰ مربوط به نمونه کنترل است که معمولاً بیماری با مشکل کبدی یا استخوانی می‌باشد. در قسمت باندها سه باند مختلف دیده می‌شود، اولین باند از بالا که در نمونه شماره ۹ و ۷ بخوبی دیده می‌شود، باند روده‌ای است، در قسمت وسط، باند استخوانی و در انتها، باند کبدی دیده می‌شود.



**شکل شماره ۱-** باندهای ایزوآنزیمی آلکالین فسفاتاز روی ژل آگارز

آلکالین فسفاتاز را در نقاط مختلف از جمله brush border های کریپت روده باریک بررسی نمودند.<sup>(۶)</sup>

عوارض و پاتوژنز ژیا ردیا لامبلیا هنوز مورد بحث می باشد، بطوری که در بعضی کتب به این انگل لقب تک یاخته هزار چهره را داده اند.<sup>(۳)</sup>

در مورد ارتباط ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز با سایر تک یاخته های روده ای هنوز پژوهشی انجام نشده است.

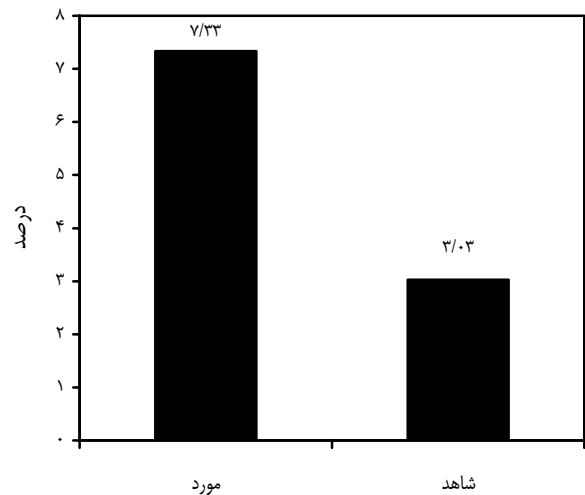
به منظور تفسیر نتایج و روشن شدن چگونگی افزایش ترشح ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز، ابتدا باید به این نکته توجه نمود که از نظر مورفولوژیک، ژیا ردیا لامبلیا دارای دو صفحه دیسک مانند کروی به نام Sucker می باشد که توسط آنها به دیواره روده باریک چسبیده و سطح جذب مواد غذایی را کم می کند.<sup>(۲)</sup>

یکی از مواد غذایی که جذب آن در ناحیه کلونیزاسیون ژیا ردیا می باشد و سطح سرمی آن در آلودگی ژیا ردیا کاهش می یابد، یون کلسیم (Ca) می باشد.<sup>(۸)</sup> زمانی که سطح سرمی یون کلسیم در آلودگی با ژیا ردیا کاهش می یابد، باعث ترشح هورمون پاراتورمون (PTH) از غدد پاراتیروئید می شود. این هورمون بر روی ویتامین D2 که شکل غیرفعال ویتامین D می باشد، اثر کرده آن را به ویتامین D3 تبدیل می کند. ویتامین D3 طبق یک فرآیند خاص ملکولی بر روی سلولهای اپیتلیال روده باریک اثر گذاشته و سه عمل مهم را انجام می دهد. دو اثر آن یعنی افزایش Protein Binding Calcium و فعال نمودن پمپهای ATP، سبب افزایش جذب کلسیم از روده می شود، اما اثر سوم ویتامین D3 بر اپیتلیال روده، ترشح آلکالین فسفاتاز روده ای می باشد.<sup>(۹)</sup>

از سوی دیگر آلکالین فسفاتازیک آنزیم غشایی می باشد، در حالی که بادکش های مکنده ژیا ردیا نیز به تخریب میکروویلی ها و غشا سلولهای اپیتلیال روده می پردازند که این نیز خود موجب افزایش ترشح آلکالین فسفاتاز از سلولهای اپیتلیال روده باریک می گردد.<sup>(۷، ۹، ۱۰)</sup> این فرآیند در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.

ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز، ۰/۷۱۲ بود که از نظر آماری معنی دار و قابل توجه می باشد (P= 0.000).

میانگین ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز نیز در هر دو گروه مورد مقایسه قرار گرفت که میزان اختلاف در گروه مورد و شاهد از نظر آماری معنی دار بود (P= 0.000) (نمودار شماره ۲).



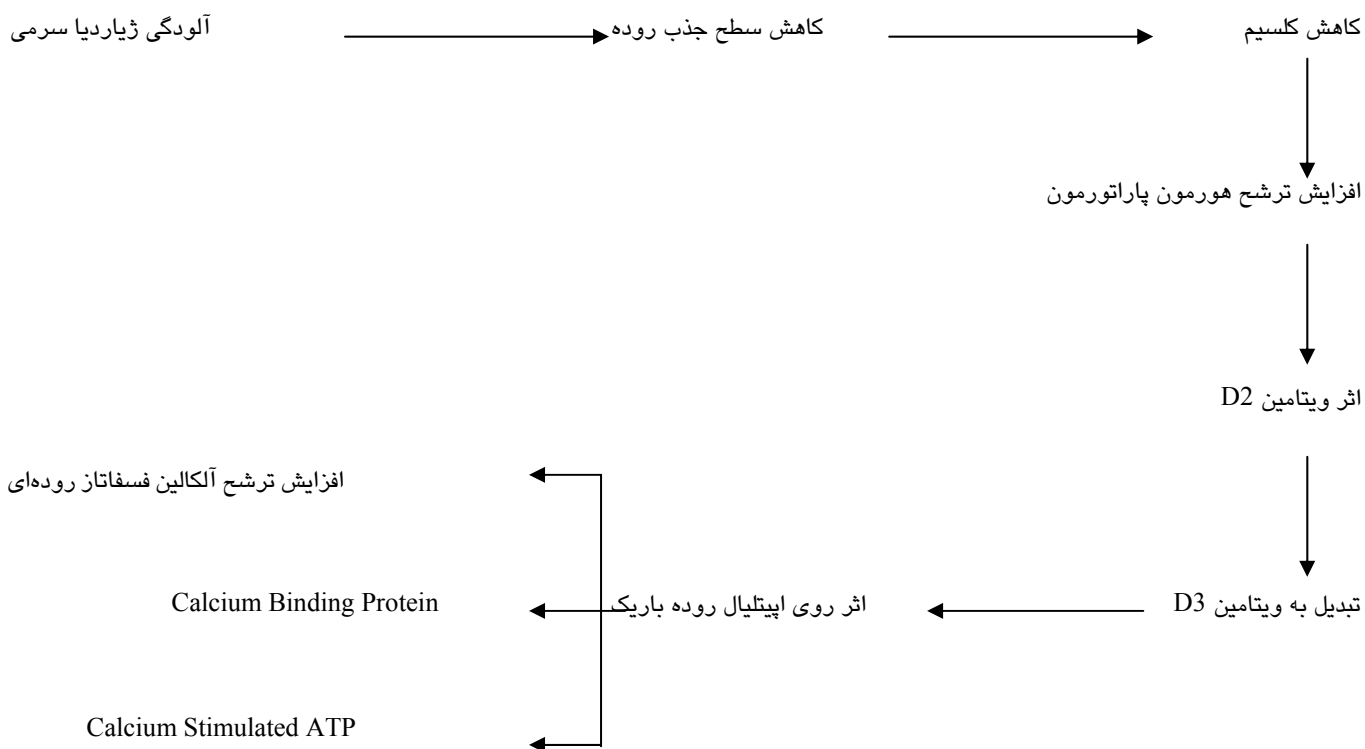
نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین آلکالین فسفاتاز روده ای در دو گروه مورد و شاهد

بیشترین مقدار ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز در افرادی وجود داشت که شدت آلودگی ژیا ردیا بیش تر بود. همچنین در این مطالعه به منظور ارزیابی و مقایسه ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز در افراد سالم، یک گروه ۳۰ نفری از افرادی که هیچ گونه آلودگی انگلی نداشتند، انتخاب شدند و همانند گروه بیماران، از نظر ایزوآنزیم روده ای آلکالین فسفاتاز با تکنیک الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند.

### بحث

ژیا ردیازیس یکی از شایع ترین آلودگی های انگلی در سطح دنیا می باشد که شیوع آلودگی در کودکان بیش تر است.<sup>(۲)</sup> انتقال آلودگی بیش تر از طریق آب و مواد غذایی آلوده به کیست صورت می گیرد.<sup>(۳)</sup>

در سال ۲۰۰۵ مطالعه ای در انستیتو بیوشیمی دانشگاه پنجاب توسط دکتر محمود و همکاران بر روی رتهای آلوده به ژیا ردیا صورت گرفت که آنها تغییرات ایزوآنزیم روده ای



شکل شماره ۲- چگونه افزایش آلکالین فسفاتاز روده‌ای (IALP) در زیاردیازیس

### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان عنوان نمود که در آلودگی‌های شدید زیاردیایی مقدار ایزوآنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز افزایش می‌یابد که مکانیسم آن تحت تاثیر یون کلسیم و اثر هورمون پاراتورمون بر روی ویتامین D می‌باشد. البته لازم به ذکر است که ایزوآنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز (Intestinal Alkaline phosphatase=IALP) یک مکانیسم دفاعی روده نیز می‌باشد که در برخی عفونت‌های روده‌ای افزایش می‌یابد و با فسفریله و دفسفریله شدن خود سبب خنثی شدن عفونت می‌شود. یافته‌های این مطالعه می‌تواند در توجیه عوارض و علائم زیاردیازیس کمک کننده باشد.

### تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی انجام گردیده است. بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤول مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی جناب آقای دکتر علیرضا سالک مقدم و سرکار محترم خانم دکتر لادن گوهری و دکتر الهام رزمجو ابراز می‌دارند.

### فهرست منابع

- ۱- غروی محمدجواد، تک یاخته شناسی پزشکی، چاپ اول، تهران، تیمورزاده نشرطبیب، ۱۳۷۸؛ صفحه: ۴۶-۳۳۲.
- ۲- صائبی اسماعیل، بیماری‌های انگلی در ایران، جلد اول، چاپ پنجم، تهران، موسسه فرهنگی حیان، ۱۳۷۷؛ صفحه: ۸۱-۵۹.
- ۳- اورمزدی هرمزد، تک یاخته شناسی پزشکی، جلد اول، چاپ پنجم، تهران، انتشارات جهاد دانشگاهی، ۱۳۷۸؛ صفحه: ۳۶-۱۲۴.
- 4- Markel J, Edward K. Medical parasitology. 8th ed. London: WB Saunders company publisher; 1999. p. 56-62.
- ۵- صوفی مهران، بررسی میزان ابتلا به انگل زیاردیا لامبلیا در افرادی که داروهای کاهش دهنده اسید معده مصرف می‌کنند. مراجعین به درمانگاه گوارش بیمارستان فیروزگر تهران، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی به راهنمایی سلیمانی زهرا. ۱۳۷۹-۸۰؛ صفحه: ۸۶-۲۲.
- 6- Safran M – Kamaljit, Nidhi M. Giardia Lambelia: Expression of Alkaline Phosphatase activity in infected rat intestine. journal of parasitology research. April 2005; 110(2). 91-5.

7- Fauchier G, Catalon N. Interpretive Guide to clinical electrophoresis. By Helena laboratories, London, 1998. p:1-3.

8- Haderslev KV, Jeppesen PB, Sorensen HA, Mortensen PB, Staun M. Vitamin D status and measurements of markers of bone metabolism in patients with small intestinal resection. Gut Journal 2003 May; 52(5): 653-8.

۹- گایتون آرتور، هال جان آرتور، فیزیولوژی پزشکی گایتون - هال، ترجمه و ویرایش حوری سپهری، علی راستگار فرج زاده با مقدمه وزیرنظرعلی حائری روحانی، تهران، اندیشه رفیع، ۱۳۸۴؛ صفحه: ۹۹۰-۱۰۰۵.

۱۰- مطیعی زهرا، گوهری لادن، بررسی ایزوآنزیم های آلکالین فسفاتاز در افراد مبتلا به آرتريت روماتوئید، پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، ۱۳۷۵؛ صفحه ۲۱-۴۵.

