مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا | سال هشتم | شماره ٤ | زمستان ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

اثرات *فاسیولا هپاتیکا* در مدل کولیت اولسراتیو ناشی از اسید استیک در رت

بیژن اسمعیل نژاد[1*]، سید میثم ابطحی فروشانی[2]، علی اصغر طهرانی[1]، هادی اسمعیلی گورچین قلعه[3]، فرشید مشرف زاده[1]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: کولیت اولسراتیو از علل شایع بیماری‌های دستگاه گوارش در کشورهای توسعه‌یافته است. این بیماری باعث ازکارافتادگی به‌خصوص در بالغین جوان می‌شود و بار اقتصادی و اجتماعی زیادی را به جامعه تحمیل می‌کند. کنترل التهاب و کاستن از اثرات سوء داروها از اهداف مهم درمان کولیت اولسراتیو است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات *فاسیولا هپاتیکا* در مدل کولیت اولسراتیو ناشی از اسید استیک در رت است.

مواد و روش‌ها: بعد از القای کولیت، رت‌ها در سه گروه ده‌تایی (گروه بدون تیمار، گروه تیمار شده با پردنیزولون (۰/۵mg/Kg-زیر جلدی) و درمان شده با انگل *فاسیولا هپاتیکا* (۱۰۰ mg/Kg-زیر جلدی) تقسیم شدند. پس از ۱۰ روز رت‌ها آسان کشی شده و ازنظر ضایعات ماکروسکوپی و تولید واسطه‌های التهابی در بافت روده و میزان تولید سایتوکاین‌های TNF-α و IL-6 موردبررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که کاهش میزان تولید میلوپراکسیداز بافتی در گروه درمانی *فاسیولاهپاتیکا* در مقایسه با پریدنوزولون تفاوت آماری معناداری ندارد. میزان تولید سایتوکاین‌های TNF-α و IL-6 در گروه‌های درمانی *فاسیولا هپاتیکا* و پردنیزولون نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری یافته بود. البته میزان کاهش در گروه درمان شده با پریدنیزولون ازنظر آماری بیشتر بود. بالعکس کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه درمان شده نسبت به گروه پردنیزولون بیشتر بود. بااین‌حال شدت کاهش علائم گراس و همچنین شاخص بقای رت‌ها در هر دو گروه درمان شده با پریدنیزولون و درمان شده با *فاسیولا هپاتیکا* یکسان بود.

نتیجه‌گیری: ازآنجایی‌که دست‌یابی به *فاسیولا هپاتیکا* ساده و سریع است، ممکن است از آن به‌عنوان یک روش درمانی جهت تخفیف علائم کولیت اولسراتیو استفاده شود.

کلمات کلیدی: کولیت اولسراتیو، اسید استیک، رت، *فاسیولا هپاتیکا*، التهاب

مقدمه

فاسیولوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده که هم به لحاظ اقتصادی و هم به لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت است. این بیماری توسط ترماتودهای کبدی گونه‌های *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* ایجاد می‌شود. به لحاظ اهمیت بیماری‌زایی، گونهٔ *فاسیولا هپاتیکا* مهم‌ترین ترماتود گوسفندان، بزها و گاوهاست (۱، ۲). گونه *فاسیولا هپاتیکا* دارای آنزیمی بنام سیستئین پروتئاز است که مانع از فعالیت گیرنده‌های شبه تول[1] (TLR) می‌شود (۳). مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که گیرنده‌های TLR یکی از عوامل دخیل در ایجاد بیماری کولیت اولسراتیو می‌باشند (۴، ۵). مطالعات اخیر ثابت کرده‌اند که *فاسیولا هپاتیکا* موجب بهبود علائم بیماری‌های خود ایمن شده و افزایش چشمگیر درصد سلول‌های T تنظیمی را

*نویسنده مسئول: **بیژن اسمعیل نژاد**، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
E-mail: b.esmaeilnejad@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-1781-5890

[1]Toll Like Receptor

موجب می‌گردد (۶، ۷). همچنین محققان نشان داده‌اند که *فاسیولا هپاتیکا* باعث القای پاسخ‌های Th2 و سرکوب Th1 می‌شود. آنتی‌ژن‌های Fg و GE *فاسیولا هپاتیکا* موجب کاهش معنادار میزان TNF-α و اینترفرون گاما و افزایش مقادیر IL-10 و IL-4 می‌شود (۸). فلوک‌های کبدی *فاسیولا هپاتیکا* موجب جهت‌دهی قوی پاسخ‌های سیستم ایمنی به سمت Th2 شده و تغییر کلاس تولید آنتی‌بادی می‌شود نه‌تنها پاسخ‌های Th1 را مهار می‌کند بلکه مطالعات انجام‌شده بر روی بیماری مالتیپل اسکلروزیس نشان داده است که *فاسیولا هپاتیکا* با مهار پاسخ‌های Th1 و Th17 موجب بهبود علائم بیماری می‌شود (۹). پاسخ‌های Th2 در عفونت‌های مزمن *فاسیولا هپاتیکا* نیز ایجاد می‌شوند. مطالعات ثابت کرده‌اند که محصولات ترشحی و تولیدی *فاسیولا هپاتیکا* موجب القای پاسخ‌های Th2 می‌شود (۱۰). علاوه بر این *فاسیولا هپاتیکا* پاسخ Th1 القاشده به دنبال عفونت بردتلا پرتوسیس و مایکوباکتریوم بویس را سرکوب کرده و موجب کاهش تعداد ماست سل‌های فعال‌شده توسط Th1 در موش می‌شود (۱۱).

بیماری التهابی روده به‌عنوان یکی از بیماری‌های جوامع صنعتی معرفی شده است که درصد زیادی از جامعه جوان کشورهای درحال‌توسعه و توسعه‌یافته را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تأثیر مستقیمی بر روی کیفیت زندگی بیماران دارد. کشور ایران نیز به‌عنوان یکی از جوامع در حال رشد و توسعه در منطقه خاورمیانه از این قانون مستثنا نیست. پیشرفت‌های صنعتی، مصرف سوخت‌های فسیلی و تغییر در شیوه زندگی مردم ازجمله مهم‌ترین عواملی است که جامعه ایران را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). مطابق مطالعات اپیدمیولوژیک انجام‌گرفته در ایران درصد بروز بیماری‌های التهابی در چند سال اخیر افزایش یافته است به‌گونه‌ای که علائم بیماری در تعداد زیادی از افراد جامعه در سنین ۱۱ تا ۳۱ سال مشاهده می‌گردد (۱۳، ۱۴). تا به امروز پژوهشگران نتوانسته‌اند اتیولوژی دقیق بیماری را شناسایی کنند. به همین دلیل بیماری بیشتر به‌عنوان یک بیماری چند فاکتوری در محافل علمی و مقالات معرفی می‌شود. به دلیل عدم شناسایی اتیولوژی دقیق لذا درمان قطعی نیز برای بیماری موجود نیست. به همین دلیل درصد زیادی از بیماران مبتلابه بیماری‌های التهابی روده‌ای، به درمان‌های موجود به‌خوبی پاسخ نمی‌دهند و علائم بیماری به‌صورت دوره‌ای عود می‌کند (۱۵). اگرچه دلیل قطعی و اصلی بیماری مشخص نیست، بااین‌وجود دانشمندان پاسخ‌های سیستم ایمنی، استعداد ژنتیکی و اثرات محیطی را سه ضلع اصلی بروز این بیماری می‌دانند. درمان‌های دارویی و تغذیه‌ای که امروزه به‌منظور سرکوب بیماری به کار می‌رود اکثراً درمان‌های علامتی و حمایتی می‌باشند بدان معنا که نمی‌توانند بیماری را به‌طور کامل درمان کنند. از سوی دیگر بخش اعظمی از داروهای موجود به دلیل عدم تأثیرگذاری، سمیت بالا، تداخل دارویی و اثرات جانبی دارای محدودیت مصرف می‌باشند (۱۶). به همین دلیل وجود یک گزینه درمانی جدید با کمترین اثرات جانبی و بیشترین اثرات ضدالتهابی بیش‌ازپیش احساس می‌شود. کنترل التهاب و کاستن از اثرات سوء داروها از اهداف مهم درمان کولیت اولسراتیو است. استفاده از داروهای ضدالتهاب کورتیکواستروئیدی و آمینوسالسیلات‌ها مؤثرترین روش درمان کولیت اولسراتیو است (۱۷). اکثر این داروها دارای اثرات جانبی شدید ازجمله ایجاد اسهال، استفراغ، اختلالات کبدی، اختلالات کلیوی، پانکراتیت و زخم‌های دستگاه گوارش می‌باشند. به‌علاوه همه بیماران به درمان پاسخ مناسبی نمی‌دهند (۱۸). از طرف دیگر بیماران مبتلابه کولیت اولسراتیو در صورت عدم کنترل التهاب درخطر ایجاد سرطان روده بزرگ هستند (۱۹). به همین دلیل تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن داروهای مؤثر با اثرات جانبی کمتر انجام می‌گیرد. تاکنون تأثیر داروها و مواد شیمیایی مختلفی بر روی بافت‌های التهابی روده در کولیت القایی سنجیده شده است. بااین‌حال تاکنون مطالعه‌ای بر روی ارتباط مستقیم در رابطه با استفاده از آنتی‌ژن‌های انگلی در تخفیف شدت بروز بیماری کولیت اولسراتیو گزارش نشده است. لذا تحقیق پیش رو بر اساس درمان تجربی کولیت با کرم *فاسیولا هپاتیکا* بنیاد شده است.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: جامعه موردمطالعه، شامل رت‌های نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بود که از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد. رت‌ها در قفسه‌های مجزا در شرایط کنترل‌شده (دمای استاندارد، رطوبت و چرخه روز و شب) و با رژیم غذایی طبیعی و آب نگهداری شدند. قبل از القای بیماری رت‌ها به مدت ۳۶ ساعت در حالت عدم دسترسی به غذا ولی با دسترسی به آب نگهداری شدند. تحت یک بیهوشی خفیف با اتر به‌منظور القای اولسر، میزان ۲ میلی‌لیتر اسید استیک ۴ درصد از طریق یک لوله پلی‌اتیلنی به داخل رکتوم

تزریق شد. رت‌های خریداری‌شده در ۴ گروه که هر گروه شامل ۱۰ رت بود به‌صورت تصادفی و به ترتیب زیر قرار گرفتند. گروه اول به‌عنوان گروه کنترل که شامل ۱۰ رت سالم بود که تحت هیچ بیماری قرار نگرفتند. گروه دوم شامل ۱۰ رت بود که به‌عنوان گروه شاهد منفی که در آن‌ها بیماری کولیت اولسراتیو القاشده و تحت هیچ درمانی قرار نگرفتند. گروه سوم، شامل ۱۰ رت بود که بعد از القای بیماری کولیت اولسراتیو تحت درمان با *فاسیولا هپاتیکا* با غلظت ۱۰۰ mg/kg به‌صورت تزریق زیر جلدی قرار گرفتند (۶، ۷). گروه چهارم شامل ۱۰ رت بود که به‌عنوان گروه شاهد مثبت بعد از القای بیماری تحت درمان با پردنیزولون (۰/۵ mg/Kg-زیر جلدی) قرار گرفتند. کلیه درمان‌ها بعد از تلقیح اسید استیک به داخل رکتوم رت‌ها، شروع‌شده و به مدت ۱۰ روز ادامه یافت.

تهیه عصاره انگل *فاسیولا هپاتیکا*: فلوک‌های بالغ و زنده *فاسیولا هپاتیکا*، توسط متخصص از کبد گاوهای کشته‌شده در کشتارگاه شهر ارومیه جداسازی شد و سپس به کمک بافر سالین هنکس و pH:7.4 شسته شدند. جهت تهیه از نمونه‌های نگه‌داری شده در PBS در شرایط فریزر ۲۰- درجه استفاده شد. نمونه‌ها پس از آب شدن در دمای محیط توسط اسکالپل خرد و له شدند. سپس توسط هموژنایزر، هموژنیزه شدند. ازآنجایی‌که با له‌کردن انگل پروتئازهای سلولی آزادشده و می‌توانند در اثر فعالیت آنزیمی خود باعث تخریب گسترده پروتئین‌های انگل شوند، از ماده‌ی PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلورید) در حلال ویژه ایزوپروپانول که خاصیت ضدپروتئازی دارد استفاده شد. جهت سونیکه کردن نمونه‌های له‌شده از دستگاه سونیکاتور استفاده شد. مقدار ۱ میلی مولار PMSF در ایزوپروپانول در ۲ مرحله یک‌مرتبه قبل از عمل سونیکاسیون و بار دیگر پس از سونیکه کردن به نمونه‌ها اضافه شد. تیوپ‌های سونیکاسیون داخل بشرهای پر از یخ خردشده قرار گرفتند تا در حین سونیکاسیون گرمای حاصله آسیبی به پروتئین‌ها وارد نکند. درمجموع ۳ نوبت ۱۰ دقیقه‌ای عمل سونیکاسیون برای نمونه‌ها انجام گرفت و در آخر نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند و مایع رویی جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از *فاسیولا هپاتیکا* تهیه و از طریق زیر جلدی به حیوانات موردنظر تزریق گردید.

بررسی شاخص شدت بیماری: در انتهای بیماری رت‌ها ازنظر وضعیت نظر قوام مدفوع و وجود خون در آن ارزیابی شدند و مطابق جدول ۱ برای هر مورد نمره بندی شدند. در انتها مجموع دو نمره مرتبط با قوام مدفوع و وجود خون در آن به‌عنوان تعیین شاخص شدت بیماری (DAI) در هر رت استفاده شد.

جدول ۱- نمره بندی به وضعیت مدفوع و مخاط

خون در مدفوع	قوام مدفوع	رتبه
نرمال	نرمال	۰
قرمز	نرم	۱
قرمز سیاه	خیلی نرم	۲
سیاه	اسهال	۳

سنجش میلوپراکسیداز: در این روش مقدار آنزیم میلوپروکسیداز موجود در سوپرناتانت حاصل از هموژنیزاسیون بافت رکتوم با ′۵،۵،′۳،۳ تترا متیل بنزیدین واکنش می‌دهد. طی این ′۵،۵،′۳،۳ تترا متیل بنزیدین به‌عنوان دهنده یون هیدروژن برای احیا H_2O_2 توسط میلوپروکسیداز عمل می‌کند. درنتیجه ′۵،۵،′۳،۳ تترا متیل بنزیدین به ′۵،۵،′۳،۳ تترا متیل بنزیدین دیمین تبدیل شده که باعث بروز یک رنگ آبی تا سبز می‌گردد. با افزودن اسیدسولفوریک واکنش متوقف می‌شود و رنگ محلول به زرد تا زرد کمرنگ تبدیل می‌گردد. نمونه‌ها در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر توسط الایزا ریدر خوانده شدند (۲۰).

سنجش میزان لپید پراکسیداسیون: اساس واکنش بر پایه تولید یک ترکیب رنگی میان مالون دی‌آلدهید (MDA) با تیو باربیتوریک اسید (TBA) است. به‌طور خلاصه ۵۰ میکرولیتر از نمونه سوپرناتانت حاصل از هموژنیزاسیون بافت رکتوم با ۳۰۰ مکرولیتر اسید اورتو فسفریک در لوله‌آزمایش مخلوط و به مدت یک دقیقه کاملاً ورتکس شد. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر اسید تیوربابیتوریک به مخلوط قبلی اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در

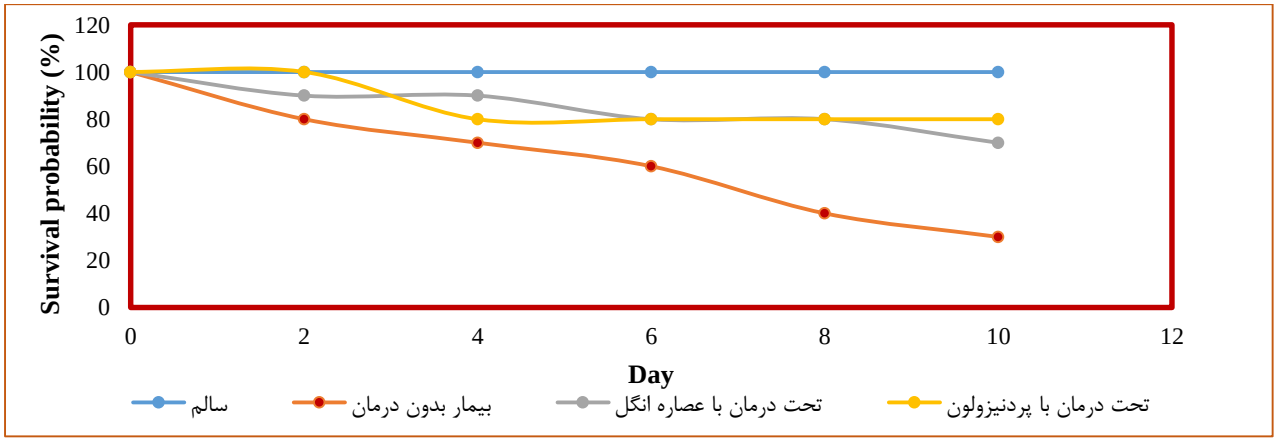
بن ماری در حال جوش قرار داده شد. در ادامه لوله‌آزمایش توسط یخ خنک شد. سپس چهار صد میکرولیتر به هر لوله‌آزمایش (هر نمونه)، N-بوتانل اضافه و به مدت دو دقیقه ورتکس شد. درنهایت لوله‌های آزمایش با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی جدا و با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر جذب نوری خوانده شد.

سنجش میزان سرمی سایتوکاین‌های TNF-α و IL-6: در روش الایزا برای سنجش میزان TNF-α و IL-6 موجود در سرم رت‌های موردمطالعه از کیت‌های مربوطه ساخت شرکت Bender med systems استرالیا طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

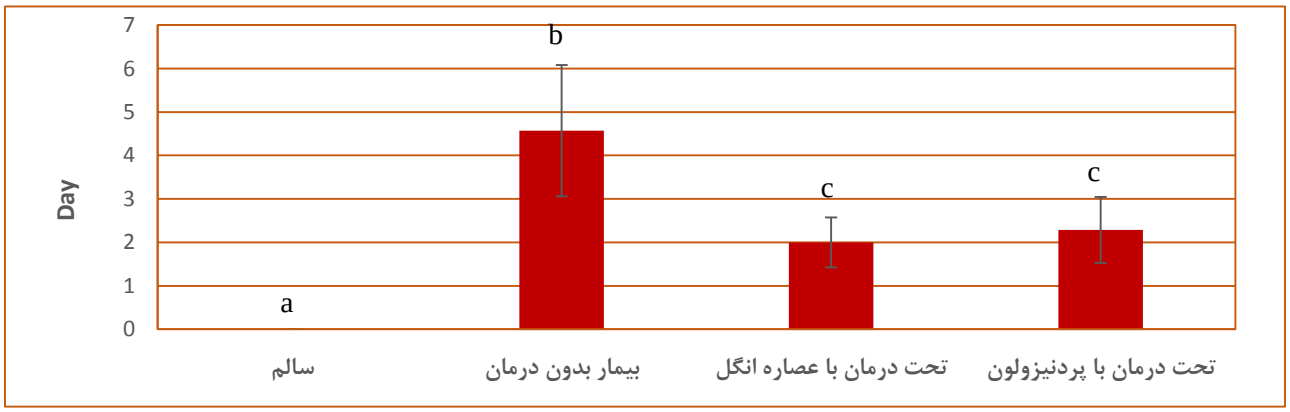
روش تحلیل داده‌ها: جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌های غیر پارامتری مرتبط با شدت بیماری از آزمون کروسیکال والیس استفاده شد. جهت مقایسه سایر داده، بعد از تائید نرمال بودن توزیع آن‌ها توسط آزمونکولموگروف–اسمیرنف از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی استفاده شد. در تمام بررسی‌ها مقدار ($p<۰/۰۵$) به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. داده‌ها به‌صورت Mean ± SD گزارش گردید.

نتایج

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، تحلیل میزان بقای رت‌ها مبتنی بر تحلیل کاپلان مایر نشان داد که رت‌های مبتلابه کولیت که تحت درمان با پردینزولون قرار گرفتند منحنی بقای بهتری نسبت به سه گروه دیگر دارند. مطابق نمودار سه روز بعد از درمان، رت‌ها به وضعیت نسبتاً پایداری رسیدند که بیانگر آن است که میزان بقا در این گروه‌درمانی ۸۰٪ است. بعدازاین گروه، گروه درمان شده با انگل نیز با ۷۰٪ میزان بقا نتایج نسبتاً قابل قبولی را نشان می‌دهد. البته ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری بین دو گروه‌درمانی وجود نداشت ($p=0.07$). گروه کنترل نیز از همان روز اول دوره درمانی به‌طور متوسط در هرروز حداقل یک مورد تلفات داشته است و میزان بقای آن حدود ۲۰٪ است (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه میزان بقا در گروه‌های درمانی

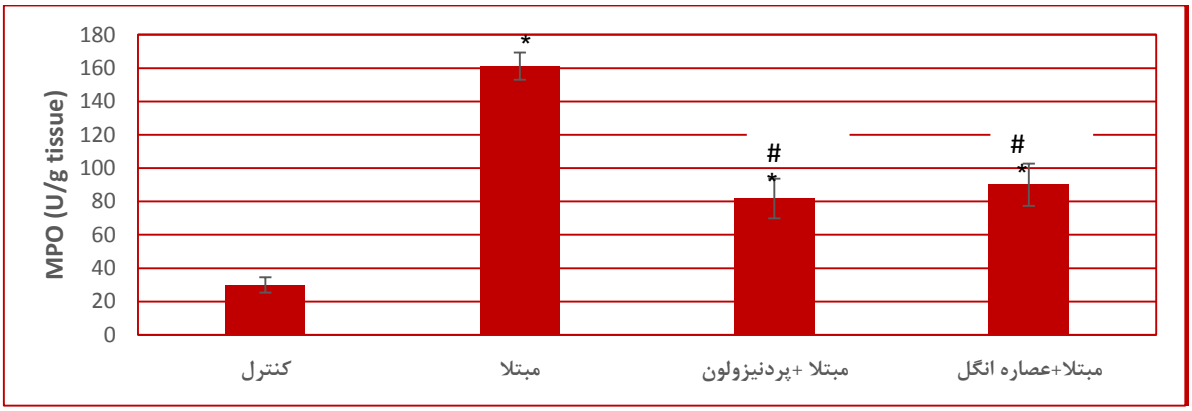


نمودار ۲- مقایسه شاخص شدت بیماری. حروف کوچک غیرمشابه به معنای اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ است و حروف مشابه به معنای عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ است.

مشابه با نتایج میزان بقاء، ارزیابی شاخص شدت بیماری نشان داد که این شاخص در هر دو گروه رت‌های مبتلابه کولیت و درمان شده با پردنیزولون نسبت به گروه مبتلا و بدون درمان کاهش می‌یابد. در اینجا نیز ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری بین دو گروه‌درمانی وجود نداشت (p=0.11، نمودار ۲).

نتایج مربوط به سنجش میلوپراکسیداز (نمودار ۳) نشان داد که مقادیر میلوروکسیداز تولیدشده در بافت رکتوم رت‌های درمان شده با *فاسیولا هپاتیکا* و پردنیزولون نسبت به گروه بیمار بدون درمان کاهش معناداری داشته است اما بین دو گروه تفاوت آماری معناداری وجود نداشت (p=0.15). البته بررسی‌های آماری نشان داد که تفاوت معناداری میان گروه‌های درمانی با گروه نرمال (سالم) ازنظر میزان تولید MPO وجود دارد (نمودار ۳).

فعالیت سایتوکاین‌های TNF-α و IL-6 در گروه‌های مختلف مطالعه بررسی گردید (نمودار ۴). میزان تولید سایتوکاین‌های



نمودار ۳- مقایسه میزان فعالیت میلوپروکسیداز در بافت رکتوم.

* نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه سالم در سطح (P<۰/۰۰۱) است.# نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا در سطح (P<۰/۰۰۱) است.



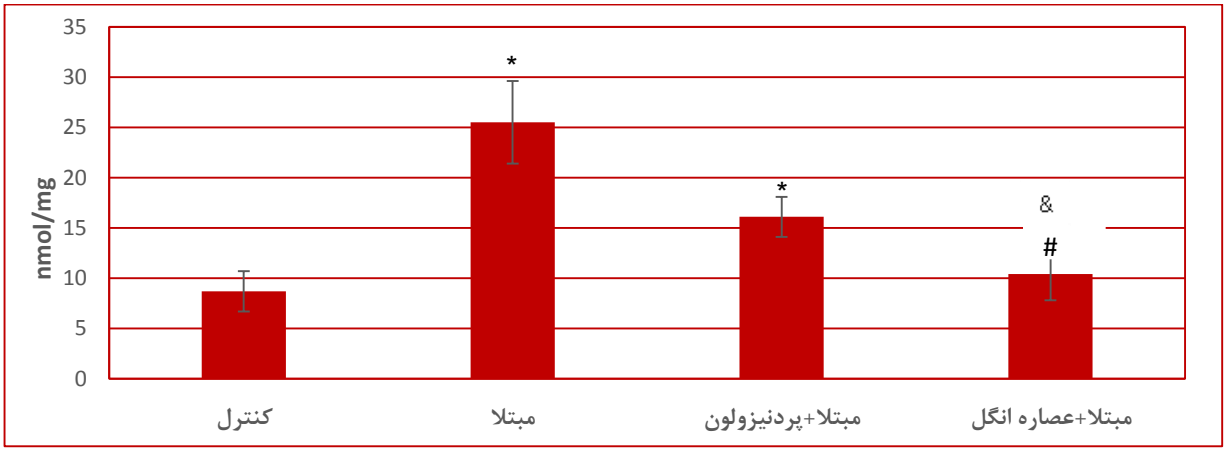
نمودار ۴- مقایسه سطح سایتوکاین‌های سرمی TNF-α(الف) و IL-6.(ب)

* نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه سالم در سطح (P<۰/۰۰۱) است. #نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا در سطح (P<۰/۰۰۱) است.

& نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا و تحت درمان با پردنیزولون در سطح (p<۰/۰۵) است.

TNF-α و IL-6 در گروه‌های درمانی *فاسیولا هپاتیکا* و پریدنیزلون نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری یافته بود. البته میزان کاهش در گروه درمان شده با پریدنیزولون ازنظر آماری بیشتر بود (نمودار ۴).

نتایج مربوط سنجش سطح پراکسیداسیون لیپیدی حاکی از افزایش آن درنتیجه ابتلا به بیماری بود (نمودار ۵). هر دو شیوه درمانی، منجر به کاهش سطح آن در گروه‌های درمانی نسبت به گروه رت‌های بیمار شد (نمودار ۵). البته میزان کاهش در گروه درمان شده با انگل نسبت با گروه تحت درمان با دارو ازنظر آماری بیشتر بود (نمودار ۵). به‌طوری‌که درنهایت سطح پراکسیداسیون لیپیدی بین دو گروه سالم و مبتلا و درمان شده با انگل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۵).



نمودار ۵- مقایسه سطح پراکسیداسیون لپیدی.

* نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه سالم در سطح (P<۰/۰۰۱) است.#نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا در سطح (P<۰/۰۰۱) است.

& نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا و تحت درمان با پردنیزولون در سطح (P<۰/۰۱) است.

بحث

مطالعات گذشته نشان داده است که آنزیم سیستئین پروتئاز موجود در گونه *فاسیولا هپاتیکا* مانع فعالیت رسپتورهای Toll Like می‌شود. فعال شدن این دسته از رسپتورها توسط باکتری‌های روده‌ای عامل اصلی در ایجاد بیماری‌های التهابی روده مانند کولیت اولسراتیو می‌باشند (۲۱). در مدل کولیت اولسراتیو القایی توسط اسید استیک، تخریب حاصل از شرایط اسیدی ایجادشده توسط اسید استیک منجر به شکست سدهای مخاطی شده و به‌این‌ترتیب فلور باکتریایی روده به‌آسانی به لایه‌های زیرین دسترسی یافته و منجر به التهاب می‌شود. در ادامه ترشح نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به بافت مخاط مشخصات مهم کولیت اولسراتیو است (۲۲). نوتروفیل‌های فعال‌شده در بافت مخاطی روده گونه‌های فعال اکسیژن شامل یون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسید و پراکسید هیدروژن تولید و ترشح می‌کنند. این عوامل موجب پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش نفوذپذیری مخاط و رگ‌های خونی، افزایش ورود نوتروفیل‌ها به بافت مخاطی و توسعه التهاب می‌گردند (۱۹، ۲۳). گونه‌های فعال اکسیژن با اثر بر بیان ژن‌های سایتوکاین‌ها و آنزیم‌های درگیر در پاسخ التهابی موجب تخریب دیواره روده، ایجاد زخم، خونریزی و اسهال می‌گردند (۲۴). در شرایط آسیب و آزار بافتی سلول‌های ایمنی ذاتی سطح بالایی از پروتئازها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می‌کنند. این واسطه‌ها نقش مهمی را در حذف عوامل بیماری‌زا بازی می‌کنند (۲۵). بااین‌حال زمانی که میزان تولید این رادیکال‌ها بیش‌ازحد باشد و یا تولید آن‌ها در شرایط نامناسب صورت گیرد، این رادیکال‌های آزاد منجر به ایجاد و گسترش آسیب‌های بافتی خواهند شد. آنزیم میلوپروکسیداز (MPO) یکی از آنزیم‌های پروکسیداز است که در انسان توسط ژن MPO در کروموزوم شماره ۱ کد می‌شود و نقش مهمی در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. MPO در مقادیر بسیاری در نوتروفیل‌ها ذخیره‌شده و با تولید هیپوهالوس اسید فعالیت ضد میکروبی خود را نشان می‌دهد. درواقع MPO یک پروتئین لیزوزومیک است که در گرانول‌های آزورفیلیک یا اولیه ذخیره‌شده و در صورت تحریک نوتروفیل به علت برخورد با آنتی‌ژن یا التهاب از گرانول‌ها تخلیه می‌شود (۲۶، ۲۷)؛ بنابراین

این آنزیم به‌عنوان یکی از شاخص‌های التهاب حاد در نظر گرفته می‌شود زیرا به دنبال وقوع التهاب در بافت، نوتروفیل‌ها اولین سلول‌های ایمنی هستند که به ناحیه ملتهب وارد می‌شوند؛ بنابراین وجود مقادیر فراوانی از MPO در بافت بیانگر ملتهب بودن آن بافت است. ازآنجاکه MPO به دنبال التهاب به ماتریکس محیطی تخلیه می‌گردد، بهترین روش برای بررسی فعالیت آن در بافت ملتهب آن است که کل بافت ملتهب بررسی گردد (۲۸). بر همین اساس سنجش فعالیت آنزیم MPO بافتی در دو گروه درمانی با پردنیزولون و آنتی‌ژن انگلی کمتر از گروه کنترل مثبت بوده است.

در این مطالعه از سنجش لیپید پراکسیداسیون به‌عنوان مقیاسی جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو، استفاده شد. مالون دی آلدئید از پراکسیداسیون لیپیدها تولید می‌شود و میزان تولید آن با شکست و تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع متناسب است. ازاین‌رو اندازه‌گیری MDA اندیکاتور و شاخص مناسبی برای لیپید پراکسیداسیون است (۲۹). نتایج به دست آمدن در این مورد حاکی از قوی‌تر بودن نسبت به دارو بود. اغلب مواد مشتق شده از ترکیبات طبیعی (گیاهان یا جانوران) که قابلیت تنفس هوازی دارند، سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدان می باشد؛ بنابراین نتایج حاصله دور از ذهن نیست.

بر اساس مطالعات قبلی مشخص‌شده است که سطوح TNF-α و IL-6 در بیماری کولیت اولسراتیو افزایش می‌یابد. هر دو سایتوکاین ازجمله مهم‌ترین سایتوکاین‌های التهابی بوده که نقش عمده‌ای در فراخوانی و فعال‌سازی لکوسیت‌ها از قبیل نوتروفیل‌ها بازی می‌کنند (۳۰). بر اساس داده‌های ما بالعکس نتایج مربوط به سطح MDA، سطوح این دو سایتوکاین در گروه درمان شده با پریدنیزولون کاهش بیشتری نسبت به سایر گروه های درمانی نشان داد. با توجه به ماهیت ثابت‌شده ضدالتهابی پردنیزولون این امر دور از ذهن نیست.

در کنار یافته‌های فوق، داده‌های بالینی ازنظر میزان بقاء و شاخص شدت بیماری نیز نشان‌دهنده مؤثر بودن هر دو رهیافت درمانی ما به‌صورت پایاپا و برابر بود. وضعیت مدفوع یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای بررسی شدت و میزان پیشرفت بیماری‌های التهابی روده در بیماران مبتلابه آن است. مدفوع نه تنها ازنظر قوام بلکه ازنظر وجود خون، بقایای سلول‌های اپیتلیال، میزان موکوس و غیره اطلاعات مهمی را در اختیار ما قرار می‌دهد. مطالعات کلینیکال انجام‌گرفته نشان می‌دهد که رت‌های مبتلابه فرم حاد کولیت اولسراتیو نه تنها مدفوع فاقد قوام دارند بلکه مقادیر زیادی خون نیز در مدفوع آن‌ها مشاهده می‌گردد. ازآنجایی‌که به دنبال ایجاد التهاب و تخریب اپیتلیوم کولون، جذب و دفع دچار مشکل می‌گردد، لذا جذب آب به‌درستی صورت نمی‌گیرد و مدفوع آبکی می‌شود (۱۴). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده است که رت‌های گروه کنترل ازنظر قوام شل‌ترین مدفوع را میان سایر گروه‌ها داشته‌اند. همچنین در چندین مورد مدفوع آغشته به خون مشاهده شده است. در دو گروه درمانی اگرچه خون در مدفوع ملاحظه نگردیده است ولی قوام مدفوع آن‌چنان سفت و طبیعی نبوده است که می‌توان آن را به عدم ترمیم کامل مخاط کولون نسبت داد. مطالعات ماکروسکوپیک انجام‌گرفته خود یکی از مهم‌ترین نتایج حاصل از این مطالعه بوده است.

بر اساس برخی ازنظریات موسوم به نظریه بهداشتی، یکی از دلایل افزایش بیماری‌های خودالتهابی و خودایمنی در شرایط کنونی، افزایش بهداشت عمومی و کاهش میزان ابتلا به عفونت‌های انگلی است (۳۱). بر همین اساس تحقیقات گذشته هم به‌خوبی نشان داده‌اند که استفاده از روش‌هایی همانند آلودگی عمدی مبتلایان به انگل‌های کرمی از قبیل *Strongyloides stercoralis* و یا *Trichuris suis* در کاهش شدت علائم بیماری التهابی روده در انسان موفق بوده است (۳۲). البته آلودگی عمدی با برخی از انگل‌های کرمی دیگر گاهاً منجر به نتایج متناقض شده است. به‌طور مثال استفاده از لارو *Necator americanus* در ۷ مورد از ۹ نفر از مبتلایان تحت آزمایش بابیماری التهابی روده منجر به بهبودی شده است، ولی در دو مورد دیگر وضعیت را بدتر کرده است (۳۳). طبیعی است که عفونت عمدی با کرم‌های انگلی علاوه بر خطرات فراوان، مشکل پذیرش توسط خود بیمار را هم خواهد داشت (۳۲). در عوض روش بکار رفته در تحقیق اخیر ما، استفاده از عصاره انگلی بوده است. خوشبختانه نتایج حاکی از اثربخشی در مدل حیوانی بیماری کولیت اولسراتیو است. درهرحال این مطالعه یک مطالعه اولیه بوده و لازم است که در آینده تحقیقات بیشتری صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

در کل با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد که استفاده از پردنیزولون و آنتی‌ژن سوماتیک *فاسیولا هپاتیکا* به یک اندازه

در کاهش علائم کولیت اولسراتیو در مدل تجربی ما مؤثر بوده است. ازآنجایی‌که جداسازی آنتی‌ژن سوماتیک *فاسیولا هپاتیکا* ساده و سریع بوده لذا می‌توان از آن به‌عنوان روشی درمانی برای درمان کولیت اولسراتیو استفاده کرد؛ بنابراین یافته‌های این تحقیق ممکن است که افق جدیدی را در امر درمان بیماری‌های التهابی گشوده باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجو فرشید مشرف زاده به شماره ثبت ۱۵۶۰ و کد اخلاق به شماره"۵۳/پد/ ۳-دد" بوده و تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام‌گرفته است لذا نویسندگان مراتب قدردانی خود را از تمامی افرادی که در پیشبرد این مطالعه ما را یاری کردند اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Acici M, Bolukbas CS. Seroprevalence of Fasciolosis in Equines of the Black Sea Region, Turkey. Journal of Equine Veterinary Science. 2012; 33(1):62-66
2. McCann CM, Baylis M. Seroprevalence and spatial distribution of Fasciola hepatica-infected dairy herds in England and Wales. Veterinary Record. 2010; 15; 166(20):612-7.
3. Sarkari B, Ghobakhloo N. Seroprevalence of human fasciolosis in a new-emerging focus of fasciolosis in yasuj district, southwest of iran. Iranian Journal of Parasitology. 2012; 7(2):15-20.
4. Boray J. Liver fluke disease in sheep and cattle. Prime facts. 2007; 3:1-10.
5. Getachew M, Innocent GT. Epidemiological features of fasciolosis in working donkeys in Ethiopia. Journal of Equine Veterinary Science. 2010; 169(3-4):335-9.
6. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. Science. 2012; 8: 336(6086):1268-73.
7. Jenkins SJ, Allen JE. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010; 14: 26-32.
8. Zhang WY, Moreau E, Hope JC, Howard CJ, Huang WY, Chauvin A. Fasciola hepatica and Fasciola gigantica: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. Experimental Parasitology. 2005; 111: 154-159.
9. Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KH. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. Journal of Immunology. 2009; 183 (3): 1577–1586.
10. Clery DG, Torgerson P, Mulcahy G. Immune responses of chronically infected adult cattle to Fasciola hepatica. Veterinary Parasitology. 1996; 62: 71–82.
11. O'Neill SM, Mills KH, Dalton JP. Fasciola hepatica cathepsin L cysteine protease suppresses Bordetella pertussis specific interferon gamma production in vivo. Parasite Immunology. 2001; 23 (10): 541–547.
12. Nyhlin N, Waskom A, Montgomery SM. Long-term prognosis of clinical symptoms and health-related quality of life in microscopic colitis: a case-control study. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2014; 39: 963 – 72.
13. Abboud R, Pardi DS, Tremaine WJ. Symptomatic overlap between microscopic colitis and irritable bowel syndrome: a prospective study. Inflammatory Bowel Diseases. 2013; 19: 550 – 3.
14. Gisbert J.P, Chaparro M. Use of a third anti-TNF after failure of two previous anti-TNFs in patients with inflammatory bowel disease: Is it worth it? Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2015; 30:1–8.
15. Macaigne G, Lahmek P, Locher C et al. Microscopic colitis or functional bowel disease with diarrhea: a French prospective multicenter study. The American Journal of Gastroenterology. 2014; 109: 1461 – 70.
16. Kane JS, Rotimi O, Everett SM et al. Development and validation of a scoring system to identify patients with microscopic colitis. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2015; 13: 1125 – 31.
17. Kamada N, Seo SU, Chen GY, et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. Nature Reviews Immunology. 2013; 13:321–335.
18. Feng T, Wang L, Schoeb TR, et al. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. The Journal of Experimental Medicine. 2010; 207:1321–1332.
19. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. Cell Host & Microbe. 2014; 15:382–392.

20. Gorgulu S, Yagci G, Kaymakcioglu N, Ozkara M, Kurt B, Ozcan A, et al. Hyperbaric oxygen enhances the efficiency of 5-aminosalicylic acid in acetic acid-induced colitis in rats. Digestive Diseases and Sciences. 2006; 51(3): 480-7.
21. Dowling DJ, Hamilton CM, Donnelly S, La Course J, Brophy PM, Dalton J, et al. Major secretory antigens of the helminth Fasciola hepatica activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. Infection and Immunity. 2010; 78(2):793–801.
22. Sheibani S, Gerson LB.Chemical colitis. Journal of Clinical Gastroenterology. 2008; 42(2):115-21.
23. Chung H, Pamp SJ, Hill JA. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. Cell Press. 2012; 149:1578–1593.
24. Gheibi Sh, Hashemi SR, Karimipour M, Mansouri Motlagh B, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H. Synergistic effects of hydro extract of jujube fruit in combination with Mesalazine (orally) and Asacol (intra-colonic) administration in ameliorating animal model of ulcerative colitis. Journal of coloproctology. 2018; 38(4):275–282.
25. Gentile NM, Khanna S. Th epidemiology of microscopic colitis in Olmsted County from 2002 to 2010: a population-based study. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2014; 12: 838 – 42.
26. Macaigne G, Lahmek P, Locher C. Microscopic colitis or functional bowel disease with diarrhea: a French prospective multicenter study. The American Journal of Gastroenterology. 2014; 109: 1461–70.
27. Larsson JK, Sonestedt E, Ohlsson B. Th e association between the intake of specifi c dietary components and lifestyle factors and microscopic colitis. European Journal of Clinical Nutrition. 2016; 70: 1309 – 17.
28. Fischer H, Holst E, Karlsson F. Altered microbiota in microscopic colitis. Gut. 2015; 64: 1185–6.
29. Sonnenberg A, Genta RM. Inverse association between helicobacter pylori gastritis and microscopic colitis. Inflammatory bowel disease. 2016; 22: 182 – 6.
30. Sikander A, Sinha SK, Prasad KK et al. Association of serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) with microscopic colitis and ulcerative colitis. Digestive Diseases and Sciences. 2015; 60: 887 – 94.
31. Katsanos KH, Papadakis KA.Inflammatory Bowel Disease: Updates on Molecular Targets for Biologics. Gut and Liver. 2017; 11(4):455-463.
32. Briggs, Weatherhead J, Sastry KJ, Hotez PJ.The Hygiene Hypothesis and Its Inconvenient Truths about Helminth Infections. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016; 15; 274-311.
33. Sipahi AM, Baptista DM.Helminths as an alternative therapy for intestinal diseases. World Journal of Gastroenterology. 2017; 23(33):6009-6015.
34. Croese J, O'neil J, Masson J, Cooke S, Melrose W, Pritchard D, Speare R. A proof of concept study establishing Necator americanus in Crohn's patients and reservoir donors. Gut. 2006; 55:136–137.

Oiginal Article

The Effects of *Fasciola Hepatica* on Acetic acid Induced Ulcerative Colitis in Rat Model

Esmaeilnejad B [1]*, Abtahi Froushani SM[2], Tehrani AA[1], Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H[3], Moshrefzadeh F[1]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

Received: 07 Feb 2018 Accepted: 06 Aug 2018

Abstract

Background & Objective: Ulcerative colitis is one of the common causes of gastrointestinal tract diseases in developing countries. This disease causes disability, especially in young adults, and imposes many social and economic burdens on the community. The aim of this study was to investigate the effects of *Fasciola hepatica* extract on acetic acid induced ulcerative colitis in rat model.

Materials & Methods: Thirty adult male Wistar rats were divided into 3 equal groups. Colitis was induced by the administration of 4% acetic acid. Control group just was administrated phosphate-bufferedsaline (S.C.) and the other groups were received Prednisolone (0.5 mg/kg) and *Fasciola hepatica* extract (100 mg/kg) for 10 consecutive days.Since then, the animals were euthanized and intestinal tissue and blood samples were taken. Macroscopic and microscopic features, inflammatory mediators as well as cytokines, TNF-α and IL-6 were assessed.

Results: The amount of the myeloperoxidase production was the same between the two treatment groups. As compared to the control, both of the treatment groups produced lower amount of TNF-α and IL-6, however this reduction was more pronounced in Prednisolone-induced animals than those of extract-induced. There were no significant differences between Prednisolone and *Fasciola* extract regarding gross damages and histopathological features.

Conclusion: since the preparation of *Fasciola* extract is easy and simple, it may be used as ameliorative agent for ulcerative colitis.

Keywords: Ulcerative colitis, Acetic acid, Rat, *Fasciola hepatica, inflammation*

***Corresponding Author: : Esmaeilnejad Bizhan,** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: b.esmaeilnejad@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-1781-5890

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 1136-1145