

ارزیابی بیان ژن های پیش التهابی در زخم و طحال موش های BALB/c آلوده به لیشرمانیا ماژور

سهیلا اختری^۱، حسین رضوان^۱، علیرضا نوریان^{۲*}، مسعود ذوالحوریه^۳، مرتضی شمسی^۴

- (۱) گروه انگل شناسی، دانشکده پیرا دام پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
 (۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرا دام پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
 (۳) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده پیرا دام پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
 (۴) مرکز تحقیقات بیماری های مشترک انسان و حیوان، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۰

چکیده

مقدمه: لیشرمانیا ماژور از انگل های تک یاخته ای و عامل بیماری لیشرمانیوز پوستی می باشد. تحقیقات نشان داده است که پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه این انگل با ژنوتیپ میزبان مرتبط می باشد. اگر چه تا کنون در بسیاری از مطالعات انجام شده ویژگی های پاسخ ایمنی میزبان در بیماری لیشرمانیوز و امکان پیشگیری آن از طریق واکسن مورد بحث قرار گرفته است، اما تا کنون کم تر به چگونگی ایجاد زخم و نقش پاسخ های التهابی با میانجی گری سلول های سیستم ایمنی ذاتی در ایجاد و ترمیم زخم ناشی از لیشرمانیوز پوستی توجه گردیده است. هدف از انجام این تحقیق بررسی هم زمان الگوی بیان ژن های پیش التهابی در زخم و طحال در موش های BALB/c مبتلا به لیشرمانیوز جلدی بود.

مواد و روش ها: در این بررسی، تعداد 1×10^7 فرم پروماستیگوت انگل لیشرمانیا ماژور به صورت داخل جلدی در دو گروه موش BALB/c در قسمت انتهای دم تزریق و سپس در فواصل زمانی یک هفته بیان ژن های سایتوکاین های CCL4، CCL3، IL-12p35، IL-12p40، TNF- α ، CCL5، IL-1 α ، IL-1 β ، IFN- γ و CCR5 در بافت زخم و طحال مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که انگل لیشرمانیا در بیماری لیشرمانیوز جلدی باعث کاهش شدید در بیان ژن های پیش التهابی در زخم و طحال موش های درمان شده با PBS گردید در حالی که در موش های درمان شده با گلوکاتیم این موضوع مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج سایتوکاین های TNF- α ، IL-12، IFN- γ از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار در پاسخ ایمنی علیه لیشرمانیا می باشند زیرا کاهش بیان این ژن ها باعث ایجاد زخم های پیشرفته لیشرمانیا در موش های آلوده گردید.

واژه های کلیدی: لیشرمانیازیس، زخم، طحال، ژن های پیش التهابی

* نویسنده مسئول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرا دام پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران

Email: nourian.ar@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

بیماری لیشمانیوز جلدی (سالک) یکی از بیماری های مشترک بین انسان و دام است و بعد از مالاریا به عنوان یک معضل بهداشتی در جهان مطرح می باشد. عامل آن تک یاخته ای از گروه تاژکداران خانواده تریپانوزوماتیده و جنس لیشمانیا می باشد که به وسیله نیش پشه های ناقل گونه های فلبوتوموس به انسان منتقل می شود. علایم این بیماری به صورت زخم هایی خشک یا مرطوب که بعضاً ممکن است تا یک سال روی نقاطی از بدن مانند دست، پا و صورت باقی بمانند، ظاهر می شود. در جهان تعداد افراد مبتلا به این بیماری بیش از ۱۲ میلیون مورد است که این تعداد با وقوع بیماری هایی مانند ایدز و بحران های اجتماعی در مناطق آلوده در دهه های اخیر در حال افزایش بوده به طوری که موارد جدید بیماری در جهان سالانه بیش از ۱/۵ میلیون نفر می باشد (۱). در ایران حدود ۱۵۰۰۰ نفر سالانه به سالک مبتلا می شوند و بر اساس تحقیقات موجود، میزان واقعی موارد آن ۴ تا ۵ برابر میزانی است که گزارش می شود. میزان بروز بیماری در ایران ۰/۲۸ در هر هزار نفر جمعیت تخمین زده می شود (۲). درمان های رایج این بیماری استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان (پنتوستام و گلوکانتیم) می باشد و علی رغم تلاش های فراوان تا کنون کنترل بیماری چندان موفقیت آمیز نبوده و درمان آن نیز در عمل با مشکلات متعددی از جمله عدم پاسخ به درمان به علت مقاومت دارویی مواجه بوده است. به همین دلیل در سال های اخیر سازمان جهانی بهداشت بیماری لیشمانیوز را به عنوان یک بیماری گرمسیری غفلت شده یا فراموش شده مطرح کرده است (۳). یافته های ایمنی شناسی در لیشمانیازیس عمدتاً از طریق مطالعه بر روی مدل های حیوانی با استفاده از نژادهای خالص موش به دست آمده است. این یافته ها نشان داده اند که مقاومت به عفونت لیشمانیا به طور مشخصی با فعالیت لنفوسیت های Th_1 ارتباط دارد (۴). ژن های پیش التهابی نقش مهمی در چگونگی فعال شدن سیستم ایمنی و در نهایت از بین بردن عفونت لیشمانیا به عهده دارند. فعال شدن ماکروفاژها توسط سایتوکاین $IFN-\gamma$ صورت می گیرد. مکانیسم اصلی

برای از بین بردن انگل در این سلول ها، تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتریک اکسید می باشد. به علاوه، $IFN-\gamma$ که از لنفوسیت های T آزاد می شود، تولید $TNF-\alpha$ را در ماکروفاژها تحریک می کند. بنا بر این $TNF-\alpha$ واسطه شیمیایی در هر دو نوع پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی و عامل ارتباطی مهم بین پاسخ های ایمنی اکتسابی و التهاب حاد می باشد (۵). کموکاین CCL5 در واکنش های التهابی نقش مهمی در جلب لنفوسیت های T، نوتروفیل ها و سایر سلول های لنفاوی دارد. کموکاین CCL4 که به عنوان پروتئین التهابی ماکروفاژها نیز شناخته می شود به همراه CCL3 نقش مهمی در جلب سلول های کشنده طبیعی و مونوسیت ها دارد. کموکاین CCR5 نیز به عنوان یکی از ریسپتورهای مهم برای این سایتوکاین های CCL3 و CCL4 مطرح می باشد که هیچ کدام در عفونت های ناشی از لیشمانیوز جلدی مورد توجه جدی قرار نگرفته اند. هم چنین بیان ژن های پیش التهابی در طحال و هماهنگی در بیان این ژن ها در زخم لیشمانیا و طحال موضوعی است که تا کنون مطالعه نشده است. هدف از انجام این تحقیق بررسی هم زمان الگوی بیان ژن های پیش التهابی در زخم و طحال در موش های BALB/c مبتلا به لیشمانیوز جلدی می باشد.

مواد و روش ها

انگل لیشمانیا: سوش وحشی و بدون دستکاری ژنتیکی انگل لیشمانیا ماژور MHOM/76/IR، از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط RPMI (5 MI)، حاوی سرم جنین گوساله (100 μ L) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد کشت داده شد و در پاساژهای ۲-۴ به حیوانات آزمایشگاهی تزریق گردید.

طراحی پرایمر: ژن های مورد مطالعه در این تحقیق عبارت بودند از:

IL-12p40, IL-12p35, IL-1 β , IL-1 α , CCR5, CCL5/RANTES, CCL4/MIP-1 β , CCL3/MIP-1 α , $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$.

کلیه پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

پس از یافتن توالی ژن ها در بانک ژنی، با استفاده از نرم افزار طراحی پرایمر در سایت NCBI پرایمر مناسب برای هر ژن طراحی گردید. توالی

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژن های پیش التهابی

نام ژن پیش التهابی	طول باند (bp)	توالی (sequence)	دمای ذوب پرایمر (°C)
CCL3/MIP-1 α	۱۰۰	F: 5'-TCTGCGCTGACTCCAAAGAG-3'	۶۲
		R: 5'-GTGGCTATCTGGCAGCAAAC-3'	۶۲
CCL4/MIP-1 β	۱۰۰	F: 5'-CAGCCCTGATGCTTCTCACT-3'	۶۲
		R: 5'-GGGAGACACGCGTCCTATAAC-3'	۶۲
CCL5/R ANTES	۱۰۰	F: 5'-GTGCTCCAATCTTGCAGTCG-3'	۶۲
		R: 5'-AGAGCAAGCAATGACAGGGA-3'	۶۲
CCR5	۱۰۰	F: 5'-ATTCTCCACACCCTGTTTCG-3'	۶۰
		R: 5'-GAATTCCTGGAAGGTGGTCA-3'	۶۰
LI-1 α	۱۰۰	F: 5'-CAGTTCTGCCATTGACCATC-3'	۶۰
		R: 5'-TCTCACTGAAACTCAGCCGT-3'	۶۰
IL-1 β	۱۰۰	F: 5'-TTGACGGACCCCAAAAGATG-3'	۶۰
		R: 5'-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3'	۶۰
IL-12p35	۱۰۰	F: 5'-ATGATGACCCTGTGCCTTGG-3'	۶۲
		R: 5'-CACCCCTGTTGATGGTCACGA-3'	۶۲
IL-12p40	۱۰۰	F: 5'-CTGCTGCTCCACAAGAAGGA-3'	۶۲
		R: 5'-ACGCCATTCCACATGTCACT-3'	۶۲
TNF- α	۱۰۰	F: 5'-TATAAAGCGGCCGTCTGCAC-3'	۶۲
		R: 5'-TCTTCTGCCAGTTCACGTC-3'	۶۲
IFN- γ	۱۰۰	F: 5'-GCTCTGAGACAATGAACGCT-3'	۶۰
		R: 5'-AAAGAGATAATCTGGCTCTGC-3'	۶۰

زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (دنا زیست) انجام شد. برای این منظور، مقدار ۱۰۰ mg از بافت های پوست و طحال به طور جداگانه به ظرف های حاوی محلول PBS استریل منتقل شدند. برای جدا سازی RNA از بافت، پس از انتقال ۵۰ mg از بافت به میکرو تیوب، نمونه در حمام اولترا سونیک، هموژنیزه و ۱ ml از محلول GI موجود در کیت به آن اضافه و به وسیله ورتکس و پیپت مخلوط گردید. بافت هموژنیزه با قرار گرفتن در دمای اتاق به مدت ۵ ثانیه، دوباره هموژنیزه گردید. سپس میکرو تیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و با دور ۲۶۵ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی به میکرو تیوب جدید منتقل و ۲۰ μ L کلروفورم به آن

تلقیح/انگل: موش های بالغ ماده BALB/c با سن ۸ تا ۱۲ هفته از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران، تهران خریداری و به صورت کاملاً تصادفی به دو گروه چهار تایی تقسیم شدند. انگل در پاساژ های ۴-۲ به تعداد ۱۰ میلیون در ۱۰۰ μ L در هر موش به صورت داخل جلدی در ناحیه قاعده دم تلقیح گردید (۶). هیچ درمانی در موش های گروه اول انجام نشد. موش های گروه دوم تحت درمان ۰/۲ میلی لیتر در هر ۱۰۰ میکرو لیتر داروی مگلوکانتیم، آنتی موان (گلوکانتیم، ۳۰ mg/۱۰۰ μ L) به صورت تزریق در محل زخم قرار گرفتند.

نمونه گیری: پس از ایجاد زخم لیشمانیا در موش های آلوده، به منظور بررسی ژن های پیش التهابی، نمونه گیری از طحال و زخم در چهار مرحله انجام شد. اولین نمونه گیری، قبل از شروع درمان و بقیه نمونه ها به فاصله یک هفته اخذ شدند. نمونه ها تا

به مدت ۵ دقیقه، میکرو تیوب در کنار یخ قرار گرفته و cdNA استخراج شده به فریزر منتقل گردید.

جهت انجام واکنش PCR، $37/5 \mu\text{L}$ آب مقطر دیونیزه دو بار تقطیر، $5 \mu\text{L}$ بافر PCR X10، $1/5 \mu\text{L}$ MgCl₂، $0/8 \mu\text{L}$ dNTP، $0/25 \mu\text{L}$ تگ پلیمرز، $1 \mu\text{L}$ cdNA، $2 \mu\text{L}$ از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse برای ژن های التهابی (به صورت جداگانه) و $1 \mu\text{L}$ از RNA استخراجی به هر میکرو تیوب اضافه شد. سپس میکرو تیوب ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، سپس ۴۵ ثانیه با دمای ۵۶ درجه سانتی گراد و ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد مجموعاً ۴۲ سیکل و در نهایت ۱۰ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد آنکوبه شدند. سپس محصول نهایی PCR به همراه DNA استاندارد به عنوان مارکر روی ژل آگارز $1/5$ درصد به مدت ۱ ساعت الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و از باندهای به دست آمده توسط دستگاه ترانس لومیناتور عکس برداری شد.

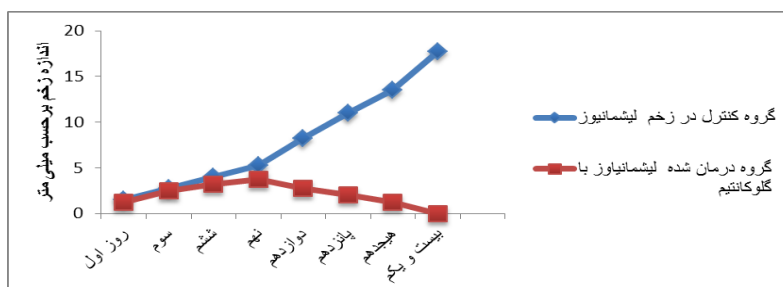
یافته های پژوهش

زخم: پس از گذشت ۱ هفته زخم ناشی از لیشمانیا در ناحیه تزریق انگل (قاعده دم) مشاهده شد. در گروهی که تحت درمان با گلوکانتیم بودند به مرور زمان ۲۱ روز زخم ها جمع شده و هیچ گونه ندول یا زخم ناشی از لیشمانیوز باقی نماند در حالی که در گروه کنترل در مدت زمان مشابه زخم های پوستی گسترش یافته که در نهایت منجر به مرگ حیوان گردیدند (نمودار شماره ۱).

اضافه و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون انجام شد. در مرحله بعد میکرو تیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۶۵ سانتریفوژ و لایه رویی به میکرو تیوب جدید منتقل و پس از اضافه شدن همان میزان ایزو پرونانول و محلول G2 و انجام پپیتنگ، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس میکرو تیوب به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۸۵۰۰ سانتریفوژ و پس از حذف مایع رویی، مقدار ۱ ml اتانول ۷۰ درصد به قسمت رسوب اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۸۵۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی کاملاً تخلیه و میکرو تیوب تا خشک شدن محتویات در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. در مرحله آخر $100 \mu\text{L}$ آب مقطر دیونیزه به میکرو تیوب اضافه شد.

ستتر *cdNA* تبدیل RNA به cdNA با استفاده از کیت تجاری شرکت سینا کلون و به روش زیر انجام شد:

در یک میکرو تیوب به ترتیب $1 \mu\text{L}$ پرایمر Oligo-Dt، $1 \mu\text{L}$ مخلوط dNTPs و $10 \mu\text{L}$ از RNA استخراجی اضافه و پس از قرار گرفتن در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس سانتریفوژ با دور ۲۶۵ به مدت ۲ دقیقه، در کنار یخ قرار گرفت. در یک میکرو تیوب جدید، $2 \mu\text{L}$ بافر Reverse Transcriptase M- و ۱۰ X و واحد MuLV اضافه شد. حجم مخلوط با آب مقطر به $10 \mu\text{L}$ رسانده شد و به میکرو تیوب اول اضافه گردید. پس از قرار گرفتن در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و سپس در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد



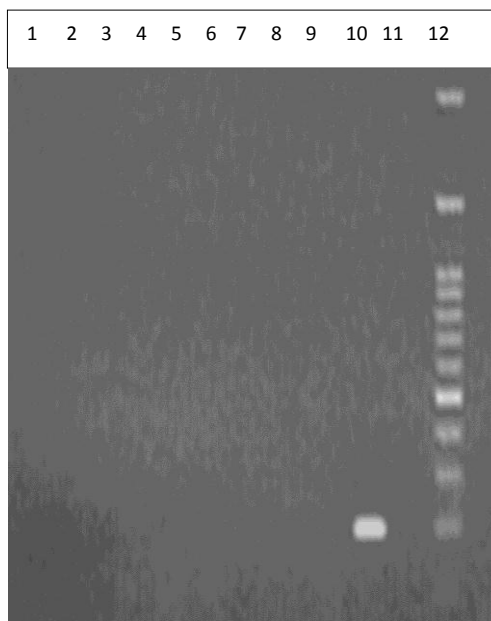
نمودار شماره ۱. مقایسه اندازه زخم لیشمانیوز: جهت ایجاد لیشمانیوز تعداد ۱۰ میلیون انگل لیشمانیا ماژور به صورت داخل جلدی به ۲ گروه ۴ تایی موش BALB/c تزریق شد. در گروه تحت درمان، گلوکانتیم به میزان 30 mg/kg میلی لیتر به صورت داخل ضایعه در ساعات ۳، ۶ و ۱۲ تزریق شد. اندازه زخم به فاصله هر ۳ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج اختلاف معنی داری را بین گروه تست و کنترل نشان می دهد.

بیان ژن های پیش التهابی در زخم پوستی و طحال: نتایج به دست آمده از آزمایشات نشان داد که در پوست و طحال در موش های سالم (گروه کنترل) هیچ یک از ژن های پیش التهابی مورد آزمایش بیان نگردیدند. در گروه کنترل، در تمام طول دوره آزمایش تنها ژن IFN- γ در پوست و طحال بیان شد و از این جهت در بیان ژن های پیش التهابی فوق بین زخم و طحال مشابهت کامل وجود داشت (شکل شماره ۱). در گروه تست (گروه درمان شده با گلوکانتیم)، قبل از شروع درمان، بیان ژن ها مشابه گروه کنترل بوده و فقط ژن IFN- γ بیان گردید. در این گروه در هفته اول

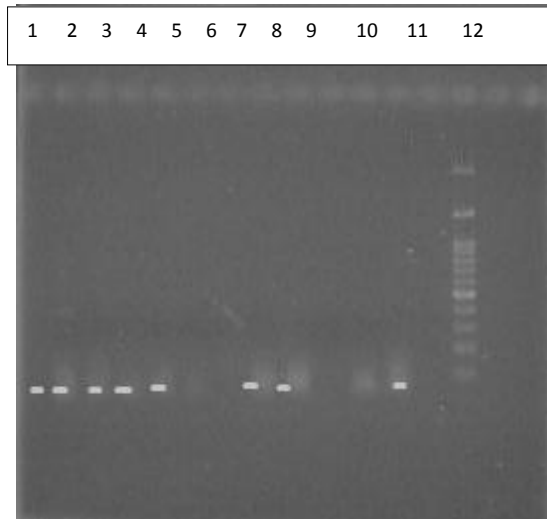
بعد از درمان، ژن های IFN- γ ، IL-12P35، IL-12P40، CCL5، TNF- α ، CCL3/MIP-1 α و CCL4/MIP-1 β در زخم بیان گردیدند. در این گروه و به طور هم زمان، ژن های IL-12P35، IL-12P40، CCL5، CCR5، TNF- α ، CCL4/MIP-1 β و LI-1 α در طحال بیان گردیدند (شکل شماره ۲). در ادامه آزمایش در هفته دوم در گروه تست، ژن های TNF- α ، CCL4، CCL3، IL-12P35، IL-12P40، CCR5، CCL5 و IFN- γ در زخم و ژن های TNF- α ، IL-12P35، IL-12P40، CCL5، CCR5 و IFN- γ در طحال بیان شدند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲. نحوه بیان ژن بافت پوست و طحال در زخم لیشمانيوز

	مرحله نمونه گیری	نوع نمونه	CCL4/MIP-1 β	CCL3/MIP-1 α	TNF- α	IL-12p35	IL-12p40	CCL-5	CCR5	IL-1 β	LI-1 α	IFN- γ	
بافت سالم		پوست	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		طحال	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
گروه درمان شده با PBS	قبل از درمان	پوست	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	
		طحال	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
	هفته اول	پوست	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
		طحال	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
	هفته دوم	پوست	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		طحال	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
گروه درمان شده با گلوکانتیم	قبل از درمان	پوست	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
		طحال	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	هفته اول	پوست	+	+	+	++	++	+++	-	-	-	-	++
		طحال	+	-	++	++	++	++	+	-	-	++	-
	هفته دوم	پوست	+	+	+	++	++	++	-	-	-	+	++
		طحال	-	-	+	+	+	+++	-	-	-	+	++



شکل شماره ۱. بیان ژن در زخم ناشی از لیشمانیازیس جلدی و درمان شده با PBS در هفته اول: تعداد 1×10^7 انگل لیشمانیا ماژور به فرم پرو ماستیگوت کشت شده در پاساژهای ۴-۲ به صورت داخل جلدی به هر موش BALB/c تزریق گردید. در گروه تحت درمان مقدار 30 mg/kg گلوکانتیم و در گروه کنترل PBS به داخل زخم تزریق گردید. نمونه ها به ترتیب از سمت چپ به راست ۱. CCL4، ۲. CCL3، ۳. TNF- α ، ۴. IL-1 α ، ۵. IL-12p35، ۶. IL-12p40، ۷. CCL-5، ۸. CCR5، ۹. IL-1 β ، ۱۰. IFN- γ ، ۱۱. کنترل منفی و ۱۲. DNA استاندارد



شکل شماره ۲. بیان ژن در زخم ناشی از لیشمانیازیس جلدی و درمان شده با گلوکانتیم در هفته اول: دو گروه موش BALB/c ابتدا با تعداد 1×10^7 انگل لیشمانیا ماژور به صورت داخل جلدی تزریق شده و سپس گروه اول با مقدار 30 mg/kg گلوکانتیم مورد درمان قرار گرفت. در گروه کنترل PBS به داخل زخم تزریق گردید. بیان ژن های پیش التهابی در زخم و طحال در هر دو گروه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها به ترتیب از چپ به راست سمت راست: ۱. CCL4، ۲. CCL3، ۳. TNF- α ، ۴. IL-1 α ، ۵. IL-12p35، ۶. IL-12p40، ۷. CCL-5، ۸. CCR5، ۹. IL-1 β ، ۱۰. IFN- γ ، ۱۱. کنترل منفی و ۱۲. DNA استاندارد

بحث و نتیجه گیری

اگر چه در بسیاری از مطالعات نقش پاسخ ایمنی در درمان و پیشگیری بیماری لیشمانیوز و طراحی انواع واکسن بر علیه انگل لیشمانیا مورد بحث قرار گرفته است، اما چگونگی ایجاد زخم و نقش پاسخ های التهابی با میانجی گری سلول های سیستم ایمنی و سایتوکاین ها کم تر مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی و درک بهتر الگوی بیان ژن های پیش التهابی در مراحل مختلف ایجاد و پیشرفت بیماری لیشمانیوز جلدی برای ارائه یک چارچوب استاندارد جهت تشخیص مراحل مختلف بیماری از نظر روند بهبود بیماری بود. در این مطالعه همان طور که قابل انتظار بود در گروه موش های BALB/c تحت درمان با گلوکانتیم در طی سه هفته بهبودی مشاهده شد و در گروه کنترل نیز عفونت پیشرفت کرده و منجر به مرگ تمامی موش ها گردید. علت بهبود در گروه درمان شده را می توان به عدم انتشار انگل در سایر اندام های موش نسبت داد که این ویژگی یکی از شاخص های تاثیر دارو در درمان لیشمانیوز جلدی در موش های حساس مانند BALB/c است (۷). با دقت در الگوی بیان ژن های پیش التهابی در موش های گروه کنترل می توان نتیجه گرفت که در این گروه، انگل لیشمانیا در طحال و زخم باعث کاهش شدید ژن های پیش التهابی شده است به نحوی که از بین همه ژن های مورد آزمایش فقط ژن $IFN-\gamma$ در طحال و زخم بیان شد که البته بیان این ژن در اواخر دوره بیماری نیز متوقف گردید. بیان ژن های پیش التهابی در موش های درمان شده با گلوکانتیم و عدم بیان آن ها در گروه کنترل بیان کننده اثر فعالیت انگل در جهت کاهش بیان این ژن ها در سیستم ایمنی بوده و نشان می دهد که بعد از درمان در موش های مبتلا به لیشمانیوز جلدی ژن های پیش التهابی در زخم و طحال بیان می شوند. از سوی دیگر در هر دو گروه تست و کنترل، هماهنگی نسبتاً بالایی در بیان ژن های پیش التهابی در طحال و زخم مشاهده گردید که نشان دهنده اثر سیستمیک انگل بر روی سیستم ایمنی در همه مراحل بیماری می باشد. در مطالعه ای که توسط لاپارا و همکاران انجام شد نقش

بعضی از ترکیبات باکتریایی مانند LPS در کاهش بیان ژن های پیش التهابی در ماکروفاژها گزارش شده است (۸). احتمالاً انگل لیشمانیا نیز با مکانیسم های مشابه قادر به کنترل بیان ژن های پیش التهابی در ماکروفاژها بوده که می تواند باعث پایداری بیشتر انگل در داخل این سلول گردد. تفاوت در بیان بعضی از ژن های پیش التهابی در زخم و طحال مبین تفاوت در نوع و حتی میزان سایتوکین های ترشح شده در این دو عضو می باشد و نشان می دهد که احتمالاً نوع پاسخ یا نوع سلول های لنفوسیت شرکت کننده در پاسخ ایمنی در طحال و زخم متفاوت می باشند. در مطالعات قبل، تفاوت در بیان ژن های پیش التهابی بین سلول های طحال با سایر سلول ها در لیشمانیوز احشایی نیز نشان داده شده است (۹). به نظر می رسد که انگل لیشمانیا در طحال و سایر بافت ها تعامل متفاوتی با سیستم ایمنی برقرار می نماید که البته این موضوع، مستلزم تحقیقات بیشتری در آینده است. در مطالعه ملبی که روی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی انجام شد، سایتوکاین های $IL-1\alpha$ و $TNF-\alpha$ افزایش نشان دادند اما در مطالعه حاضر، میزان این سایتوکاین ها در گروه بدون درمان به شدت کاهش یافتند که نشان دهنده شرایط متفاوت بیماری در انسان و موش BALB/c است (۱۰). نقش $TNF-\alpha$ به همراه $IL-12$ و $IFN-\gamma$ در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی لنفوسیت های $CD4^+$ T (Th_1) و کنترل عفونت لیشمانیا در موش گزارش شده است. در مطالعه اولیویرا و همکاران در بیماران لیشمانیوز جلدی میزان $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ با یکدیگر ارتباط مستقیمی داشته به طوری که کاهش یکی کاهش دیگری را سبب می شود که با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد (۱۱). افزایش میزان $TNF-\alpha$ در گروه مورد در طحال، حاکی از آن است که میزان $TNF-\alpha$ در سیر بیماری لیشمانیوز جلدی، از مرحله فعال تا بهبودی قابل ردیابی است. این واسطه التهابی از سایتوکاین های اصلی فعال کننده ماکروفاژ برای تولید نیتریک اکساید است که در نابودی انگل های درون سلولی موثر است و در عفونت ناشی از عامل بیماری زای درون سلولی لیشمانیا ماژور اهمیت دارد (۱۲، ۱۳). میزان و نوع ژن های التهابی بیان شده

جهت سرکوب عامل پاتوژن در مراحل اولیه تا بهبود زخم لیشمانیا متفاوت است. معمولاً کموکاین های التهابی مانند CCL3 و CCL4 در اثر پاسخ های التهابی القاء می شوند که در اثر تماس با انگل لیشمانیا یا در اثر فعالیت سایتوکاین های التهابی مثل $TNF-\alpha$ عرضه این کموکاین های التهابی افزایش می یابد(۱۴). کموکاین CCL4 و دیگر کموکاین ها دارای نقش پیش التهابی هستند و در هنگام التهاب، باعث فراخوان سلول های ایمنی شده و به طور کلی چسبندگی، کموتاکسی و فعال سازی بسیاری از جمعیت های لکوسیتی را کنترل می کنند و تنظیم کننده اصلی عبور و مرور لکوسیتی می باشند. خانواده کموکاین ها در رگ زایی و بهبود زخم نیز نقش تنظیمی دارد(۱۵). تصور بر این است که در ایمنی با واسطه سلولی در موش های BALB/c آلوده به لیشمانیا، پاسخ Th_2 نسبت به Th_1 دارای شدت بیشتری است و در نتیجه ترشح $IFN-\gamma$ که در بهبودی لیشمانیوز جلدی نقش موثری دارد، کاهش چشم گیری می یابد. نقش مهم محور $IFN-\gamma$ و $IL-12$ در تحریک پاسخ های Th_1 و ایجاد مقاومت علیه انگل لیشمانیا ثابت شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گروه کنترل، $IFN-\gamma$ فقط در هفته های اول بیماری بیان شده و در اواخر بیماری بیان این سایتوکین متوقف می گردد. هم چنین $IL-12$ در هیچ یک از مراحل بیماری در گروه کنترل بیان نشد اما در گروه مورد تحت درمان با گلوکانتیم، این دو سایتوکین بیان شدند که نشان دهنده فعال بودن این محور می باشد. بالا بودن میزان $IFN-\gamma$ و $IL-12$ نشان دهنده بهبودی موش های BALB/c آلوده به لیشمانیا ماژور است. لذا می توان نتیجه گرفت که این محور نقش مهمی در درمان لیشمانیازیس حتی هنگام درمان دارویی نیز دارد و احتمالاً بدون فعال شدن سیستم ایمنی، درمان دارویی تاثیر چندانی ندارد. این موضوع در مطالعات اخیر با بررسی فعالیت محور $IFN-\gamma$ و $IL-12$ در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و یا افرادی که به داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت می کنند که دارای حساسیت

بیشتری نسبت به عفونت های لیشمانیایی می باشند، به اثبات رسیده است زیرا در این بیماران، سایتوکاین های $IL-12$ ، $IFN-\gamma$ به شدت کاهش و سایتوکاین های پاسخ های Th_2 مانند $IL-5$ ، $IL-4$ و $TGF-\beta$ افزایش می یابد(۱۶). این موضوع نشان می دهد که علی رغم ظهور علائم بالینی بیماری که به صورت زخم جلدی ظهور می یابد، نوع تعامل انگل با سیستم ایمنی همواره به صورت سیستمیک بوده و تنها به واکنش های موضعی بافتی محدود نمی گردد. لذا مطالعات بیشتر در مورد الگوی بیان سایتوکاین ها به خصوص در بیماران لیشمانیوز مبتلا به نقص یا سرکوب سیستم ایمنی می تواند در جهت یافتن روش های درمانی مطمئن تر، راهگشا باشد(۱۶). در لیشمانیوزیس جلدی و احشایی با حضور و یا عدم سایتوکین های نظارتی ($IL-10$ ، $IL-27$ و $TGF-\beta$) و سایتوکین های آنتاگونیست ($TNF-\alpha$ و α -اینترفرون گاما γ)، پاسخ سلولی توسط سلول های تک هسته ای خون محیطی کاملاً فعال می باشد(۱۷). از آن جا که لیشمانیازیس یک بیماری مزمن می باشد، با تخریب گسترده بافتی همراه است. سیر تغییرات سایتوکاینی در لیشمانیا از مرحله ابتدایی تا بهبود متفاوت است. با توجه به روند بیان ژن در لیشمانیوز می توان ادعا نمود که انگل در تعامل با سیستم ایمنی موجب کاهش شدید در بیان سایتوکاین های پیش التهابی می گردد و سایتوکاین های $IFN-\gamma$ ، $IL-12$ و $TNF-\alpha$ از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار در پاسخ ایمنی هستند، به طوری که کاهش بیان این ژن ها باعث ایجاد زخم های وخیم می شود. در این راستا مطالعه سایتوکاین های تولید شده در سیستم ایمنی در بافت های مختلف و بیماران متفاوت و نیز بررسی نحوه سرکوب سیستم ایمنی توسط انگل لیشمانیا و فعالیت مجدد این هنگام درمان با داروی گلوکانتیم و چگونگی تعامل متفاوت سیستم ایمنی با انگل در زخم و طحال می تواند در روشن شدن بسیاری از نقاط مبهم در این بیماری موثر باشد(۱۷-۱۵).

References

1. Rezvan H, Mafi M. An overview on Leishmania vaccines a narrative review article. *Vet Res Forum* 2015;6:1-7.
2. Akbari M, Honma K, Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Matsuyama T, et al. IRF4 in dendritic cells inhibits IL-12 production and controls Th1 immune responses against Leishmania major. *J Immunol* 2014;192:2271-9. Doi: 10.4049/jimmunol.1301914. Epub 2014 Jan 31.
3. Carvalho AM, Cristal JR, Muniz AC, Carvalho LP, Gomes R, Miranda JC, et al. Individuals naturally exposed to Lutzomyia intermedia sand flies develop an IL-10-dominant immune response and are at increased risk of developing Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis* 2015; 6:20-5.
4. Eiras DP, Kirkman LA, Murray HW. Cutaneous leishmaniasis current treatment practices in the USA for returning travelers. *Current Treat Opt Infect Dis* 2015; 7:52-62. Doi: 10.1007/s40506-015-0038-4
5. Ferrante CJ, Leiboich SJ. Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Ave Wound Care* 2012; 1:10-6. Doi: 10.1089/wound.2011.0307
6. Akhzari S, Rezvan H, Zolhavarreh M. Expression of Pro Inflammatory genes in lesions and neutrophils during leishmania major infection in balb/c Mice. *Iranian J Parasitol* 2016; 11:534-41.
7. Oryan A. Plant derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian J Vet Res* 2015;16:1-19.
8. Lapara NJ, Kelly BL. Suppression of LPS induced inflammatory responses in macrophages infected with Leishmania. *J Inflamm* 2010; 7:8. Doi: 10.1186/1476-9255-7-8.
9. Shyam S, Neetu S. Inflammatory chemokines and their receptors in human visceral leishmaniasis gene expression profile in peripheral blood splenic cellular sources and their impact on trafficking of inflammatory Cell. *Mol Immunol* 2017;85:111-9. Doi: 10.1016/j.molimm.2017.02.008. Epub 2017 Feb 20.
10. Melby PC, Andradenarvaez FJ, Darnell BJ, Valenciapacheco G, Tryon VV, Palomocetina A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994;62:837-42.
11. Oliveira WN, Ribeiro L E, Schrieffe A, Machado P, Carvalho EM, Bacella O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* 2014; 30; 66:127-33. Doi: 10.1016/j.cyto.2013.12.016. Epub 2014 Jan 30.
12. Galdino HJR, Maldaner AE, Pessoni LL, Soriani FM, Pereira LI, Pinto SA, et al. Interleukin 32 γ is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of American Tegumentary Leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor TNF and IL-10. *BMC Infect Dis* 2014; 14:249. Doi: 10.1186/1471-2334-14-249.
13. Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Cafe V, et al. Lesion size correlates with Leishmania antigen stimulated TNF levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hygiene* 2011; 85:70-3. Doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0680.
14. Bousquet E, Mura F, Villain M, Riviere S, Konate A, Schneider C. Complications infectieuses liees au traitement par anti TNF α a propos de deux cas de leishmaniose. *J Franç Ophtalmol* 2012; 35:695-9. Doi: 10.1016/j.jfo.2012.06.007. Epub 2012 Aug 24.
15. Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5 dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of Leishmania major infection favors pathogen persistence. *J Exp Med* 2006; 203:2451-60. Doi: 10.1084/jem.20060956
16. Andargie TE, Ejara ED. Pro and anti inflammatory cytokines in visceral leishmaniasis. *J Cell Sci Therap* 2015; 1:6:1.
17. Espir TT, Figueira P, Naiffmde F, Costa AG, Ramalhoortigao M, Malheiro A. The role of inflammatory anti-inflammatory and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State Brazil. *J Immunol Res* 2014; 2:1-10. Doi: 10.1155/2014/481750. Epub 2014 Sep 11.

Evaluation of Pro-Inflammatory Genes Expression in the Spleen and Wounds of BALB/c Mice Infected with *Leishmania Major*

Akhzari S¹, Rezvan H¹, Norian A^{2*}, Zolhavarieh M³, Shamsi M⁴

(Received: February 8, 2017

Accepted: May 10, 2017)

Abstract

Introduction: *Leishmania major* is a protozoan parasite, which causes cutaneous leishmaniasis. It has been shown that the immune responses induced against the parasite are associated with the host genotype. Although the characteristics of the host immune responses and prevention of the disease through the vaccine have been discussed in many studies, far less attention is paid to the ulceration and inflammatory responses mediated by the innate immune cells in cutaneous leishmaniasis. The main objective of this study was to investigate the expression pattern of pro-inflammatory genes in different stages of cutaneous leishmaniasis progression in order to provide a standard framework for diagnosis of various stages of the disease.

Materials & Methods: In this study, 1×10^7 *Leishmania major* promastigotes were

intradermally injected for the two groups of BALB/c mice on the base of the tail, then the expression of IL-12p35, CCL3, CCL4, IL-12p40, TNF- α , CCL5, IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ and CCR5 cytokines were examined in the wound and spleen weekly.

Findings: The results showed that *Leishmania* clearly suppressed the expression of pro-inflammatory genes in the wound and spleens of the infected mice treated with PBS but not Glucantime.

Discussion & Conclusion: IFN- γ , IL-12, TNF- α were postulated to be important factors in immunity against *Leishmania* as their reduction resulted in progressed lesions in the infected mice.

Keywords: leishmaniasis, wound, spleen, pro-inflammatory genes, BALB/c mice

1. Dept of Parasitology, Faculty of Veterinary Sciences, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran

2. Dept of Pathobiology, Faculty of Veterinary Sciences, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran

3. Dept of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran

4. Zoonotic Diseases Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

* Corresponding author Email: nourian.ar@gmail.com