

## میزان کلینیزاسیون لیستریا منو سیتوژن در موش نژاد *Balb/c* هاپلوئید *H-i* و اثر آن بر سقط جنین و بافت رحم و پلاستای آلوده

پرویندخت بیات<sup>۱</sup>، عنایت .. کلانتر هرمزی<sup>۱\*</sup>

۱. دکتری تخصصی علوم تشریحی -استاد یار دانشگاه پزشکی اراک  
۲. دکتری تخصصی میکروبیولوژی -استاد یار دانشگاه پزشکی اراک

\* نشانی برای مکاتبه: اراک سردشت مجتمع دانشگاهی علوم پزشکی گروه میکروبیولوژی - ۰۸۶۱۴۱۷۳۵۰۲ - e\_hormozi@yahoo.com  
دریافت مقاله: آبان هشتاد و شش پذیرش برای چاپ: دی هشتاد و شش

### چکیده

**سابقه و هدف:** لیستریومونوسایتوژنز باسیلی داخل سلولی و فاقد اسپور است و از طریقی سبزیجات و لبنیات آلوده به انسان منتقل میشود. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است این باکتری عامل سقط جنین و نا هنجاریهای جنینی در انسان است در آزمایشات تجربی بیشتر به بررسی ایمونولوژیک لیستریوز در دوران بارداری پرداخته اند بنظر میرسد که نیاز به مطالعه از دیدگاه باکتریولوژی و جنین شناسی لیستریوز در دوران بارداری وجود دارد برای رسیدن به نتایج تجربی جهت اثبات نظرات اپیدمیولوژی موش از *Balb/c* هاپلوئید *H-i* که نسبت به لیستریومونوژنز حساس است استفاده شد تا اثرات این باکتری در ایجاد سقط و تغییرات بافت رحم و پلاستای ونحوه آلودگی جنین مطالعه گردد.

**روش کار:** به موشهای باردار در دو گروه شاهد و تجربی که در شرایط یکسان آزمایشگاهی قرار داشتند بترتیب  $200 \mu L$  سرم نرمال سالین و  $5/4 \text{ LogFCU}/\text{Im}$  لیستریا منو سیتوژنز بصورت داخل صفاقی تزریق شد. در روزهای مختلف بارداری از هرگروه بصورت تصادفی تعدادی انتخاب و نخاعی شدند سپس رحم جدا شده تعداد و محل جفت شمارش گردید و با تعداد جنینهای موجود در رحم مقایسه شد تا تعداد سقط مشخص گردد تعداد ۳۵ سر از مادران باردار در روز ۲۴ بارداری سزارین شده و پس از خارج نمودن جنینها رحم و پلاستای در فرمالین جهت تهیه لام آماده شد و نوزادان موش هایی که به مرحله فول ترم رسیده بودند خارج و رحم و پلاستای برای مطالعه میکروسکوپی آماده شد.

**یافته ها:** با استفاده از دوز غیر کشنده سوسپانسیون استرینهای لیستریا منوسیتوژنز  $4b$  نشان داده شد که در روزهای مختلف حاملگی میزان سقط متفاوت است و با گروه کنترل اختلاف معناداری دارد ( $P < 0.01$ ). در مقاطع بافتی رحم مادر آلوده تغییرات بافتی در اپیتلیوم بصورت اتروفنی یا تبدیل سلولهای منشوری به مکعبی و اتروفنی غدد اندومتر و پر خونی و هیپرتروفی دیده شد. باکتری ابتدا سلولهای پوشاننده کانال شریان مرکزی که منشاء تروفوبلاست جنینی دارند آلوده میکند و سپس سلولهای سینسیو تروفوبلاست پوشاننده هسته ویلوس در منطقه لایبرینتین پلاستای بوسیله لیستریومونوسیتوز آلوده میشوند.

**نتیجه گیری:** با توجه به ثابت شدن اثر لیستریا منوسایتوژنز بر سقط جنین نقش فاکتورهای که در سقط جنین در ارتباط با عفونت لیستریومونوسایتوژنز میباشدند از قبیل بافتهای جنینی و تداخل عمل پاسخهای ایمنی بین بافتهای مختلف جنینی در دوران بارداری مطالعه گردد.

**واژگان کلیدی:** لیستریومونوسایتوژنز، سقط جنین، بافت رحم، فول ترم، کلینیزاسیون

### مقدمه

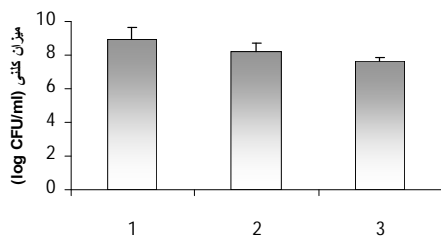
که این باکتری یکی از عوامل باکتریایی، سپتی سمی مننگوآنسفالوسیت، اسپیلنو مگالی و هپاتومگالی بویژه در دوران بارداری است که منجر به سقط یا مرگ جنین یا تولد زودرس جنین و تخریب بافتی در ارگانها و مرگ نوزاد پس از تولد میشود (۲)

لیستریا منوسایتوژنز باسیلی کوتاه، گرم مثبت، انگل اختیاری داخل سلولی و فاقد اسپور است که از طریق سبزیجات آلوده، شیر، پنیر و گوشت آلوده به انسان یا دام منتقل میشود (۱). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است

۱۰٪ قرارداد شده و همینطور ۳۵ سرمدار که نوزادان آنها به مرحله فول ترم رسیده بودند و بطور طبیعی زایمان انجام میگرفت رحم و پلاستا بطور کامل خارج شده و در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. با روش روتین آزمایشگاه بافت پاساژ داده شد و مقاطع ۵ mm برش داده شد و با روش هماتوکسیلین - انوزین یا گرم- ویگرت رنگ آمیزی شدند.

### یافته ها

نتایج بدست آمده از تزریق داخل صفاقی  $200 \mu\text{L}$   $5/4 \text{LogFCU/lm}$  از غلظت سوسپانسیون میکروبی لیستریا منو سیتوژنز استرین b4k در مطالعه قبلی این گروه مشخص شد که غیرکشنده است، به موشهای ماده بار دار در طول یک ماه از زمان تزریق نشان داد که کلینیزاسیون لیستریا منو سیتوژنز در ،خون ،پلاستا و رحم موشهای مادرباردار دیده شد و کلونی کانت آن در اعضا فوق در ۷۲ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی در مادر ، نشان داده شده است (نمودار ۱) و مشخص میکند که در مادر بیشترین میزان کلونی کانت در خون و کمترین میزان در رحم است. نتایج این مطالعه در مورد درصد سقط جنین در روزهای مختلف بارداری و مقایسه آن با شرایط نرمال در جدول ۱ آورده شده است و نشان میدهد بیشترین میزان سقط در روز های ۱۱-۱۵ بارداری است و کمترین آن مربوط به روزهای ۰-۵ میباشد. درمقایسه همه گروه های مورد با گروه شاهد اختلاف آماری معناداری در مورد سقط دیده میشود ( $P < 0.001$ ).



نمودار میزان کلنی زاسیون لیستریا منوسیتوژنز در خون (۱)، پلاستا (۲) و رحم (۳)

جدول ۱. مقایسه میزان سقط جنین در فواصل زمانی مختلف دوران بارداری ناشی از تزریق داخل صفاقی سوسپانسیون های میکروبی حاوی  $5/4 \text{LogFCU/lm}$  از استرین لیستریا منوسیتوژنز ۴b به موشهای ماده باردار نژاد  $Balb/c$  در روز صفر بارداری با گروه کنترل

فاصله زمانی (بارداری روز)	۵-۰	۱۰-۶	۱۵-۱۱	۲۰-۱۶	۲۵-۲۱	۳۰-۲۶
سقط جنین گروه مورد (Mean±SEM)	۶/۴۴±۰/۳۳	۱۶/۳۹±۰/۱۹	۹/۲۱۴±۲/۶۲	۲۵/۸۸±۱/۲۹	۱۱/۴۶±۰/۵۳	۹/۶۱±۰/۸۱
سقط جنین گروه کنترل (Mean±SEM)	۰/۲۸±۱/۲۴	۰/۱۶±۰/۴۶	۰/۱۱±۰/۳۹	۰/۰۶±۰/۲۵	۰/۰۴±۰/۱۶	۰/۰۲±۰/۱۱
Pvalue	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱

و بدلیل اینکه امکان تحقیق تجربی برای ارزیابی فاکتورهای موثر در ایجاد ناهنجاری های جنینی پس از آلودگی توسط لیستریا منوسیتوژنز در انسان بدلیل ملاحظات اخلاقی وجود ندارد لذا ضرورت یافته تا اثرات ناشی از آلودگی در طول بارداری بر روی جنین در یک مدل حیوانی که از جهت بارداری مشابه انسان میباشد، مورد تحقیق قرار گیرد. در آزمایشات تجربی اخیر بیشتر به بررسی جنبه های ایمنولوژیک لیستریوز در دوران بارداری پرداخته و به نتایجی نیز دست یافته اند که لازم است با دیدگاه باکتریولوژی و هیستولوژی لیستریوز در دوران بارداری مورد مقایسه و تحلیل قرار گیرند تا از نتایج به تحلیل های جدید دست یابند. نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که عفونت لیستریوز در افرادی که سیستم ایمنی ضعیف دارند و در زنان بارداری که سیستم ایمنی سلولی و هورمال آنها به جهت حفظ جنین تضعیف شده است ، دیده میشود (۳) همینطور در آزمایشاتی که بر روی موش در دوران بارداری انجام گرفته ، نشان داده شده است که موشهای باردار و جنین آنها نسبت به باکتری حساسیت بیشتری داشته و باکتری در آنها بیماری های حادتری ایجاد میکند (۴) و همچنین نشان داده شده است که پلاستا نقش بسیار مهمی در پاتوژنز عفونت های دوران بارداری دارد و مانع مهمی بر علیه عفونت میباشد (۵). اما پلاستاهای جنین موشهای مبتلا به لیستریوز در اکثریت موارد با کلینیزاسیون باکتری همراه نبوده است زیرا پلاستا ها نسبت به کلینیزاسیون و پرولیفراسیون بطور مستقل عمل مینمایند و در پلاستای عفونی شده محلهای خونریزی و هموراژیک دیده میشود (۵) که صدمه به پلاستا منجر به توقف رشد داخل رحمی و مرگ جنین میگردد و همچنین ممکن است منجر به تخریب دیواره رحم شود. گرچه در مورد مکانیزمهای عفونی شدن پلاستا اطلاعات بسیار کم است و پاتوفیزیولوژی رحم کاملا مشخص نیست ، احتمالا ضایعات رحمی ممکن است مرحله پایانی ناهنجاری های متعدد جنینی باشد . در این مطالعه تجربی، که روی موش  $Balb/c$  ها پلوئید  $H-i$  حساس به لیستریا منوسیتوژنز، به بررسی میزان کلینیزاسیون باکتری در بافتهای خونی، جفتی و رحم مادر آلوده و تغییرات بافتی در رحم و اثرات احتمالی سموم باکتری بر روی جنین مطالعه شده است.

### روش کار

به موشهای باردار در دو گروه شاهد و تجربی در دسته های ۲۰ تایی که در شرایط نوری ، دمایی و آب و غذایی یکسان نگهداری میشدند به میزان  $200 \mu\text{L}$  سرم نرمال سالین بعنوان موشهای شاهد و  $200 \mu\text{L}$  از دوز غیر کشنده باکتری  $1/2 \text{LogFCU/lm}$  لیستریا منوسیتوژنز به موشهای تجربی بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روزهای ۰-۳۰ حاملگی از مادران حامله گروه تجربی و ۵ ml خون گرفته شد و ۳۵ سر موش از هر گروه در روزهای ۵-۰ ، ۱۰-۶ ، ۱۵-۱۱ ، ۲۰-۱۶ ، ۲۵-۲۱ و ۳۰-۲۶ حاملگی را نخاعی کرده رحم جدا شده و در زیر استریومیکروسکوپ شاخهای رحم تشریح شده و تعداد و محل پلاستا شمارش گردیده و با تعداد جنین های موجود در رحم مقایسه شد تا تعداد سقط مشخص گردد و از موشهای آلوده باردار، بعد از روز پانزده حاملگی بخش جنینی جفتها، در محل لانه گزینی جنین کاملا از رحم جدا شد نیمه برای مطالعه باکتری و نیمه دیگر برای مطالعه هیستولوژی استفاده شد. تعداد ۳۵ سر از مادران باردار در روز ۲۴ حاملگی سزارین شده و جنین خارج گردیده و رحم و پلاستا در محیط کاملا استریل جدا شده و جهت تهیه مقاطع هیستولوژی در فرمالین

توجه به نتایج بدست آمده توسط *Slutsker* و همکاران در موش در مورد میزان کلینیزاسیون باکتری در پلاستنا موش نتایج ما را مورد تایید قرار میدهد (۷) و تفاوت موجود در بافتهای مختلف میتواند احتمالاً مربوط به تکثیر بیشتر باکتری در خون بعلت وجود شرایط رشدی مناسب برای باکتری باشد. ضمن اینکه سلولهای دفاعی در خون بعلت توقف کوتاه مدت، فرصت مقابله با میکرب تزریقی را ندارند در حالیکه در ارگان های دیگر بعلت مدت زمان طولانی تر مهاجرت باکتری از موضع تزریق به آن ارگان ها ، سلولهای دفاعی بطور موضعی فرصت کافی برای مقابله با باکتری و حذف آنها دارند در نتیجه میزان کلینیزاسیون آنها پایین میاورند. پلاستنا بعلت آنکه هم محل تکثیر باکتریایی است که از رحم میایند و هم باکتریهای تکثیر یافته در جنین به آن وارد میشوند و ضمناً در رحم باکتری ها بیشتر داخل سلولی هستند در نتیجه میزان کلینیزاسیون باکتری در پلاستنا از رحم بیشتر میباشد. بررسی سقط جنین ناشی از آلودگی موش مادر با باکتری در این تحقیق نشان میدهد که بیشتر سقط جنینها در مدل حیوانی موش نژاد *Balb/c* در یک سوم دوم بارداری بین روزهای دهم تا بیستم می باشد (جدول ۱) در حالیکه مطالعات *Fredriksen* نشان داده است که بیشتر سقط جنین های ناشی از لیستریوز یس در انسان در نیمه دوم بارداری رخ می دهد (۸). این تفاوت در زمان سقط جنین در موش و در انسان می تواند در ارتباط با اختلافاتی که در سیستم ایمنی و مسیر عبور باکتری از پلاستنا به جنین آنها وجود دارد، باشد. بررسی مقاطع میکروسکوپی نشاندهنده ضایعات بافتی در رحم است که شامل آتروفی اپیتلیوم مخاط، انسداد و پر خونی مخاط است و در برخی نقاط اپیتلیوم منشوری به مکعبی تبدیل شده بود، استرومای رحم ضخیم و سلولهای استرومایی با سیتوپلاسم بزرگ و زاویه دار دیده شدند و غدد آندومتری دچار آتروفی شده بود وجود باکتری در این بافت نشاندهنده تهاجم این باکتری به سلولهای این ارگان است و منشأ تغییرات بافتی در سلولهای تشکیل دهنده این ارگان است (شکل ۱ و ۲) یافته های این تحقیق نتایج مطالعاتی را که توسط *Mandel* و *Abram* و *Heymer* همکارانشان انجام گردیده است را مورد تایید قرار میدهد (۹-۱۱). مقاطع بافتی پلاستنا تهیه شده در روز پانزده حاملگی بدلیل اینکه در این زمان عروق خونی پلاستنا کاملاً تکامل یافته است انتخاب شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند و در بررسی این مقاطع نشان داده شد که باکتری سریعاً وارد پلاستنا میشود و سرعت جنین را آلوده میکند. این با نظرات قبلی که معتقد بودند عفونت پلاستنا ثانویه بوده و بدنال عفونت مغز استخوان و کبد و ارگانهای دیگر ایجاد میگردد، منطبق نیست (۱۲ و ۱۳). عفونت پلاستنا همیشه قبل از عفونت جنین است و هیچ عفونت جنینی بدون عفونت پلاستنا وجود نداشت و همینطور انتقال از سد جفتی به تمرکز میزان باکتری در جفت بستگی دارد. در این مطالعه نشان داده شد که باکتری تروفوبلاست مشتق شده از سلولهای اپیتلیال جنینی که سد فیزیکی بین جریان خون مادر و جنین را ایجاد میکند را آلوده می کند و همینطور نشان داده شد که سلولهای پوشاننده داخل رگی و ویلوسها و سلولهای تروفوبلاستی خارج ویلوسها بوسیله لیستریومونوسیتوز آلوده میشوند این نتایج با مطالعات *Lecuit* و همکاران که نشان دادند لیستریومونوسیتوز در انسان به سلولهای تروفوبلاستی حمله میکنند، منطبق است (۱۴).

### نتیجه گیری

با توجه به ثابت شدن اثر لیستریا منوسیتوز بر سقط جنین نقش فاکتورهای که در سقط جنین در ارتباط با عفونت لیستریومونوسیتوز میباشد از قبیل بافتهای جنینی و تداخل عمل پاسخهای ایمنی بین بافتهای مختلف جنینی در دوران بارداری مطالعه گردد.

بررسی دقیق نمونه های میکروسکوپی رحم در مادران آلوده در روزهای ذکر شده در روش مطالعه ، و مقایسه آنها با رحم طبیعی مادران حامله همراه آتروفی اپیتلیوم مخاط در بعضی نقاط، انسداد و پر خونی مخاط در بعضی نقاط، تبدیل نقاط اپیتلیوم منشوری به مکعبی، هیپر تروفی و ضخیم شدن استرومای رحم ، زاویه دار شدن سلولهای استرومایی با سیتوپلاسم بزرگ، و آتروفی غدد آندومتری بود (شکل ۱ و ۲).

از هر جفت ۶-۱۰ مقطع برای مطالعه سیستمی دو طرف کور برای هر ساختمان آناتومیکی جفت استفاده شد. در مقاطع در ۷۲ ساعت پس از تزریق باکتری در کانال شریان مرکزی ، در سلولهای پوشاننده دیواره عروقی کانال و در بخش تروفوبلاست اسفنجی و سلولهای بزرگ تروفوبلاستیک که اطراف کانال را احاطه کرده بودند دیده شد. در روز سوم باکتری علاوه بر سلولهای کانال مرکزی و در بخش لایبرنتین جفتی و در هسته مرکزی ویلی های این بخش دیده شد (این سلولها سد جفتی جنین را میسازند و جریان خون مادری را از جریان خون جنینی جدا میکنند و دارای قدرت انتخاب در تبادل مواد بین مادر و جنین هستند) و در این ویلی ها کانون های باکتریایی مشاهده گردیدند (شکل ۳-۵). در روز سوم همچنین باکتری درون سلولهای دسیدوا بازالیس مادری دیده شد



شکل ۱ و ۲: رحم آلوده به سوسپانسیون لیستریا منوسیتوز و رحم طبیعی



شکل ۳ تا ۵: مقطع میکروسکوپی بافت آلوده پلاستنا موش *Balb/c* ۷۲ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی سوسپانسیون لیستریا منوسیتوز - کانون های باکتریایی در دسیدوای بازال مادری، کانال شریان مرکزی، تروفوبلاست اسفنجی سلول های پوشاننده کانال شریان مرکزی دیده می شود.

### بحث

در این تحقیق اثرات آلودگی با استرین ۴b لیستریامونوسیتوز، در رحم و پلاستنا و خون موش آلوده بارور ، و کلینیزاسیون باکتری دراعضای مذکور بررسی شد. بررسی میزان کلی نیزاسیون باکتری در ارگان های مختلف در موش مادر ۷۲ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی نشان داده است که میزان استقرار باکتری در ارگان های مختلف بترتیب از کم به زیاد رحم ، پلاستنا و خون میباشد . میزان کلینیزاسیون باکتری در رحم کمتر از پلاستنا است با

## REFERENCES

---

1. Farber JM & PI Peterkin. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* .1991, 55:479-511.
2. Rocourt, J, Jacquet, C & Reilly, A. Epidemiology of human listeriosis and seafood. *J. food Microbiol* 1.2000, 99:162,197-209
3. Meier, J and Lopez, L. listeriosis: an emerging food-borne disease. *Clin. Lab. Sci.* 2003, 14, 187-192
4. Smith, G. J Foodborne infections during pregnancy. *J. Food Prot.* (1999) 62, 818-829
5. Abram, M. and Doric, M. Primary *Listeria monocytogenes* infection in gestating mice. *Folia Microbiol*, 1997, 42, 65-71
6. Andres, R, L, Kuyoe, W, Resnik, R, Piacquadro, K, M. and Benirschke, K. The association of maternal floor infarction of the placenta with adverse perinatal outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004, 163, 935-938
7. Slutsker, L. and A. Schuchat . *Listeriosis in human*. In E. T. Ryser, and E. H. Marth, *Listeria, listeriosis, and food safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker Inc, New York, N, Y, 1999, p 75-95
8. Fredriksen, B. Maternal septicemia with *Listeria monocytogenes* in second trimester without infection of the fetus. *Acta obstet. Gynecol. Scand* 1992, 71, 313-315
9. Marco, A. J. Altimira, N. Prats, S. Lopes, L. Dominguez, M. Domingues, and Domingo. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Comp. Pathol.* 1992, 107, 1-9
9. Mandel, T. F. and C. Cheers Resistance and susceptibility to bacterial infection. Histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strain. *Infect. Immun.* 1990, 30, 851-861
10. Heymer, B. C. H. Wirsing von Konig, H. Hof, and P. Emmerling. Histomorphology of experimental listeriosis. *Infection* 16; S106-S111.
11. Abram, M. and Doric, M. the influence of *Listeria monocytogenes* infection on pregnancy in Balb/c mice In. III International meeting mechanisms in Local Immunity Opatija, Croatia. Abstract Perio. *Bio* 1996, 1, 98 (Suppl. 1) p. 76
12. Join-Lambert, O. F., S. Ezine, A. Le Monnier, F. Jaubert, M. Okabe, P. Berche, and S. Kayal. *Listeria monocytogenes*-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. *Cell Microbiol.* 2005, 7: 167-180.
13. Mackaness, G. B. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 1962, 116: 381-406.
14. Lecuit, M., D. M. Nelson, S. D. Smith, H. Khun, M. Huerre, M. C. Vacher-Lavenu, J. I. Gordon, and P. Cossart. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101: 6152-6157.