

بررسی اثرات سرکوب کنندگی لیشمانیا ماژور بر روی عرضه و بیان رسپتور آلفای اینترلوکین-۲ در لنفوسیت های T خون محیطی انسانی

علی خدادادی^{۱*}، علی حسین پور^۲، شهرام خادم وطن^۳، محمود راهدار^۴

(ا) گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
(ب) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۹

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز از بیماری های انگلی است که به وسیله تک یاخته ای از جنس لیشمانیا ایجاد می گردد. IL-2 مهم ترین سایتوکاینی است که باعث پیشبرد لنفوسیت های T از فاز G1 به S و انتقال به فاز رشد سلولی می شود. منبع تولید IL-2 سلول های CD4+T می باشد IL-2 بعد از ترشح بر روی سلول های T و B و مونوسیت ها و سلول های NK تاثیر نموده و باعث فعال شدن آن ها می گردد. در این مطالعه توانایی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در سرکوب و مهار رسپتور آلفای اینترلوکین-۲ (IL-2R α) در لنفوسیت های T و در نتیجه مهار سیستم ایمنی با استفاده از کشت سلول های T خون محیطی انسان فعال شده با فیتوهماگلوتینین در شرایط برون تنی (In Vitro) در حضور و عدم حضور انگل و ارزیابی نتایج حاصل از فلوسایتومتری در آن ها، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: سویه استاندارد لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/EK) در محیط NNN کشت داده شده و سپس در محیط RPMI به کشت انبوه رسیده است. لنفوسیت های T خون محیطی انسانی در محیط RPMI کشت داده شد. از لنفوسیت های T تحریک شده با فیتوهماگلوتینین (PHA) در حضور و یا عدم حضور پروماستیگوت های انگل، بعد از سپری شدن زمان های انکوباسیون مشخص (۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) نمونه برداری شده و بعد از رنگ آمیزی، به وسیله فلوسایتومتری آنالیز گردیده است. نتایج به دست آمده از فلوسایتومتری با استفاده از نرم افزار WIN MDI و محاسبات آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته های پژوهش: نتایج به دست آمده نشان داده که لیشمانیا ماژور عرضه و بیان IL-2R α در لنفوسیت های T و نیز لنفوپرولیفراسیون را مهار و سرکوب می نماید که اولین نشانه های مهارتی انگل ۶ ساعت بعد از تحریک لنفوسیت ها دیده شده و افزایش تعداد پروماستیگوت های انگل در هر میلی لیتر از محیط کشت باعث تشدید سرکوب های ایجاد شده می گردد.

بحث و نتیجه گیری: از نتایج به دست آمده استنباط می گردد که لیشمانیا ماژور به عنوان سرکوب کننده و مهار کننده سیستم ایمنی و پاسخ های ایمنی بدن مطرح اند بنا بر این بیماران مبتلایان به بیماری لیشمانیوزیس شدیداً در معرض عفونت های ثانویه ویروسی و باکتریایی و... می باشند.

واژه های کلیدی: لیشمانیا ماژور، فیتوهماگلوتینین، IL-2R α ، لنفوپرولیفراسیون

* نویسنده مسئول: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

مقدمه

لیشمانیوز از بیماری‌های انگلی است که به وسیله تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌گردد. سه نوع اصلی این بیماری شامل لیشمانیوز جلدی، احشایی و جلدی-مخاطی بوده که در نقاط مختلف جهان دیده می‌شود. لیشمانیوز جلدی و احشایی به صورت آندمیک در قسمت‌های مختلف ایران دیده می‌شود (۱،۲). سالانه ۱-۱/۵ میلیون نفر به لیشمانیوز جلدی مبتلا می‌شوند که از این تعداد ۹۰ درصد موارد در کشورهای افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، عربستان سعودی، پرو و سوریه اتفاق می‌افتد (۳-۵). استان‌های فارس، اصفهان، خوزستان، یزد و خراسان از کانون‌های مهم لیشمانیوز جلدی محسوب می‌شوند (۳،۵). عامل مولد لیشمانیوز جلدی در ایران لیشمانیا ماژور که مولد فرم روستایی یا مرطوب بیماری و لیشمانیا تروپیکا که مولد فرم خشک یا شهری بیماری می‌باشد (۳،۴). علایم بالینی لیشمانیوز جلدی بسته به گونه و سوش ایجاد کننده انگل متفاوت بوده که از یک زخم کوچک پاپولی فاقد ترشحات تا فرم‌های با زخم‌های وسیع، بادسرخ‌ی و فرم‌های مزمن لوپوئید یا توبرکلوئید متغیر می‌باشد. تفاوت در فرم ضایعات ناشی از تفاوت در گونه انگل، و بیروانس متفاوت آن‌ها و پاسخ‌های میزبان در مقابل انگل می‌باشد (۱،۲،۳).

IL-2 مهم‌ترین سایتوکاینی است که باعث پیشبرد لنفوسیت‌های T از فاز G1 به S و انتقال به فاز رشد سلولی می‌شود IL-2 ترشحی گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۱۴ تا ۱۷ کیلودالتون بوده که از ۱۳۳ اسیدآمینه تشکیل شده است این سایتوکاین توسط سلول‌های فعال شده نه در حال استراحت تولید می‌شود. مهم‌ترین منبع تولید این فرآورده سلول‌های CD4+T می‌باشد. IL-2 بعد از ترشح بر روی سلول‌های T و B و مونوسیت‌ها و سلول‌های NK تاثیر نموده و باعث فعال شدن آن‌ها می‌گردد تاثیر IL-2 بر روی سلول‌های هدف از طریق گیرنده‌های اختصاصی صورت می‌گیرد و این گیرنده‌ها در سطح سلول‌های T فعال شده یافت می‌شوند (۶،۷).

گیرنده IL-2 شامل سه پلی‌پپتید داخل‌غشایی مجزا به نام‌های آلفا، بتا و گاما می‌باشند زنجیره آلفای

رسپتور IL-2 (IL-2R α) که به آن آنتی ژن TAC یا CD25 و یا P55 هم می‌گویند تنها با افینیتی متوسط به IL-2 باند می‌شود و هیچ سیگنال یا پیامی ترجمه نمی‌شود زنجیره بتای IL-2R نیز با افینیتی متوسط به IL-2 متصل می‌شود و زنجیره گاما به تنهایی نمی‌تواند به IL-2 متصل گردد کمپلکس هتروداپمر که از سه زنجیره آلفا، بتا و گاما تشکیل شده با افینیتی بالایی به IL-2 متصل می‌گردد و در نتیجه ترجمه سیگنال و فعال‌سازی و در نهایت پرولیفراسیون لنفوسیت‌های T صورت می‌گیرد (۶-۹).

در این مطالعه توانایی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در سرکوب و مهار رسپتور آلفای اینترلوکین-۲ (IL-2R α) در لنفوسیت‌های T و در نتیجه مهار سیستم ایمنی با استفاده از کشت سلول‌های T خون محیطی انسان در حضور و عدم حضور انگل و ارزیابی نتایج حاصل از فلوسایتومتری در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت و انبوه‌سازی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور: سویه استاندارد لیشمانیا ماژور با کد اختصاصی MRHO/IR/75/EK از گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و در محیط دی‌فازیک Nicol Mac Nal Neavy (NNN) در لوله‌های کشت در بسته و در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد و PH حدود ۵/۵-۵ به مدت ۴-۷ روز کشت داده شده است مایع رویی کشت که حاوی پروماستیگوت‌های انگل است بعد از مدت مورد نظر برداشته شده و به محیط کشت مایع RPMI-1640 حاوی ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ μ g/ml استرپتومایسین و ۱۰ درصد FCS غیر فعال شده با حرارت (20 min, 56°C) انتقال داده شده تا پروماستیگوت‌ها در این محیط به کشت انبوه برسند سپس تعداد انگل‌های موجود در هر میلی‌لیتر از محیط کشت به طور مرتب با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام هماتوسیومتر شمارش شده است (۱۰-۱۲).

کشت و جداسازی لنفوسیت‌های T خون محیطی انسان: سلول‌های لنفوسیت حاصل از ۱۰ سی‌سی از خون محیطی هپارینه فرد داوطلب گرفته با استفاده از

آماده سازی نمونه و آنالیز با فلوسایتومتری: در نهایت بعد از طی دوره های انکوباسیون ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعته و تحریک لنفوسیت ها و هم چنین اضافه کردن پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور، از کشت های سلولی مورد نظر به طور جداگانه نمونه برداری کرد. که عرضه و بیان IL-2R توسط لنفوسیت های T بعد از رنگ آمیزی نمونه های سلولی با آنتی بادی منوکلونال Anti-TAC کونژوگه با ایزوتیوسیانات و نیز با آنتی بادی منوکلونال ANTI-CD4 کونژوگه با فیکواریترین به ترتیب آنتی بادی های اختصاصی برای اپی توپ زنجیره P55 (تحت واحد آلفای رسپتور اینترلوکین-۲) و مارکر CD4 روی لنفوسیت های T و مقایسه آن با نمونه کنترل منفی (که دارای آنتی بادی منوکلونال غیراختصاصی و غیروابسته به آن ها) می باشد مشخص و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری پارتک ساخت کشور آلمان و با کمک نرم افزار 2.8 Windows Multiple Document) WIN MDI (Interface Software) و آمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند

یافته های پژوهش

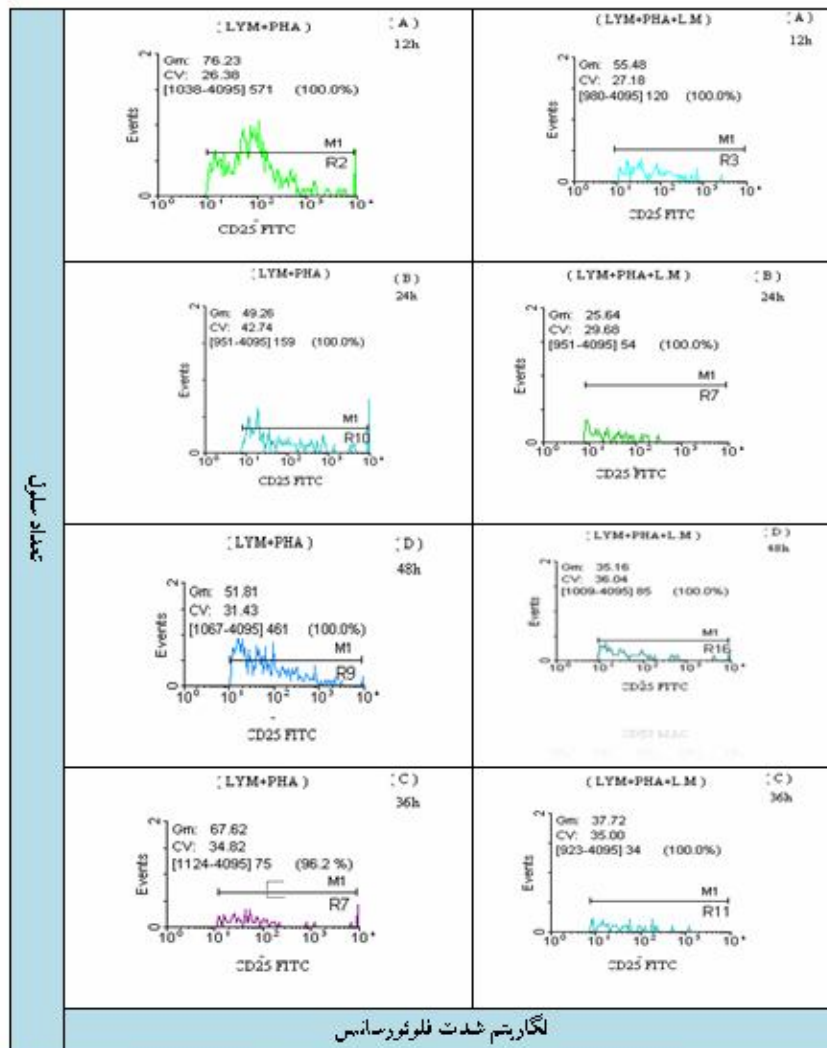
نقش و تاثیر دوره های مختلف انکوباسیون در فعالیت مھاری لیشمانیا ماژور روی عرضه و بیان IL-2R α در لنفوسیت های T تحریک شده با فیتوهمگلوتینین (PHA): در شکل شماره ۱ نمودار هیستوگرام چهار نمونه تحریک شده با فیتوهمگلوتینین (T Cells $1/25 \times 10^6/ml$) که تعداد 5×10^6 عدد پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در هر میلی لیتر به آن ها اضافه شده است و هم چنین فرم فقط تحریک شده این نمونه ها (لنفوسیت+محرک) در پانل های A، B، C و D به ترتیب بعد از طی دوره های انکوباسیون ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعته نشان داده شده است و در جدول شماره ۱ میانگین درصد لنفوسیت های حاوی رسپتور IL-2 (IL-2R+Cells) و نیز درصد سرکوب در نمونه های بررسی شده نشان داده شده است، که با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

فایکول (Ficoll-Hypaque) با چگالی اختصاصی ۱/۰۷۷ در دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوز جدا گردید سپس مقدار ۱۰ سی سی محلول PBS یا RPMI به آن اضافه گردید و در دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوز شده و مایع رویی آن دور ریخته می شود و در دفعه دوم در دور ۲۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوز شده و مایع رویی آن دور ریخته شده و رسوب آن در محیط کشت سلولی مخصوصی کشت داده می شود. رسوب حاصل از هر لوله فالكون با مقدار ۱۰ سی سی از محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین، ۱۰۰ $\mu g/ml$ استرپتومایسین، 2ME 50 و 0.25 $\mu g/ml$ فونزیزون و $2 \mu l/ml$ (۲-مرکاپتواتانل) و ۱۰ درصد FCS مخلوط شده و در فلاسک های مخصوصی کشت داده می شود. توانایی زنده بودن سلول ها (cell viability) به وسیله رنگ تریپان بلو مشخص می گردد که رنگ مورد نظر وارد سلول های زنده نمی شود اگر تهیه سلول ها به دقت صورت گرفته باشد معمولاً بیش از ۹۹ درصد آن ها با تریپان بلو رنگ نمی گیرند. (۱۵-۱۲) آزمایش پرولیفراسیون لنفوسیت ها: در آزمایش پرولیفراسیون که هدف از آن تحریک و فعال سازی لنفوسیت ها می باشد لنفوسیت ها در حضور و در تماس نزدیک پروماستیگوت انگل و هم چنین محرک یا میتوزن قرار می گیرند تعداد سلول های h PBMC (سلول های منونوکلئر یا لنفوسیت های خون محیطی انسان) در هر میلی لیتر از محیط کشت به وسیله لام هماتوسیتومتر شمارش می گردد و در نهایت تعداد $1/25 \times 10^6$ عدد سلول در هر میلی لیتر از محیط RPMI-1640 حاوی پنی سیلین، استرپتومایسین و نیز ۱۰ درصد سرم جنین گوساله غیرفعال شده با گرما و در حضور ۵ درصد CO_2 و درجه حرارت $37^\circ C$ در مدت زمان های انکوباسیون ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعته در حضور و یا عدم حضور پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور ($1/5 \times 10^6$ ، $1/5 \times 10^6$ ، $1/5 \times 10^6$) و هم چنین در حضور فیتوهمگلوتینین ($30-50 \mu g/ml$) بهارافشان) به عنوان محرک یا میتوزن قرار می گیرد. (۱۲، ۱۳، ۱۴)

IL-2 (2R+Cells) و نیز کاهش تراکم و چگالی سطحی IL-2 در همین سلول ها می باشد ثانیاً علایم و اثرات ممانعتی و سرکوب کنندگی انگل بعد از ۶ ساعت انکوباسیون شروع شده و ۲۴ تا ۳۶ ساعت بعد از انکوباسیون به بیشترین حد خود رسیده و به تدریج بعد از این مدت از میزان آن کاسته شده است ثالثاً وقتی که برداشت انگل ها در فاز لگاریتمی منحنی رشد آن ها صورت گیرد به نظر می رسد که شدت و سرعت آن ها در مکانیسم های ممانعتی و سرکوب کنندگی نسبت به نمونه هایی که از فازهای دیگر منحنی رشد انگل ها برداشت شده بیشتر است.

٪(سلول+محرک)/۱۰۰×(مقدار حاصل)=
 ٪(سلول+محرک+انگل)-
 ٪(سلول+محرک)=درصد سرکوب
 درصد سرکوب در پانل های A، B، C و D به ترتیب ۲۷/۲۲ درصد، ۴۷/۹۵ درصد، ۴۴/۲۲ درصد و ۱۶/۶۵ درصد می باشد. اختلاف میانگین های نتایج حاصل از سه بار آزمایش با استفاده از ANOVA TEST (P<0.05) معنی دار بوده است. نتایج حاصل از این مطالعه و بررسی ها نشان می دهد که اولاً کاهش و تعدیل در هر یک از نمونه ها نشانگر عمل و اثر ممانعتی و سرکوب کنندگی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به صورت کاهش در درصد سلول های دارای رسپتور

شکل شماره ۱. نقش و تاثیر دوره های انکوباسیون در فعالیت مهار کنندگی L.major بر عرضه IL-2Rα در لنفوسیت های T تحریک شده با فیتوهماگلوتینین (PHA)



لگاریتم شدت فلوروسانس

بالا به ترتیب نمودارهای هیستوگرام نمونه های استفاده شده در زمان های مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) را نشان می دهد که هر پانل حاوی دو نمودار هیستوگرام از دو نمونه به ترتیب فقط تحریک شده و تحریک شده به علاوه انگل می باشد. در قسمت بعد (جدول شماره ۱) میانگین درصد سلول های حاوی رسپتور اینترلوکین-۲ (IL-2R+) و درصد سرکوب را نشان می دهد. شدت فلئورسانس نشانگر چگالی سطحی IL-2R می باشد

جدول شماره ۱. نقش و تاثیر دوره های انکوباسیون در فعالیت مهارکنندگی L.major بر روی عرضه IL-2R α در لنفوسیت های T تحریک شده با فیتوهماگلوآنتیجین (PHA)

(IL-2R+ CELLS)				
(T cells=2/5×10 ⁶ N/ml, L.major =5×10 ⁶ N/ml)				
پانل	زمان انکوباسیون (h)	لنفوسیت+محرک	لنفوسیت+محرک+انگل	سرکوب (%)
A	۱۲	۷۶/۲۳	۵۵/۴۸	۲۷/۲۲
B	۲۴	۴۹/۲۶	۲۵/۶۴	۴۷/۹۵
C	۳۶	۶۷/۶۲	۳۷/۷۲	۴۴/۲۲
D	۴۸	۵۱/۸۱	۳۵/۱۶	۱۶/۶۵

با استفاده از فلوسایتمتری مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفته اند.

در شکل شماره ۲ نمودارهای هیستوگرام چهار نمونه (۱/۲۵×۱۰^۶ cell/ml) تحریک شده با فیتوهماگلوآنتیجین نشان داده شده است که به نمونه (A، B، C) به ترتیب ۲/۵×۱۰^۶، ۵×۱۰^۶ و ۷/۵×۱۰^۶ عدد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در هر میلی لیتر اضافه شده (نمونه D فقط تحریک شده) و بعد از طی ۲۴ ساعت انکوباسیون مورد ارزیابی قرار گرفته اند. و در جدول شماره ۲ میانگین درصد سلول های دارای رسپتور اینترلوکین-۲ (IL-2R+ CELLS) و نیز درصد مهار و سرکوب ناشی از انگل نشان داده شده است.

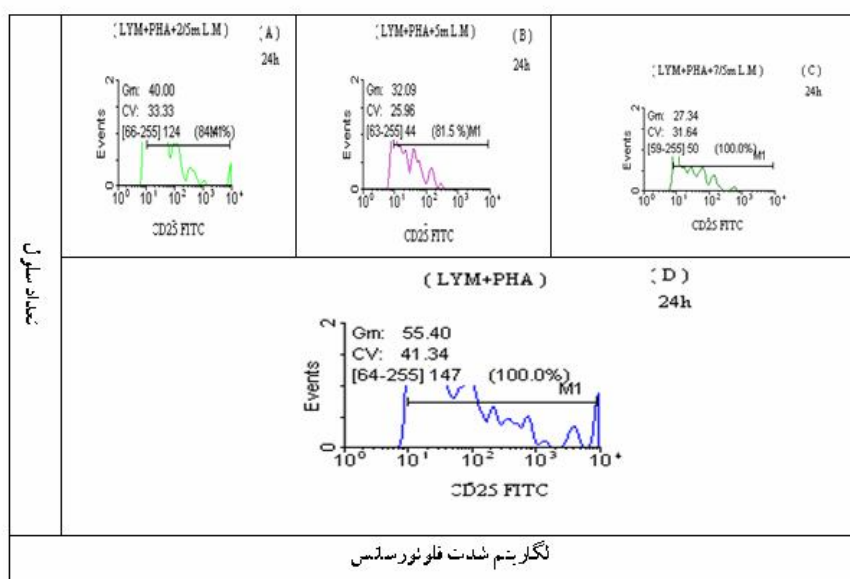
در پانل های A، B و C نقش مهار و سرکوب کنندگی رقت های مختلف انگل به وضوح نشان داده شده است بدین صورت که هرچه رقت پروماستیگوت های انگل در هر میلی لیتر از محیط کشت سلولی بیشتر بوده درصد سرکوب انگل نیز افزایش پیدا کرده از درصد سلول های IL-2R+

از لنفوسیت های تحریک شده با فیتوهماگلوآنتیجین در محیط کشت در زمان های مشخصی (انکوباسیون) نمونه برداری شده و بعد از رنگ آمیزی با آنتی بادی مونوکلونال Anti-CD25 (Anti-TAC) کونزوگه شده با فلئورسین (ایزوتیوسیانات) به وسیله دستگاه فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفتند. لنفوسیت ها و پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به ترتیب با ۱/۲۵×۱۰^۶ و ۵×۱۰^۶ عدد در هر میلی لیتر از محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. پانل های

قدرت سرکوب کنندگی رقت های مختلف L.major در عرضه و بیان رسپتور IL-2R α لنفوسیت های T تحریک شده با فیتوهماگلوآنتیجین (PHA): لنفوسیت های خون محیطی انسان بعد از کشت در شرایط In vitro تحت تاثیر محرک یا میتوزن فیتوهماگلوآنتیجین و نیز رقت های مختلف پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور قرار گرفته اند. بدین صورت که از سلول های کشت داده شده نمونه هایی تهیه شده که هر میلی لیتر از آن حاوی ۱/۲۵×۱۰^۶ عدد لنفوسیت بوده است و در حضور ماده محرک و میتوزن فیتوهماگلوآنتیجین (۳۰-۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) تحت تاثیر رقت های مختلف پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (۲/۵×۱۰^۶، ۵×۱۰^۶ و ۷/۵×۱۰^۶ در هر میلی لیتر) قرار داده و بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت انکوباسیون و رنگ آمیزی با آنتی بادی مونوکلونال (Anti-CD25 Anti-TAC) کونزوگه با فلئورسین (ایزوتیوسیانات)

درصد سرکوب در نمونه های پانل A، B و C به ترتیب ۲۶/۴۷ درصد، ۴۲/۰۸ درصد و ۵۰/۶۵ درصد می باشد که بیشترین کاهش و سرکوب مربوط به بالاترین رقت پروماستیگوت انگل است. اختلاف میانگین های به دست آمده از نتایج سه بار آزمایش متوالی با استفاده از آزمون Repeat t test ($P < 0.05$) معنی دار بوده است.

کاسته شده است. بنا بر این هرچه بر تعداد پروماستیگوت های انگل در هر میلی لیتر از کشت سلولی لنفوسیت های T افزوده شود از کارایی این سلول ها به خصوص در تکثیر، پرولیفراسیون و عرضه و بیان رسپتور های سطحی از جمله رسپتور IL-2 کاسته می شود.



شکل شماره ۲. نمایش اثرات سرکوب کنندگی رقت های مختلف *L. major* در عرضه و بیان IL-2R α به وسیله لنفوسیت های T تحریک شده با فیتوهاگلوترینین

با فلوسایتمتری آنالیز می گردد. این نتایج مربوط به چهار نمونه مختلف تحریک شده است که سه نمونه اول تحت تاثیر رقت های مختلف و مشخص انگل قرار گرفته است. (جدول شماره ۲) درصد سرکوب و نیز میانگین درصد سلول های دارای رسپتور آلفای اینترلوکین-۲ (IL-2R+ cells) را نشان می دهد.

از لنفوسیت های کشت داده شده و تحریک شده با محرک فیتوهاگلوترینین در غیاب یا حضور رقت های مشخص شده پروماستیگوت لیشمانیا ماژور بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون نمونه برداری شده و بعد از رنگ آمیزی با آنتی بادی های منوکلونال تحت واحد آلفای اینترلوکین-۲ (anti-Tac) یا anti-CD25 کونژوگه با فلوروسین (ایزوتیوسیانات)

جدول شماره ۲. درصد مهار و سرکوب IL-2R α در لنفوسیت های T به وسیله رقت های مختلف انگل لیشمانیا ماژور

(IL-2R+ CELLS) (T CELLS=2/5×10 ⁶ N/ML, L.M=5×10 ⁶ N/ML)				
پانل	تعداد پروماستیگوت انگل(N/ML)	لنفوسیت+محرک	لنفوسیت+محرک+انگل	سرکوب(%)
A	۱۰۶×۲/۵	۵۵/۴۰	۴۰/۰۰	۲۶/۴۷
B	۵×۱۰۶	۵۵/۴۰	۳۲/۰۹	۴۲/۰۸
C	۱۰۶×۷/۵	۵۵/۴۰	۲۷/۳۴	۵۰/۶۵

بحث و نتیجه گیری

پس از فعال شدن سلول های T مبتدی و اجرایی، بروز گیرنده های IL-2 فعال القاء می گردد و سلول های T تنظیمی نیز اغلب این گیرنده را بارز می سازد این گیرنده متشکل از سه جزء پروتئینی به نام های آلفا، بتا و گاما می باشد به تحت واحد آلفای اینترلوکین-۲، آنتی ژن TAC و نیز CD25 هم می گویند. پس از فعال شدن سلول های T مبتدی، سلول های خاطره ای IL-2R α بارز می گردد و مجموعه های IL-2R $\alpha\beta\gamma$ را شکل می دهند که می توانند به طور محکم به IL-2 متصل گردند یک سری از عوامل بیماری زا و انگل ها از جمله انگل های لیشمانیا از عرضه و بیان تحت واحد آلفا یا CD25 ممانعت می نمایند در نتیجه کمپلکس هتروترایمر رسپتور IL-2 که از به هم پیوستن تحت واحدهای رسپتور حاصل می گردند تشکیل نمی شود و در نهایت ترشح و تولید IL-2 به وسیله عامل بیماری زا از جمله لیشمانیا سرکوب و مهار می گردد. از طرف دیگر چون IL-2 برای بقاء و عملکرد سلول های T تنظیمی ضروری است و این سلول ها موجب مهار پاسخ های ایمنی در مقابل آنتی ژن های خودی و دیگر آنتی ژن ها می شوند اختلال و آسیب در تولید IL-2 می تواند باعث ایجاد خودایمنی و نقص عملکرد سلول های T تنظیمی گردد.(۱۱،۱۲)

موش های BALB/C که از نظر ژنتیکی در برابر بیماری لیشمانیوز حساس اند در اثر آلودگی با لیشمانا ماژور تولید و ترشح IL-2 از ماکروفاژهای این موش ها کاهش و مهار می گردد چون انگل های لیشمانیا اینترلوکین-۲ و رسپتور آن را روی

سلول های ترشح کننده مهار می نماید و باعث تعدیل و تضعیف پاسخ های ایمنی گردد.(۱۳) در این مطالعه که از سیستم کشت IN VITRO استفاده شده ظرفیت و توانایی لنفوسیت های خون محیطی انسانی فعال شده با فیتوهماگلوپتینین در عرضه و بیان رسپتورهای IL-2 و پرولیفراسیون لنفوسیت ها در اثر حضور انگل های لیشمانیا ماژور که به عنوان عامل اتیولوژیک بیماری لیشمانیوز جلدی مطرح است مورد بررسی قرار گرفته است. لنفوسیت های کشت داده شده بعد از تحریک با ماده محرک فیتوهماگلوپتینین با پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور آلوده شده و میزان عرضه و بیان رسپتورهای IL-2 بعد از سپری شدن زمان های انکوباسیون به وسیله فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفته است و توانایی انگل در سرکوب تولید IL-2 و رسپتورهای آن در محیط کشت in vitro مورد آزمایش قرار گرفته است. نتایج حاصل نشان می دهد که اولین سرکوب های مشخص توسط انگل بعد از انکوباسیون ۶ ساعتی کشت قابل مشاهده است که اثر تعدیل کنندگی و مهارتی انگل هم در تعداد سلول های IL-2R+ (یعنی سلول هایی که دارای رسپتور اینترلوکین-۲ هستند) و هم در تراکم و چگالی سطحی IL-2R به وضوح بعد از آنالیز با فلوسایتومتری قابل مشاهده و تشخیص است.

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می دهد که اثرات سرکوب کنندگی انگل لیشمانیا ماژور روی لنفوسیت های انسانی فعال شده انتخابی است و انگل عرضه و بیان IL-2R را در سطح لنفوسیت ها تحت تاثیر و تغییر قرار می دهد. بر اساس این بررسی ها زودترین و نزدیک ترین تظاهرات در سرکوب

لنفوسیت های فعال شده به وسیله انگل در مدت ۶ ساعت بعد از فعال سازی لنفوسیت ها مشخص شد این یافته ها و نیز زمان وقوع آن ها توانایی انگل را در تاثیر بر حوادث اولیه هنگام فعال سازی لنفوسیت ها آشکار می سازد این تغییرات اولیه که به وسیله انگل القاء می گردد از پرولیفراسیون لنفوسیت ها ممانعت نموده و در عرضه آنتی ژن های سطحی نیز آسیب و اختلال ایجاد می نماید. (۱۳،۱۴)

چون IL-2 بقاء تکثیر و تمایز سلول های T فعال شده با آنتی ژن را تحریک می نماید و سبب پیشبرد چرخه سلولی می شود و نیز باعث افزایش تولید سایتوکاین های اجرایی دیگر نظیر IFN- γ و IL-4 توسط سلول های T می شود بنا بر این مهار و سرکوب ترشح IL-2 توسط انگل لیشمانیا که متعاقب مهار رسپتورهای آن صورت می گیرد از تکثیر و تمایز سلول های T و نیز تولید سایتوکاین های اجرایی آن از جمله IFN- γ و IL-4 کاسته شده و در نتیجه سلول های دفاعی به خوبی نمی توانند در برابر پاتوژن ها مخصوصاً عوامل بیماری زای داخل سلولی از جمله انگل ها مقاومت نمایند در نتیجه سیستم ایمنی بدن سرکوب می گردد. (۱۵،۱۶)

از طرف دیگر از آن جا که IL-2 سبب پیشبرد تکثیر و تمایز سلول های NK شده و نیز باعث تحریک رشد و عملکرد سلول کشی در آن ها می شود تعدیل و مهار آن به وسیله انگل لیشمانیا باعث کاهش فعالیت سلول های NK می گردد که در نهایت سلول های کشنده طبیعی به راحتی قادر به از بین بردن پاتوژن های داخل سلولی و ویروس ها نخواهد بود در نتیجه سیستم دفاعی بدن نمی تواند در مقابل انگل ها و یا سایر عوامل بیماری زا به خوبی ایفاء نقش نماید. بنا بر این به نظر می رسد افرادی که به تک یاخته های داخل سلولی از جمله لیشمانیا ها آلوده می گردند به علت تعدیل پاسخ های ایمنی توسط این انگل ها در برابر سایر بیماری ها و عوامل پاتوژن حساس و آسیب پذیر می گردند. (۱۷،۱۸)

از آن جا که در این مطالعه از رقت های مختلف انگل لیشمانیا استفاده شده و تعداد لنفوسیت ها $1/25 \times 10^6$ عدد در هر میلی لیتر از محیط کشت

تحریک شده بوده نتایج و بررسی های نهایی نشان می داد که هر اندازه تعداد پروماستیگوت های مورد استفاده در هر میلی لیتر از محیط کشت سلولی افزایش پیدا می کرد میزان و درصد سرکوب یا مهار IL-2 و سلول های T CD4 بیشتر می شد. و از طرف دیگر هر چه زمان انکوباسیون بعد از تحریک لنفوسیت ها افزایش داده شود اثرات مهارکنندگی انگل تقویت می گردد البته بر قدرت سرکوب کنندگی انگل از ۶ تا ۲۴ ساعت افزوده شده ولی بعد از ۲۴ ساعت به تدریج از آن کاسته می شود به طوری که از نتایج به دست آمده مشخص شده درصد سرکوب بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون کمتر از ۲۴ ساعت انکوباسیون بوده است که احتمالاً علت آن مربوط به این نکته است که بعد از ۲۴ ساعت از آنتی ژن های انگلی موجود در محیط کشت و هم چنین مواد غذایی موجود کاسته شده و از طرف دیگر بر مواد زاید و سمی افزوده می شود که در نتیجه انگل ها قدرت و کارایی اولیه را نخواهند داشت. از طرف دیگر از آن جا که در این بررسی و مطالعه از دو گروه سلول یعنی گروه اول تنها لنفوسیت ها و گروه دوم لنفوسیت ها به علاوه منوسیت ها هنگام تحریک و اضافه نمودن انگل مورد استفاده قرار گرفته است بنا بر این نتایج حاصل و مقایسه این دو نمونه سلولی نشان می دهد که قدرت سرکوب کنندگی و مهارتی انگل اکثراً در نمونه های سلولی دوم که شامل هم لنفوسیت ها و هم منوسیت ها (مخلوطی از دو نوع سلول) کمتر از نمونه سلولی اول که فقط از لنفوسیت ها تشکیل شده است می باشد در نمونه های سلولی دوم کم بودن درصد سرکوب انگل لیشمانیا احتمالاً مربوط به مواد ترشچی و قدرت ضد انگلی ماکروفاژها مربوط می گردد و از طرف دیگر ماکروفاژها چون در ترشح IL-2 با لنفوسیت های T همکاری می نمایند و باعث فعال شدن این سلول ها می گردند.

از نتایج به دست آمده در این مطالعه و بررسی های دیگر که تا به حال صورت گرفته استنباط می گردد که اکثر گونه های لیشمانیا از جمله لیشمانیا ماژور به عنوان سرکوب کننده و مهارکننده سیستم ایمنی و پاسخ های ایمنی بدن مطرح اند بنا بر این بیماران

دفاعی ضعیفی داشته باشند(کورتون درمانی، آلودگی به HIV و...) در تهدید جدی قرار می گیرند.

مبتلایان به بیماری لیشمانیوزیس شدیداً در معرض عفونت های ثانویه ویروسی و باکتریایی و... می باشند به ویژه اگر قبلاً این افراد سیستم

References

- 1-Kane MM, Mosser DM. Leishmania parasites and their ploys to disropt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* 2000;7:26-31.
- 2-Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell: Complexities and alternative views. *Parasitol Today* 2000;16:292-7.
- 3-Warburg A, Schlein Y. The effect of post-blood meal nutrition of phlebotomus papatasi on the transmission of Leishmania major. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:926-30.
- 4-Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of Leishmania Mexicana
- 5-Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:230-50.
- 6-Smith KA. Interleukin-2: a 10-year perspective. In: Smith KA, editor. *Interleukin-2*. New York: Academic press; 1988. P.1-35.
- 7-Abbas Abul K. Lichman. *Cellular and molecular immunology*. New York: Academic press; 2010.
- 8-Fredrick P, Michael D, Sandesh S, Richard M. Production of interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4, and interleukin-10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis 1991;88:7011-5.
- 9-Fredrick P, Ronald M, Andera M. Increased Capacity for Interleukin-2 Synthesis Parallels Disease Progression in mice Infected with Leishmania major. *Am Soc Microbiol* 1998;9:4537-40.
- 10-Felipe K, Manuel F, Marcelo B. The Trypanosoma cruzi membrane glycoprotein AGC10 inhibites human lymphocyte activation by a mechanism preceding translation of both, IL-2 and its high-affinity receptor subunits. *Mol Biochem Parasitol* 2002;125:91-101.
- 11-Kierszenbaum F, Cuna WR, Beltz LA, Sztejn MB. Trypanosoma Cruzi reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the P55 and P70 receptor components. *J Immunol* 1989; 143:275-83.
- 12-Beltz LA, Sztejn MB, Kierszenbaum F. Novel mechanism for Trypanosoma Cruzi-induced Suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 receptor expression. *J Immunol* 1988;141:289-94.
- 13-Kierszenbaum F, Cuna WR, Beltz LA, Sztejn MB. Trypanosomal immune suppressive factor: A secretion product(s) of T.Cruzi that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1990;144:4000-8.
- 14-Turkan A, Mirshahidi S, Piskin AK, Citak B, Imir T. Effects of crude antigenic fractions of Leishmania major on natural killer cell cytotoxicity, interferon-r and IL-4 secretion from peripheric blood lymphocytes of unexposed individuals. *Immunol Lett* 1997;115-8.
- 15-Bates PA, Gottlieb M, Dwyer DM. Leishmania donovani: identification of glycol-proteins released by promastigotes during growth in vitro. *Exp Parasitol* 1988;67:199-209.
- 16-Smith KA. Interleukin-2: a 10-year perspective. In *interleukin-2*. Academic press: New York; 1988.P.1-35.
- 17-Fernandez-Botran R, Chilton PM, Ma Y. soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation disease and therapy. *Immunology* 1996;63:269-336.
- 18-Kumar A, Moreau J L, Gilbert M, Theze J. Internalization of IL-2 by high affinity IL-2 receptors is required for thje growth of IL-2 dependent T cell lines. *J Immunol* 1987;139:3680-4.



An In Vitro Study on Suppressive Effects of *Leishmania major* on IL-2R α Expression in Activated Peripheral Human T Lymphocyte

khodadadi A¹, Hosainpor A², Khdamvatan Sh², Rahdar M²

(Received: 29 May. 2012

Accepted: 24 Jan. 2013)

Abstract

Introduction: Leishmaniasis is a parasitic disease which caused by a protozoan belong to the genus, *Leishmania*. IL-2 is an important cytokine that progresses lymphocytes from G1 to S phase, leading to T cells growth and proliferation. IL-2 is produced by activated CD4⁺ T cells and stimulates T and B lymphocytes, monocytes and natural killer cells. The present study was designed to determine and define the leishmania major-induced suppression of IL-2R α expression in the peripheral human T-lymphocytes in vitro condition.

Materials & Methods: *Leishmania major* standard strain (MRHO/IR/75/EK) was cultured in the NNN medium and proliferated in RPMI medium. Human peripheral T lymphocytes were also cultured in RPMI medium. Phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes, in the present and/or absent of leishmania major promastigotes, were sampled at the incubation times, 12, 24, 36, 48h, stained with FITC-labelled anti-CD25 (IL-2R α chain MAb) and PE-labelled anti-CD4 (CD4 MAb) and then, analyzed by flowcytometry. Data were analyzed by using the WIN MDI software and statistical tests.

Findings: Results of this study showed that leishmania major suppressed the expression of IL-2R in the activated T cells and inhibited the proliferation of lymphocytes. We found the expression of IL-2R by human peripheral T Lymphocytes. These T cells that co-cultured with leishmania major and stimulated with Phytohemagglutinin, were significantly suppressed 6h after culture initiation. However, the suppressed effect was seen to be moderate. The magnitude of this effect further increased when greater numbers of promastigotes were added.

Discussion & Conclusion: Inhibition of IL-2R expression by the leishmania parasite may play a role in the suppressive effects associated with leishmaniasis disease. Molecular and biochemical characterization of the leishmania immuno suppressive factors can be useful for vaccine development and also for drug related studies.

Keywords: leishmania major, IL-2R α , phyto hemagglutinin, lymphocyte proliferation

1. Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2. Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

*(corresponding author)