مریم توکلی، دکتر لیلا مدیری، دکتر طاهره ناجی
دانشکده علوم پایه،میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

بررسی وضعیت کبد بعد از هپاتیت و ارتباط آن با میزان آفلاتوکسین توتالB در استان گیلان

هپاتیت، التهاب کبد است که باعث درد و تورم می شود. کبد، ضایعات موجود در خون را متلاشی می کند. زمانی که کبد ملتهب می شود، وظیفه خود را در پاکسازی خون به خوبی انجام نمی دهد. جوامع متمدن اولیه در نواحی اطراف بین النهرین، کبد را به عنوان قلب حیات می دانستند، به خاطر اینکه به نظر می رسید کبد مرکز تجمع خون در بدن است.

عوامل ایجاد کننده هپاتیت گوناگون هستند. هپاتیت بیشتربا یکی از پنج ویروس هپاتیتی ایجاد می شود [۱]. کارسینوم سلول کبدی (HCC) ، یکی از شایع ترین بدخیمی ها در سراسر جهان است. آمار سالانه این سرطان حدود یک میلیون مورد در سراسر جهان است. مردان چهار برابر زنان مبتلا می شوند. چنین به نظر می رسد که قوی ترین سرطان زاها، محصولات طبیعی گیاهان، قارچ ها و باکتری ها است ز . آفلاتوکسین ها گروهی از توکسین های قارچی قوی هستند که باعث تاثیرات مخرب در سیستم های بیولوژیکی می شوند. این متابولیت ها در پاره ای از پستانداران، پرندگان و ماهی ها ایجاد سرطان، جهش و ناهنجاری جنینی می کنند. تا کنون ۱۸ نوع آفلاتوکسین مورد شناسایی قرار گرفته اند که از این میان ٦ گروه آن حائز اهمیتند. بر اساس این مطالعات در طبیعت چهار نوع آفلاتوکسین اصلی شامل B_1، B_2، G_1 و G_2 و دو نوع محصولات متابولیکی به نام های M_1 و M_2 وجود دارند. LARC آفلاتوکسین ها به عنوان کارسینوژن گروه A انسانی طبقه بندی کرده است. این توکسین ها از راه خوردن یا استنشاق وارد بدن و با عبور از روده کوچک، جذب خون می شود و دربافت های مختلف بدن انباشته می شود. دراین میان بیش از همه در کبد تغلیظ می شوند، به گونه ای که غلظت این سم در کبد می تواند، ۱۰ برابر میزان آن درعضلات باشد. درسرطان زایی نیز بیشترین خطرآفلاتوکسین، متوجه سلول‌های کبدی است [٦].

آفلاتوکسین ها

آفلاتوکسین ها مهم ترین مایکوتوکسین های تولید شده توسط آسپرژیلوس ها هستند. این گروه از سموم قارچی سردسته تمامی مایکوتوکسین ها هستند. به همین دلیل، بیش از سایر مایکوتوکسین ها، مورد توجه قرار گرفته اند. آفلاتوکسین ها با توجه به دلایلی همانند پیشینه ی دراز، به کارگیری گسترده در پژوهش های فراوان و در دسترس بودن در طبیعت، به عنوان مشهورترین مایکوتوکسین شناخته شده معرفی شده اند. در کلمه آفلاتوکسین حروف A و F به ترتیب نماینده جنس قارچ یا آسپرژیلوس و گونه آن یا فلاووس است که با لغت توکسین ترکیب شده است. گونه های فلاووس و پارازیتیکوس قادر به تولید انواع آفلاتوکسین های طبیعی همراه با ترکیبات وابسته است.

شایسته ی یادآوری است که همه ی سویه های این دو گونه، توان تولید آفلاتوکسین را ندارد. در این باره، سویه هایی که توانایی تولید آفلاتوکسین را دارند، سویه های سمی و آنهایی که مولد آفلاتوکسین نیستند سویه های غیر سمی نامیده می شوند [۱۰،۶]. آفلاتوکسین های گروه B و G با ایزوله های سمی آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می شود، در حالی که اکثر ایزوله های آسپرژیلوس فلاووس صرفا قادر به تولید آفلاتوکسین های گروه B هستند. به این ترتیب زمانی که تنها آفلاتوکسین های گروه B حضور داشته باشند، می توان آلودگی را به آسپرژیلوس فلاووس نسبت داد و زمانی که آفلاتوکسین گروه B و G حضور داشته باشند، آسپرژیلوس پارازیتیکوس به تنهایی و یا همراه با آسپرژیلوس فلاووس عامل آلودگی است. آفلاتوکسین های B_2 وG_2 معمولا همراه با آفلاتوکسین هایB_1 و G_1 حضور دارند و همواره میزان آنها کمتر است. آفلاتوکسین های M_1 و M_2 نیز، متابولیک اکسیداتیو تولیدات آفلاتوکسین های B_1 و B_2 هستند که توسط حیوانات تحت عمل گوارش تولید شده و در نتیجه در شیر(هم انسان و هم حیوان)، ادرار و مدفوع مشاهده می شود[۲،۳]. علاوه بر انتقال از طریق شیر، باقی مانده های آفلاتوکسین ها ممکن است در بافت های حیواناتی که غذای آلوده شده مصرف کرده اند وجود داشته باشد. باقیمانده های آفلاتوکسین در بافت های حیوانات، تخم مرغ ها و ماکیان در پی هضم غذای آلوده شده آفلاتوکسین به طور آزمایشی پیدا شده است. آلودگی شیر ، تخم مرغ و گوشت می تواند پیامد خوردن علوفه آلوده شده به مایکوتوکسین باشد [٦].

ارزیابی کارکرد کبد در بیماران کبدی

در بیشتر نمونه ها، با شرح حال دقیق، معاینه ی فیزیکی و چندآزمایش می توان به تشخیص بیماری کبدی دست یافت. در برخی نمونه ها، بررسی پرتونگاری کمک کننده بوده و به راستی ارزش تشخیصی دارند. بیوپسی کبد، به عنوان معیار استاندارد در ارزیابی بیماری کبد مطرح می شود، اما امروزه بیشتر با هدف تعیین مرحله ی بیماری و درجه ی تمایز بافتی به کار می رود تا برای تشخیص.

برخی از آزمون های خونی که برای ارزیابی نخستین بیماری کبدی بکار می رود، شامل: اندازه گیری آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز (ALT وAST)، آلکالن فسفاتاز (ALKP) سرم است. این الگوی بررسی، بیشتر به تشخیص بیماری سلول های کبدی را از بیماری کلستاتیک و حاد یا مزمن بودن بیماری و وجود سیروز و نارسایی کبدی می پردازد[۱]. چندین آزمون بیوشیمی نیز برای ارزیابی و برنامه ریزی درمانی بیماران دچار آسیب کارکرد کبد مفید هستند. از این آزمون ها به منظور شناسایی بیماری کبدی، تمایز بین انواع مختلف نارسایی های کبدی، تخمین وسعت آسیب کبدی شناخته شده و پیگیری پاسخ به درمان استفاده می شود. آزمون های کبدی دارای نقاط ضعفی هستند. نتایج این آزمون ها گاهی در افراد مبتلا به بیماری شدید کبدی، می تواند طبیعی، و در بیماران مبتلا به بیماری های غیر کبدی، ممکن است غیر طبیعی باشند. آزمون های کبدی به ندرت یک تشخیص خاص را مطرح می کنند و اغلب یک گروه کلی از بیماری کبدی را نشان می دهند و مسیر ارزیابی بیماری را هدایت می کنند. چندین هزار کارکرد بیوشیمیایی توسط کبد انجام می شود که اکثر این کارکردها را نمی توان به راحتی توسط آزمون های خونی ارزیابی کرد. برای افزایش حساسیت و ویژگی آزمون های آزمایشگاهی در تشخیص بیماری کبد، بهتر است از مجموعه ای از آنها استفاده شود[۱۱،۹،٤].

جمع آوری نمونه

برای انجام آزمایش های وابسته، نیاز به نمونه های سرم هپاتیت مثبت داشتیم. به این منظور، نمونه ها در بازه ی زمانی اسفند ماه ۹۲ تا اردیبهشت ماه۹۳، از بیمارستان های شهرستان رشت جمع آوری شد. تعداد این نمونه ها، ۲۵ عدد (شامل HCV Ab و HBsAg) بود. علاوه بر نمونه های سرم، نتایج آزمایش CBC تعدادی از این افراد، به منظور بررسی وضعیت احتمالی کبد افراد با استفاده از برخی فاکتورهای موثر نیز ، دریافت شد. پس از دریافت نمونه های سرم، این نمونه ها به منظور بررسی وجود یا عدم وجود آفلاتوکسین B و تعیین میزان دز آن در نمونه های حاوی آفلاتوکسین B ، از طریق تست الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند.

مراحل انجام تست الایزا

با استفاده از میکروپیپت، ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر را در چاهک اول و ۵۰ میکرولیتر محلول های استاندارد آماده را به ترتیب در چاهک های دوم تا هفتم، به ترتیب غلیظ به رقیق ریختیم. سپس با استفاده از میکروپیپت، ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم هپاتیت را به داخل هر کدام از چاهک های نمونه، ریختیم. در مرحله ی بعد، ۵۰ میکرولیتر آنزیم کونژوگه را به هر یک از چاهک ها، به جز چاهک اول (بلانک) ریختیم. سپس ، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد آفلاتوکسین را به هر چاهک، به جز چاهک اول اضافه کردیم. پلیت مورد نظر را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتی گراد)، به دور از نور مستقیم قرار دادیم. بعد از اتمام زمان مورد نظر، بافر شستشوی از قبل رقیق شده (به نسبت ۱:۱۰ با استفاده از آب مقطر رقیق کردیم) را با استفاده از دستگاه شستشو به داخل تمامی چاهک ها ریختیم. بعد از شستشو ، با استفاده از میکروپیپت ، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کروموژن را به هر یک از چاهک ها اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، به دور از نور مستقیم قرار دادیم. بر اثر اضافه کردن کروموژن و ایجاد واکنش آنزیمی، رنگ آبی ایجاد شد. شدت رنگ ایجاد شده با مقدار آفلاتوکسین موجود در نمونه ها ارتباط مستقیم دارد. در مرحله ی آخر، ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده را به هر کدام از چاهک ها اضافه کردیم. پس از افزودن این محلول، تغییر رنگ ایجاد شد و رنگ آبی به رنگ زرد تغییر کرد. در نهایت پلیت مورد نظر را در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ٤۵۰ نانومتر قرار دادیم. این دستگاه بر اساس میزان جذب ، مقادیر جذب شده آفلاتوکسین توتال و منحنی لگاریتمی مرتبط با آن را محاسبه کرد. درنهایت به منظور اطلاع از وضعیت احتمالی بافت کبد بیماران از طریق مقادیر به دست آمده از تست الایزا و نتایج آزمایشات خون بیماران مربوطه، به بررسی ارتباط بین نتایج پرداختیم.

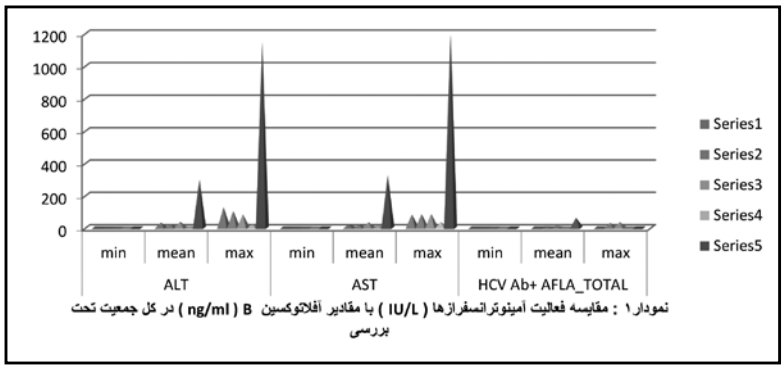
آنالیز آماری

نتایجCUT-OFF بیماران و نتایج حاصله از تست الایزا مورد آنالیز آماری قرار گرفتند و به بررسی وجود ارتباط احتمالی بینشان از طریق نرم افزار SPSS و محاسبات آماری پرداختیم. نتایج حاصل از آنالیز آماری ، ارتباط معنادار گروهی از این عوامل را نشان داد که در ادامه به بررسی این روابط می پردازیم.

نتایج

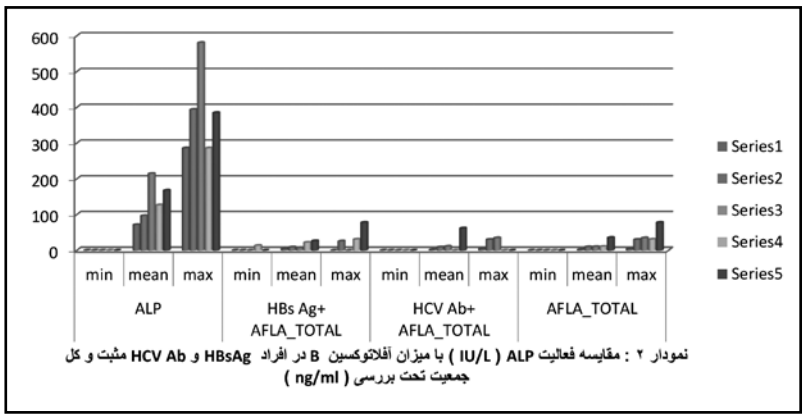
نتایج حاصله از تست الایزا مشخص نمود که ۱۵ عدد از

۲۵ نمونه سرم هپاتیت مثبت (B وC)، حاوی آفلاتوکسین توتال B بودند. بعد از انجام محاسبات آماری مقادیر به دست آمده از تست الایزا و مقادیر گروهی از مارکرهای خونی (ALT ، AST، ALP) بیماران تحت بررسی، به مقایسه ی فاکتورهای دخیل پرداختیم. گروهی از این فاکتورها، از لحاظ آماری با یکدیگر ارتباطی معنادار داشتند که این روابط معنادار به صورت نمودار، در زیر نشان داده شده اند.



نمودار ۱ : مقایسه فعالیت آمینوترانسفرازها (IU/L) با مقادیر آفلاتوکسین B (ng/ml) در کل جمعیت تحت بررسی

در کل جمعیت تحت بررسی، مقدار ALT و AST با اندازه ی آفلاتوکسین توتال B سرمی همبستگی معنادار دارد (Z= ۲.۰۳۲) (Sig= ۰.۰٤٤) .



نمودار ۲ : مقایسه فعالیت ALP (IU/L) با میزان آفلاتوکسین B در افراد HBsAg و HCV Ab مثبت و کل جمعیت تحت بررسی (ng/ml)

مقدار عددی ALP سرمی همواره با مقادیر سم آفلاتوکسین توتال B در افراد دچار هپاتیت ویروسی از نوع B و C و همچنین با میانگین سم آفلاتوکسین توتال B سرمی همبستگی آماری معنادار داشته است (Z= ۲.۰۲۳) (Sig= ۰.۰٤۳).(شکل۳)

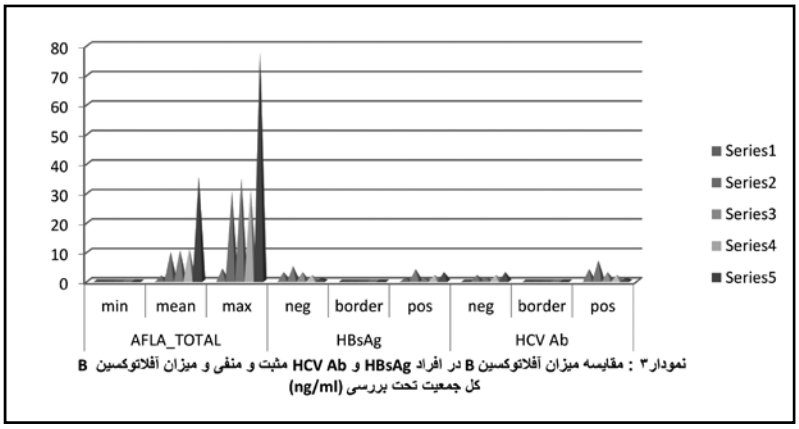
در افرادی که HCV Ab مثبت بوده اند در مقایسه با مقدار سم آفلاتوکسین سرمی اندازه گیری شده در افرادی که HBsAg بوده اند، اختلاف عددی و همبستگی آمار معنادار وجود دارد (Z= ۲.۰۲۳) (Sig= ۰.۰٤۳). این ویژگی در همبستگی آماری میزان میانگین آفلاتوکسین توتال B سرمی جمعیت مورد مطالعه نیز می تواند مورد توجه باشد ، اما نیاز به بررسی جدی تری دارد (Z= ۱.۷۵۳) (Sig= ۰.۰۸۰). بایستی به خاطر داشت که این ویژگی همواره در افراد HBsAg مثبت، معنادار بوده است (Z= ۲.۰۲۳) (Sig= ۰.۰٤۳).

بحث

اندازه گیری سطح آمینوترانسفرازهای سرم، به خصوص میزان ALT به عنوان روشی آسان و غیر تهاجمی برای پیگیری فعالیت بیماری کبدی به کار می رود، اما به نظر می رسداین آنزیم ها همیشه برای تعیین شدت بیماری یا پیش آگهی از آن قابل اعتماد نیستند. به طور کلی آنزیم های ارزیابی کبدی به دو دسته تقسیم می شوند. آنزیم های دسته ی اول، آنزیم های نشتی کبدی است که جایگاهشان در داخل سیتوپلاسم یا داخل ارگانل های سلول است که مهمترین آن، میتوکندری است. با آسیب سلول های کبدی و افزایش نفوذ پذیری غشا، خروج این آنزیم ها به محیط خارج سلول و در نهایت جریان خون افزایش می یابد. زمانی که با افزایش فعالیت آنزیم های نشتی روبرو شویم، می توانیم آن را به آسیب سلول های کبدی ربط دهیم [۱].

مهم ترین آنزیم نشتی سلول های کبدی آلانین آمینو ترانسفراز(ALT) است که عمده ترین منشا آن، سلول های کبدی است. این آنزیم علاوه بر سلول های کبدی، در سیتوپلاسم سلول های عضلات اسکلتی و سلول های عضله ی قلب هم وجود دارد. دیگر آنزیم نشتی سلول های کبدی، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) است. این آنزیم شباهت های بسیاری به آنزیم ALT دارد، به گونه ای که بسیاری از مطالب گفته شده در ارتباط با آنزیم ALT ، برای این آنزیم نیز صدق می کند. اما تفاوت اساسی این دو که سبب اختصاصی تر شدن ALT می شود، تنوع بافتی گسترده ی آنزیم AST است. این آنزیم علاوه بر سلول های کبدی در سلول های عضلات اسکلتی، سلول های قلبی، سلول های ریه، سلول های اعصاب مرکزی و ... وجود دارد. در نتیجه نمی تواند شاخص اختصاصی خوبی برای ارزیابی کارکرد سلول های کبدی باشد. این آنزیم دارای دو ایزو آنزیم، یکی سیتوپلاسمی و دیگری میتوکندریایی است. اگر آسیب سلول های کبدی خفیف باشد، اولین ایزوآنزیم نشتی، ایزوآنزیم سیتوپلاسمی است و در صورت شدیدتر بودن این آسیب، ایزوآنزیم میتوکندریایی نیز وارد جریان خون می شود [۵،۷].

دومین دسته از آنزیم های کبدی ، تحت عنوان آنزیم های القایی یا آنزیم های کلستاتیک است. زمانیکه در جریان صفرا، اختلال ایجاد می شود، صفرا به سمت کبد پس می زند و بر اثر برخورد آن به سلول های کبدی، غشای سلولی آسیب می بیند.



(شکل۳)

در ادامه ی این آسیب، پروتئین های متصل کننده ی آنزیم های القایی تخریب شده و آنزیم ها آزاد گشته و وارد جریان خون می شوند. در مراحل ابتدایی که با آسیب سلول های کبدی مواجه می شویم، آنزیم های نشتی در جریان خون افزایش می یابند و در امتداد این آسیب، با ایجاد اختلال جریان صفراوی، میزان فعالیت آنزیم های القایی نیز افزایش پیدا خواهد کرد. برعکس این حالت نیز اتفاق می افتد که در ابتدا بر اثر ایجاد کلستاز، آنزیم های القایی افزایش می یابند و در ادامه بر اثر آسیب سلولی ناشی از کلستاز [۱]. یکی از آنزیم های القایی مهم در ارزیابی غیر اختصاصی کارکرد کبدی، آلکالین فسفاتاز (ALP) است. این آنزیم دارای حساسیت نسبتا بالایی است و در مراحل ابتدایی کلستاز افزایش می یابد. اما تنوع بافتی این آنزیم بالاست [۱۰]. مقادیر ALT و AST و ALP در افرادی که دچار عفونت ویروسی B و C بوده اند، از لحاظ آماری معنادار بود (Sig= ۰.۰۴۳)، زیرا عفونت ویروسی هپاتیت B و C به دلیل ایجاد آسیب های سلولی و افزایش نفوذپذیری غشای سلول های کبدی سبب تغییر و افزایش فعالیت این آنزیم ها می شود. بایستی توجه کرد که مقدار ALT و AST و همچنین ALP نبایستی به عنوان تنها معیار قابل توجه در اثبات احتمال جدی عفونت ویروسی کبدی مدنظر قرار داد. ارتباط همبستگی مقدار آفلاتوکسین توتال B در افراد عفونی با HBsAg و HCV Ab به صورت معنادار(Sig= ۰.۰۴۵) بود، که این امر می تواند نشان دهنده ی رابطه ی هم افزایی آفلاتوکسین با هپاتیت B و C باشد. از طرفی می توانیم این موضوع را عنوان کنیم که مابین مقادیر آفلاتوکسین توتال B در افراد عفونی هپاتیت B و C با افراد غیر عفونی، اختلاف معنادار وجود دارد. در حالیکه این همبستگی در جمعیت تحت بررسی، نشان دهنده ی رابطه ی جدی حضور سم آفلاتوکسین B در یک محدوده ی میانگین سرمی نبوده و از فردی به فرد دیگر متغیراست. با توجه به اینکه مقدار عددی ALP سرمی همواره با مقادیر سم آفلاتوکسین توتال B در افراد دچار هپاتیت ویروسی از نوع B و C و همچنین با میانگین سم آفلاتوکسین توتال B سرمی همبستگی آماری معنادار داشته است، به موجب این اختلال ALP متصل به غشای سلول های کبدی آزاد گشته و مقدار فعالیتش در جریان خون افزایش می یابد. بنابراین ALP به عنوان یک شاخصه ی غیر اختصاصی قابل اعتماد، هم در تعیین عفونت کبدی و هم در تعیین مسمومیت کبدی ناشی از سم می تواند به کار گرفته شود (Sig= ۰.۰۴۳). در بررسی همبستگی مابین مقادیر آفلاتوکسین توتال B در افراد HBsAg مثبت با مقدار آن در جمعیت مورد بررسی و همچنین همبستگی مابین مقدار آفلاتوکسین توتال B در افراد HCV Ab منفی با مقدار آن در افراد HBsAg مثبت و جمعیت مورد بررسی، ارتباط معناداری مشاهده شد (Sig= ۰.۰۴۳). که این روابط نیز می توانند گواه تاثیر آفلاتوکسین توتال B بر هپاتیت B باشند و می تواند به اثر هم افزایی آفلاتوکسین B و هپاتیت B اشاره داشته باشد.

منابع:

۱. لونگو ، فوسی ، کاسپر ، هوسر ، جمیسون ، لوسکالزو. محمدی. م . قربانی. م. اصول طب داخلی هاریسون (بیماری های کبد و مجاری صفراوی). انتشارات ارجمند. تهران.۲۰۱۲. صفحه. ۲۰۰-۹۶.

۲. جاوتز. ضیغمی. ح . آل بویه. م . حقی . ف . میکروب شناسی پزشکی جاوتز (ویروس شناسی ، قارچ شناسی ، انگل شناسی) . انتشارات اندیشه رفیع. تهران. ۲۰۱۰. صفحه ۶۱۰-۵۸۲.

۳. توکلی. ح. قائم مقامی. ز. امامی. م. اختلال آنزیم های کبد در کارگران پالایشگاه قطران اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان. ۱۳۹۰. شماره ۱۳۹.

٤. محمودی. ف . فرخی. م. دلاوریان. ل. بررسی رابطه بین HBV–DNA و HBeAg و آنزیم های کبدی در نزد بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۱۳۹۱. دوره ۲۲ ، شماره ۹۵.

۵. هروی. م. اکبری. ح. میزان تداوم HBsAg و تغییرات آنزیم های کبدی در ناقلین مزمن هپاتیت B. مجله تحقیقات علوم پزشکی زاهدان. ۱۳۸۹ . دوره ۱۳ ، شماره ۳.

6. Lereau, M, Gouas, D, et al. Interactions between hepatitis B virus and aflatoxin B1. Journal of General Virology. 2012: 93,640-650.

7. Khoshpey, B, Farhud, DD, Zaini, F. Aflatoxins in Iran: Nature, Hazards and Carcinogenicity.Vol. (2011) 1-30.

8. Hajiani, E, Alavi, M. A review on epidemiology, diagnosis and treatment of hepatitis D virus Infection. Jundishapur Journal of Microbiology. (2010) s1-s8.

9. C.Kew,M. Aflatoxins as a cause of Hepatocellular Carcinoma. J Gastrointestin Liver Dis. (2013) 3:305-310.

.01 Manal A Hamed, Sanaa A Ali. Non-viral factores contributing to hepatocellular carcinoma, Worl journal of hepatology, (2013) 5(6):311-322.

.11 Rasooly R, Hernlem B , et al. Non linear relationships between aflatoxin B1 levels and the biological response of monkey kidney vero cells. J toxins,(2013) 10.3390.