

الگوی تولید سایتوکاین مواد دفعی-ترشحي پروماستيگوت انگل لشمانيا ماژور در سلول های غدد لنفاوی موش BALB/c

عباس محمودزاده پورناکی^{*}، حسینعلی مهرانی^{*}، کاظم احمدی^{**}،
شهناز شیربازو^{***}، علی فتاحی بافقی^{****}

چکیده

مقدمه: به دلیل وجود ایمنی محافظت کننده پس از بهبود از بیماری لیشمانیوز پوستی، امید به تولید واکسن محافظت کننده در این بیماری برای انسان وجود دارد. یکی از مواد پیشنهادی برای مطالعه واکسن لیشمانیا، مواد ترکیبات دفعی-ترشحي انگل است. در این تحقیق تاثیر مواد دفعی-ترشحي انگل لیشمانیا ماژور بر الگوی تولید سایتوکاین ها در سلول های غده های لنفاوی موش کوچک آمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: جهت ارزیابی پنج گروه موش BALB/c (در هر گروه ۱۲ سر) (گروه دریافت کننده آنتی ژن تام، آنتی ژن دفعی- ترشحي ۲۴ ساعته، آنتی ژن دفعی- ترشحي صفر ساعته و ادجوانت، گروه شم بدون تزریق)، تحت چالش با پروماستيگوت لیشمانیا ماژور قرار گرفتند. در ماه دوم پس از ظهور زخم لیشمانیایی، سلول های غدد لنفاوی موش های گروه های مختلف جداسازی و کشت داده شد و ۴۸ ساعت پس از چالش با مواد دفعی- ترشحي ۲۴ ساعته، پروفایل سایتوکاینی آنها مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان IL-4 و IL-10 در گروه دریافت کننده آنتی ژن تام، افزایش معنی داری در مقایسه با سایر گروه ها داشت. در صورتی که IL-2 در سلول های موش های دریافت کننده آنتی ژن ۲۴ ساعته افزایش معنی داری در مقایسه با سایر گروه نشان داد. همچنین IFN- γ در گروه دریافت کننده آنتی ژن تام و ۲۴ ساعته افزایش معنی داری داشت. TNF- α نیز در گروه آنتی ژن تام افزایش معنی دار داشت، در صورتیکه در گروه دریافت کننده آنتی ژن دفعی-ترشحي ۲۴ ساعته کاهش معنی داری نسبت به گروه های دیگر نشان داد.

نتیجه گیری: مجموعه نتایج نشان دهنده الگوی تولید سایتوکاین Th1 برای مواد دفعی ترشحي ۲۴ ساعته و Th2 برای آنتی ژن تام را داشت.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، مواد دفعی- ترشحي، سایتوکاین ها

✉ نویسنده مسئول: دانشیار انگل شناسی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی-مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

✉ استاد بیوشیمی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی-مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

✉✉ استاد ایمنی شناسی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی-مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

✉✉✉ مربی انگل شناسی دانشکده پزشکی و پژوهشکده طب رزمی-مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

✉✉✉✉ استادیار انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی یزد

آدرس پست الکترونیکی: dr_mahmoodzadeh@yahoo.com

مقدمه

بر مبنای مطالعات انجام گرفته تمام فرم های بالینی بیماری که در انسان بروز می کند بطور تجربی در مدل موشی جهت تعیین سازوکارهای ایمنی مداخله کننده در مقاومت، قابل بررسی است. در لیشمانیا نیوز پوستی نوع شهری و روستایی یافته ها حاکی از این است که اگر دوران عفونت بطور طبیعی سپری شود، پس از بهبودی، مقاومت طولانی مدت در برابر عفونت مجدد ایجاد می شود. همچنین گزارش هایی در مورد عدم مصونیت پس از استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی و یا ابتلا به ایدز موجود است (۱). ایمنی حفاظت کننده در لیشمانیوز توسط پاسخ های قوی ایمنی سلولی بوجود می آید. مکانیزم های موثر در کنترل انگل لیشمانیا عبارتند از: فعال شدن ماکروفاژها توسط انترفرون گاما و تولید محصولات اکسیژن فعال و نیتریک اکساید که مربوط به ایمنی سلولی هستند. همچنین در لیشمانیوز به ویژه در نوع پوستی، از تست پوستی لیشمانین که از راه های ارزیابی ایمنی سلولی است، استفاده می شود (۱).

سلول T غالبی که در طی لیشمانیوز فعال می شود نوع CD4+ است که هم در مقاومت و هم در حساسیت نقش دارد (۲). سلولهای CD4+ T سایتوکاین های گوناگونی ترشح می کنند که اعمال متفاوتی از جمله، فعال کردن ماکروفاژها و کنترل تولید آنتی بادی در سلولهای B را بعهده دارند. سلولهای CD4+ T به دو گروه تقسیم می شوند. گروه Th1 که اینترلوکین دو (IL-2)، اینترفرون گاما (IFN-γ)، TNF-α و لنفوتوکسین ترشح می کند که بیشتر در ایمنی سلولی دخیل هستند. و گروه Th2 که اینترلوکین چهار (IL-4)، اینترلوکین پنج (IL-5)، اینترلوکین شش (IL-6) و اینترلوکین ده (IL-10) را ترشح می کند که نقش مهمی در ایمنی هیومورال دارند. عفونت ناشی از L.major سبب مرگ در موش های حساس می شود ولی اثری بر موش نژاد مقاوم ندارد. سلولهای مشابه Th در بدن موش حساس به میزان زیادی تحریک می شود ولی به کنترل عفونت کمکی نمی کند، در صورتی که در موش های نژاد مقاوم سلولهای Th1 در پاسخ به عفونت تکثیر می یابند. تحقیقات نشان داده اند که سلولهای Th1 برای مقاومت در عفونت لیشمانیا ضروری هستند، برعکس پاسخ های

Th2 کمک به عفونت است. با این وجود، بیشتر آنتی ژن های لیشمانیا که در طی عفونت تحریک کننده مسیر Th1 هستند اثر محافظت کننده نگارند. بطور متناقضی آنتی ژن های القاء کننده مسیر Th2 اگر در مرحله اولیه عفونت فعال شوند به Th1 ملحق میشوند که دارای اثر محافظت کننده بسیار بالایی هستند (۳).

پاسخ دستگاه ایمنی بر ضد لیشمانیا و واکنش اختصاصی سیستم ایمنی مورد قبول همگان، فرآیندی است که با مسیر Th1 و Th2 شکل می گیرد. اگر مسیر Th1 شکل بگیرد TNF-α,β، IFN-γ، IL-12، IL-2 ترشح می شوند که IFN-γ تعیین کننده مقاومت در برابر عفونت است و اگر مسیر Th2 شکل بگیرد، IL-4، IL-5، IL-10 ترشح می شوند. ترشح IL-10 اثر مهار بر روی ماکروفاژها دارد که عمل طبیعی آنها را مهار می کند که منجر به تشدید عفونت و بیماری می شود (۴).

برای القاء محافظت در موش حساس BALB/c نیاز به تزریق انگل کامل نیست، بلکه می توان از آنتی ژن های خاصی بعنوان واکنس استفاده کرد. در دهه گذشته معلوم شده است که مولکول های خاص تخلیص شده و نو ترکیب می توانند در مدل های حیوانی موجب ایجاد ایمنی موثر بر علیه لیشمانیوز شوند. این مولکول ها شامل: gp63، gp46، LACK، Leif، LmSTI و TSA هستند. مولکول های متعدد موثری در بیولوژی انگل لیشمانیا در راستای تولید آنتی بادیهای اختصاصی میزبان و پاسخ ایمنی سلولی شناسایی شده است (۵). گزارشات قبلی حاکی از این بود که مولکول های دفعی- ترشحی از پانویژن های داخل سلولی از قبیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و توکسوپلازما گوندی آی حاوی آنتی ژن هایی هستند که به شدت ایمونوژن و محافظت کننده در مدل های واکنس هستند (۶). همچنین پروتئین های حاصل از کشت و فیلتر کردن محیط کشت پروماستیگوت های L.major موجب ایمنی قوی در موش BALB/c آلوده به L.major (۷) و سگ و انسان (۸) شده اند. یکی از پروتئین هایی که در لیشمانیا به عنوان دفعی- ترشحی معرفی شده، آنتی ژن ۲- سطحی پروماستیگوت (Promastigote surface Antigen-2=PSA-2) است. این پروتئین عامل پاسخ ایمنی قوی Th1 در انسان و باعث محافظت در مقابل چالش بیماریزا در عفونت تجربی موش می شود (۹).

تزریقی ۱۰۰ میکرولیتر بود)

۵- گروه E: هیچگونه تزریقی دریافت نکردند.

دو هفته بعد به همه گروه‌ها به همان میزان قبلی آنتی‌ژن و به جای ادجوانت کامل ادجوانت ناقص تزریق شد.

دو هفته پس از تزریق دوم، فقط آنتی‌ژن بدون ادجوانت به صورت یادآور ثانویه تزریق گردید.

یک ماه پس از اولین تزریق، مقدار یک میلیون پروماستیگوت فاز ایستا از انگل *Leishmania(L)major* در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به همه موش‌ها در همه گروه‌ها در ناحیه قاعده دم و به صورت داخل جلدی تزریق شد (چالش). با پیگیری و بررسی روزانه، پس از ۲ هفته ندول‌ها در ناحیه دم موش‌ها تظاهر یافتند.

غدد لنفاوی ناحیه کشاله ران و زیربغل موش‌هایی که آنتی‌ژن ۲۴ ساعته، صفرساعته، آنتی‌ژن تام و RPMI (گروه شاهد) دریافت کرده و مدت دو ماه از زخم آنها گذشته بود، برداشته شد و به صورت سوسپانسیون سلولی درآورده شد. پس از سه مرتبه شستشو با PBS با ۱۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس با استفاده از لام نئوبار، سلول‌ها شمارش و به هر چاهک ۹۶ خانه‌ای در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر، تعداد ۱۰۴ سلول ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. پس از این مدت به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن دفعی-ترشچی ۲۴ ساعته افزوده و به مدت ۴۸ ساعت دیگر در شرایط فوق انکوبه شدند. پس از این مدت مایع رویی چاهک‌ها برداشته شده و در لوله‌های اپیندرف جداگانه تا زمان اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

سنجش سایتوکاین‌ها در سلول‌های لنفاوی موش

BALB/c

کیت‌های الیزا از شرکت Bender Med System تهیه گردید. نمونه‌های سوپرناتانت سلول‌های لنفاوی فریز شده، ذوب و به درجه حرارت محیط رسانده شد. پلیت‌های حاوی آنتی‌بادی، دوبار با محلول شستشو، شسته شدند. تمام محلول‌ها طبق دستور شرکت سازنده در لحظه سنجش سایتوکاین‌ها بطور تازه تهیه گردید و سایتوکاین‌ها مورد سنجش قرار گرفت. با استفاده از دستگاه الیزا

در بدن میزبان و در محیط کشت، انگل‌ها مولکول‌های متنوعی را ترشح و دفع می‌کنند. بعضی از این مولکول‌ها در تحریک و میانکشی بین انگل و میزبان نقش مهمی دارند. مطالعات انجام شده بر روی مواد دفعی-ترشچی انگل‌های *L.infantum* و *L.mexicana* نشان داده است که این مواد دفعی-ترشچی بطور موثری سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند. لذا امید می‌رود با استفاده از مواد دفعی-ترشچی مناسب و با تقویت سیستم ایمنی و ایجاد محافظت (Protection) به کنترل بیماری نایل آمد.

در این تحقیق مواد دفعی-ترشچی پروماستیگوت *L.major* جداسازی و اثرات آن در الگوی تولید سایتوکاین در سلول‌های غده‌های لنفاوی حیوان آزمایشگاهی (BALB/c) مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای تهیه مواد دفعی-ترشچی پروماستیگوت‌های انگل *L.major*، در محیط RPMI+FCS کشت و تکثیر یافتند و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در محیط RPMI فاقد FCS مواد دفعی-ترشچی طبق گزارشات قبلی (۱۰) جدا گردید.

بررسی اثر مواد دفعی-ترشچی بر میزان سایتوکاین

ها در موش‌های BALB/c

موش‌ها با سن اولیه ۶ هفته بطور تصادفی در گروه‌های ۱۲ تایی گروه‌بندی شدند و هر گروه در قفس‌های جداگانه ای قرار گرفتند. تمام حیوانات به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. پس از دو هفته که حیوان‌ها به دما و شرایط حیوانخانه عادت کردند، طبق برنامه زیر مواد تزریقی را به صورت داخل جلدی در ۴ محل (زیر بغل‌ها و کشاله‌های ران) دریافت کردند.

۱- گروه A: مواد دفعی-ترشچی صفر ساعت + ادجوانت کامل فروند

۲- گروه B: مواد دفعی-ترشچی ۲۴ ساعت (۳/۲۵μg پروتئین) + ادجوانت کامل فروند

۳- گروه C: آنتی‌ژن تام (هموزنه) انگل (۳/۲۵μg پروتئین) + ادجوانت کامل فروند

۴- گروه D: ادجوانت کامل فروند + H₂O (در تمام گروه‌ها حجم

IL-10

چنانکه در نمودار شماره ۲ مشاهده میشود نتایج این سایتوکاین نیز تقریباً روند مشابه IL-4 در برداشت. گروهی که آنتی ژن تام دریافت کرده بودند IL-10 بیشتری در محیط کشت ترشح نمودند که این تفاوت نسبت به سایر گروهها معنی دار بود ($P < 0.01$). در سایر گروهها تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ولی گروه ۲۴ ساعته و صفر ساعته مقدار سایتوکاین بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند.

IL-2

ترشح IL-2 در سلولهای موشهای دریافت کننده آنتی ژن دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته که با آنتی ژن دفعی- ترشحی در محیط کشت چالش شده بود، نسبت به سایر گروهها افزایش معنی داری داشت ($P < 0.01$). در صورتیکه بین گروههای دیگر تفاوت محسوسی مشاهده نشد (نمودار شماره ۳).

IFN- γ

چنانکه نمودار شماره ۴ نشان میدهد این سایتوکاین در سلولهای لنفاوی موشهایی که آنتی ژن تام انگل دریافت کرده بودند در محیط کشت در چالش با آنتی ژن دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته بیشتر از سایر گروهها ترشح شده است و این تفاوت کاملاً معنی دار است ($P < 0.01$). همچنین سلولهای موشهای دریافت کننده مواد دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته که با آنتی ژن ۲۴ ساعته در محیط کشت چالش شده بودند، نسبت به گروههای کنترل و صفر ساعته، مقدار اینترفرون گامای بیشتری ترشح نمودند که این تفاوت نیز نسبت به گروههای مذکور معنی دار است ($P < 0.05$).

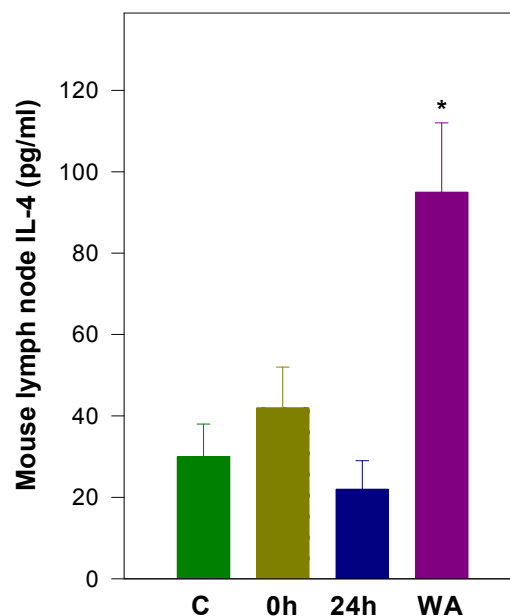
TNF- α

این سایتوکاین در گروه دریافت کننده آنتی ژن تام که در محیط کشت با آنتی ژن دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته چالش شده بود، نسبت به گروههای دیگر افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.01$). در صورتی که این سایتوکاین در گروه دریافت کننده آنتی ژن ۲۴ ساعته در چالش با آنتی ژن دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته نسبت به دو گروه کنترل و صفر ساعته، کاهش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۵)

ریدر، جذب نمونهها در ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از رسم منحنی استاندارد، غلظت سایتوکاینها محاسبه گردید.
بررسی آماری: جهت بررسی داده ها از تست ANOVA استفاده گردید و p value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

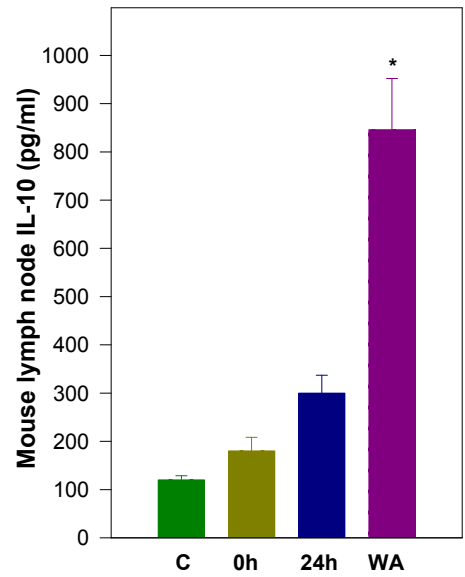
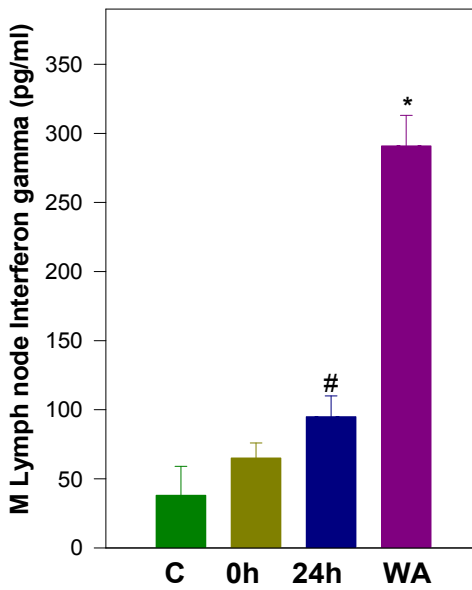
نتایج**نتایج اندازه گیری سایتوکاین ها در سلولهای غدد****لنفاوی BALB/c****IL-4**

سلولهای غدد لنفاوی موشهایی که آنتی ژن تام دریافت نموده بودند، در چالش با مواد دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته میزان IL-4 بیشتری در مقایسه با گروههای دیگر ترشح کردند که این تفاوت کاملاً معنی دار بود ($P < 0.01$). در صورتیکه بین گروه شاهد، گروه ۲۴ ساعته و گروه صفر ساعته اختلاف معنی داری مشاهده نشد. باوجود این بین گروه صفر ساعته در مقایسه با گروه ۲۴ ساعته تفاوت وجود داشت (نمودار شماره ۱)



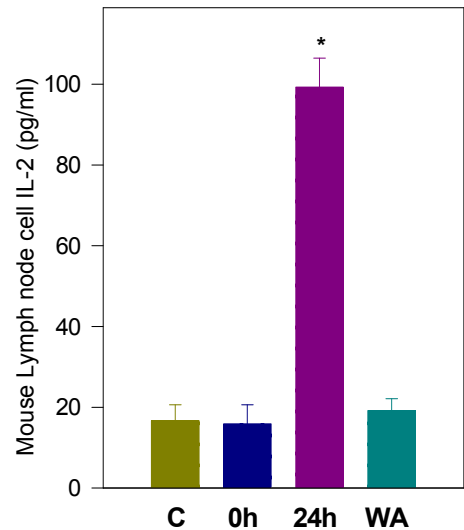
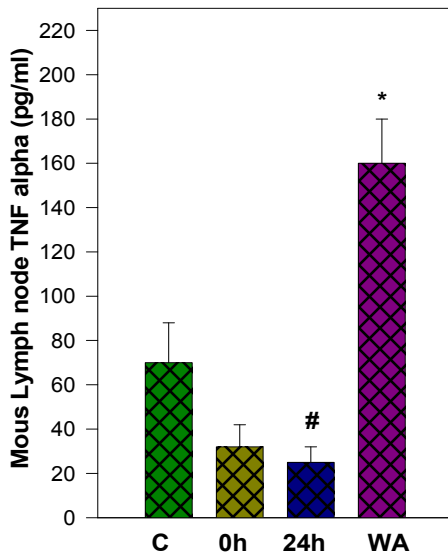
نمودار شماره ۱ میزان IL-4 ترشح شده در محیط کشت سلولهای غدد لنفاوی گروههای مختلف موش BALB/C دریافت کننده آنتی ژنهای مختلف چالش یافته با مواد دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته

* این گروه نسبت به سایر گروهها افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.01$)



نمودار شماره ۴ میزان ایتروفون گاما (IFN- γ) ترشح شده در محیط کشت سلول ها عدد لنفاوی گروه های مختلف موش BALB/C دریافت کننده آنتی ژن های مختلف چالش یافته با مواد دفعی-ترشحي ۲۴ ساعته
* این گروه نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.01$)

نمودار شماره ۲ میزان IL-10 ترشح شده در محیط کشت سلول های غددلنفاوی گروه های مختلف موش BALB/C دریافت کننده آنتی ژن های مختلف چالش یافته با مواد دفعی-ترشحي ۲۴ ساعته
* این گروه نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.01$)



نمودار شماره ۵ میزان فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- α) ترشح شده در محیط کشت سلول های غدد لنفاوی گروه های مختلف موش BALB/C دریافت کننده آنتی ژن های مختلف چالش یافته با مواد دفعی-ترشحي ۲۴ ساعته
* این گروه نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.01$)

نمودار شماره ۳ میزان IL-2 ترشح شده در محیط کشت سلول های غدد لنفاوی گروه های مختلف موش BALB/C دریافت کننده آنتی ژن های مختلف چالش یافته با مواد دفعی-ترشحي ۲۴ ساعته
* این گروه نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.01$)

۳۲۷ # این گروه نسبت به گروه های صفر ساعته و کنترل کاهش معنی

خطرناک در افراد مبتلا شده است (۱۲). حتی این وضعیت سبب بروز فرم‌های احشایی بیماری از عوامل جلدی مثل *L.tropica* گردیده است (۱۳). در کشور ما نیز لیشمانیوز همچنان یک مشکل مهم بهداشتی است (۱۴).

انگل لیشمانیا نیز مثل هر انگل دیگر در محیط زندگی خود موادی را ترشح و دفع می‌کند. نقش این مواد در نفوذ انگل به بدن میزبان، تامین تعادل بین انگل و میزبان، پاتوژنز، تحریک مکانیزم‌های ایمنی میزبان، کمک به تغذیه انگل از میزبان، مختل نمودن سیستم ایمنی میزبان و خنثی کردن فعالیت‌های ضدانگلی میزبان به اثبات رسیده است (۱۵).

روشن شدن نقش مواد دفعی-ترشحی در انگل‌های کرمی و نیز در تک یاخته‌هایی مثل توکسوپلاسما سبب شده تا مسیر تازه‌ای برای توسعه واکسن باز شود.

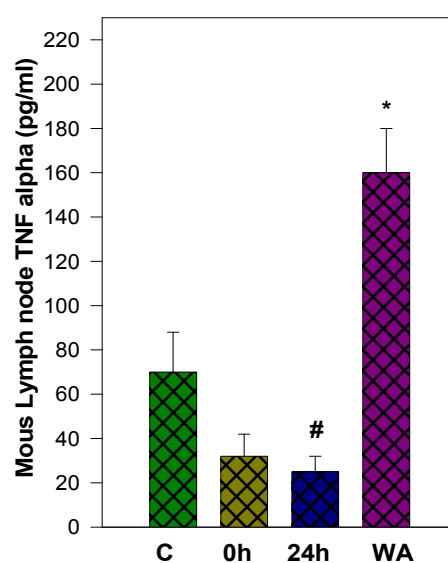
در این تحقیق برای تهیه آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی از پروماستیگوت فاز ایستا لیشمانیا ماژور *Leishmania(L)major* سویه (MRHO/IR/15/ER) استفاده گردید که سویه‌ای استاندارد در ایران است.

در مطالعات ایمونیزاسیون و چالش در برابر لیشمانیوز پوستی از مدل‌های مختلف حیوانی از قبیل: C3H، C57BL/6، BALB/c استفاده شده است (۱۶، ۱۷، ۱۹، ۱۸، ۲۰). موش BALB/c یک مدل حساس حیوانی برای لیشمانیوز پوستی با استفاده از *L.major* است که پس از بروز زخم در محل تزریق، بهبودی حاصل نشده و انگل در احشاء انتشار یافته و در نهایت باعث مرگ حیوان می‌گردد. همچنین الگوی سایتوکاین Th1/Th2 اولین بار در مقابل لیشمانیا در موش BALB/c تعریف شده است و این حیوان الگوی خوبی برای مطالعات لیشمانیا تشخیص داده شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد، سلول‌های لنفاوی جدا شده از موش‌هایی که آنتی‌ژن تام دریافت نموده بودند در چالش با مواد دفعی-ترشحی ۲۴ ساعته IL-4 بیشتری ترشح نمودند. در صورتیکه گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن ۲۴ ساعته در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری در تولید IL-4 نشان ندادند. در مورد IL-10 نیز نتایج مشابهی بدست آمد و افزایش مختصر

اندازه‌گیری پروتئین در مایع رویی کشت سلول‌های غدد لنفاوی موش BALB/c

در مایع رویی کشت سلول‌های غدد لنفاوی با آنتی‌ژن دفعی-ترشحی ۲۴ ساعته میزان پروتئین نیز مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مقدار پروتئین مایع رویی که برای سنجش سایتوکاین‌ها بکار رفت، تفاوت معنی‌داری موجود نیست (نمودار شماره ۶)



نمودار شماره ۶ غلظت پروتئین در مایع کشت سلول‌های غدد لنفاوی موش‌های چالش شده با مواد دفعی-ترشحی ۲۴ ساعته

بحث

گرم شدن زمین، توسعه راه‌ها و شهرها و عواملی مثل جنگ و حوادث طبیعی باعث افزایش مخازن حیوانی و تکثیر بیشتر ناقلین انگل لیشمانیا شده است. در نتیجه انتشار بیماری لیشمانیوز در دهه‌های اخیر افزایش یافته است (۱۱).

لیشمانیوز در حال حاضر در بسیاری از مناطق دنیا جزو بیماری‌های باز پدید و در برخی مناطق جزو بیماری‌های نو پدید بشمار میرود. به علت عدم وجود ایمنی استریل در این بیماری، بیماری‌های ناتوان‌کننده از قبیل ایدز سبب بازگشت و عود بیماری به شکل

مشاهده شده در نمودار نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. توافق عمومی بر این است که مقاومت موش BALB/c در مقابل چالش با انگل L.major بستگی به پاسخ‌های الگوی Th1 دارد که همراه با افزایش تولید IFN- γ و کاهش تولید IL-4 است (۲۱). علاوه بر این شواهد مهمی موجود است که پاسخ‌های Th2 و تولید IL-4 منجر به عدم کنترل عفونت و یا تشدید ضایعات می‌گردد. در غیاب IL-4 پاسخ Th2 بوجود نمی‌آید بطوریکه با خنثی‌سازی IL-4 در موش BALB/c حساس، رشد سلول‌های Th2 متوقف می‌شود و چنین موش‌هایی پاسخ Th1 را تولید می‌کند و بهبود خودبخودی به دنبال عفونت با همان استرین L.major حاصل می‌شود (۲۲). گرچه مطالعات دیگر نشان می‌دهد که موش BALB/c فاقد IL-4 آلوده شده با L.major بازهم ضایعات بهبودیافته ایجاد می‌کند (۲۳). ممکن است این اختلاف نتایج وابسته به استرین‌های L.major باشد (۲۴) یا ممکن است در حساسیت، فاکتورهایی غیر از IL-4 نقش داشته باشند و به عبارت دیگر سرکوب پاسخ Th1 موثر، ممکن است دقیقاً وابسته به IL-4 نباشد (۲۴). بهرحال نتایج این تحقیق در مورد تولید IL-4 موافق سرکوب Th1 است ولی همانطوریکه در مطالعه قبلی در مورد مرگ و میر گفته شده در نهایت این نوع پاسخ ایمنی منجر به بهبود ضایعه نگردید. گرچه تاخیر در مرگ و میر و کوچک بودن نسبی اندازه زخم‌ها در گروه موش‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن دفعی-ترشچی در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد (25) و گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن تام انگل با تولید فراوان IL-4 الگوی Th2 را به نمایش گذاشت. از گروه صفرساعته و شاهد انتظار تولید IL-4 نیست و فقط در حد پایه ممکن است IL-4 تولید کنند. ولی انتظار این است که آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشچی موجب تولید IL-4 قابل توجهی نشود که نتایج ما همین مطلب را نشان می‌دهد. در صورتیکه آنتی‌ژن تام تولید IL-4 را تحریک کرده است که بنظر می‌رسد آنتی‌ژن تام حاوی آنتی‌ژن‌های محرک الگوی Th2 است و آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشچی ۲۴ ساعته از الگوی Th1 پیروی کرده و حاوی آنتی‌ژن‌های تحریک‌کننده Th2 کمتری در مقایسه با آنتی‌ژن تام است.

تولید IL-10 در لیشمانیوز موشی، باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی

Th2 و پیشرفت بیماری می‌شود (۲۶). تزریق آنتی‌بادی گیرنده IL-10 به موش BALB/c واکسینه شده قبل از چالش با انگل منجر به حفاظت این رده موش شده که نشان می‌دهد IL-10 مهمترین بازیگر در عفونت لیشمانیا ماژور است که منجر به عدم پاسخ در واکسیناسیون می‌شود. در مطالعه ما نیز در گروه آنتی‌ژن تام مقدار زیاد این سایتوکاین با نتایج بالینی تطابق داشت و در گروه ۲۴ ساعته نیز گرچه بطور معنی‌داری پایین‌تر از گروه آنتی‌ژن تام بود ولی به هر حال در مقایسه با گروه شاهد نسبتاً بالا بود و نتوانست از پاسخ‌های Th2 جلوگیری نموده و در نتیجه، زخم ایجاد شده و در نهایت موش‌های آلوده تلف شدند (۲۵). Mattner و همکاران نیز در تحقیق خود به نتایج مشابهی دست یافتند. آنها نشان دادند که سلول‌های لنفاوی موش‌هایی که قبلاً توسط مواد دفعی-ترشچی و IL-12 نوترکیب چالش شده بودند در محیط کشت، IL-10 و IFN- γ بیشتر تولید کردند (۲۷). در اندازه‌گیری IL-2 نیز مطابق IL-4 و IL-10 الگوی Th1 برای آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشچی ۲۴ ساعته تکرار شده است. در گروه دفعی-ترشچی ۲۴ ساعته تولید این سایتوکاین به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد و آنتی‌ژن تام افزایش نشان می‌دهد. IL-2 فاکتور تقسیم سلول و فعالیت و تکثیر لنفوسیت‌های T است، لذا وجود آن برای پاسخ‌های ایمنی بسیار موثر است. بنابر اظهار Roberts سلول‌های CD $^{+}$ (Th) در مدل‌های حیوانی لیشمانیوز از اهمیت زیادی برخوردار هستند و بهبودی همراه با افزایش IFN- γ ، IL-2 و IL-12 است به شرطی که سایتوکاین‌های Th2 نظیر IL-10 حداقل مقدار را داشته باشند (۲۸).

IFN- γ مشخصه اصلی پاسخ Th1 است که به بهبود عفونت می‌انجامد (۲۷). این سایتوکاین به دلیل فعال‌سازی ماکروفاژها به روش اکسیداتیو و نیتریک اکساید نقش محوری در پاسخ‌های ایمنی سلولی دارد (۲۹). در این مطالعه میزان IFN- γ ترشح شده توسط لنفوسیت‌های موش‌های گروه دفعی-ترشچی ۲۴ ساعته و گروه آنتی‌ژن تام اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند که نشان‌دهنده فعال شدن الگوی Th1 توسط این آنتی‌ژن‌هاست ضمن اینکه گروه آنتی‌ژن تام باعث ترشح سایتوکاین‌های الگوی Th2 (IL-10 و IL-4) نیز شده بود ولی در ۲۴ ساعته چنین نبود.

مقاوم از قبیل C57BL/6 یا C3H و نیز با مطالعات بی‌خطری (Safety) و Toxicity برای ارزیابی در انسان باشد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین مرکز تحقیقات بهداشت نظامی پژوهشکده طب رزمی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) کمال تشکر را داریم که بودجه این تحقیق را فراهم نمودند.

References

- 1- W.H.O. (2000): Inform. Fact sheet no.116 revised
- 2- Reiner, S.L. Laksley, R.M. (1995): the regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 151-177.
- 3- Campos, A. Neto. (2005): what about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Brazilian J. of MBR.* 32:979-984.
- ۴- فتاحی بافقی، ع. (۱۳۸۲). ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی بر ضد مولکول‌ها gp6 و LPG در موش BALB/c و بیماران انسانی بهبود یافته و بهبودنیابنده. پایان‌نامه دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته انگل‌شناسی. دانشگاه تربیت مدرس. دانشکده علوم پزشکی.
- ۵- دریانی، ا. (۱۳۷۹): مطالعه پاسخ‌های ایمنی سلولی فراکشن‌های حاصل از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی تاکی‌زوئیت توکسوپلازما گوندیی در مدل موشی. رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D) انگل‌شناسی پزشکی. دانشگاه تربیت مدرس. دانشکده علوم پزشکی.
- 6- Mcleod, R. Mack, D. Brown, C.(1991): *Toxoplasma gondii*-new advances in cellular and molecular biology. *EXP. Parasitol.* 72:109-121.
- 7- Ilg, T. Stierhof, Y.D. Wiese, M.McConville M.L. Overath, P. (1994): Characterization of phosphoglycan containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology.* 108:63-71.
- 8- Lorelance, J.D. Gottlieb, M.(1986): comparison of extra cellulat acid phosphatase from obvious isolates

از آنجا که سلول‌های کشت شده، از موش BALB/c گرفته شده‌اند و اکثر تحقیقات وجود نقص IFN- γ را در این رده حیوان مورد تاکید قرار می‌دهند، که در این تحقیق نیز اصولاً مقدار آن در اکثر گروه‌ها زیاد نیست، ولی به نظر می‌رسد آنتی‌ژن‌هایی که باعث ترشح این سایتوکاین می‌شوند در گروه آنتی‌ژن تام متعددند. فلذا کلون‌های مختلفی توسط این آنتی‌ژن‌ها فعال می‌شود و در نتیجه تولید IFN- γ بیشتری در گروه آنتی‌ژن تام مشاهده می‌شود. مساله مهم این است که آیا IFN- γ نقشی در محافظت داشته است یا نه؟ که در این تحقیق این موضوع بطور مجزا مورد مطالعه قرار نگرفت. اگرچه بنظر می‌رسد مرگ تمام موش‌ها در پایان تحقیق دلیل بر عدم محافظت این سایتوکاین در این تحقیق دارد ولی این کار به مطالعه و بررسی بیشتری نیاز دارد.

TNF- α بعنوان دومین سیگنال برای فعال کردن ماکروفاژها است که با سایتوکاین‌های دیگر اثر هم افزایی ویا سنیرژیک دارد (۳۰). موش‌های BALB/c آلوده در مقایسه با موش‌های مقاوم مقادیر بیشتری TNF- α تولید می‌کنند. TNF- α همراه با IL-4 نه تنها اثری بر فعال‌سازی ماکروفاژ و انهدام انگل ندارد بلکه باعث افزایش تعداد انگل می‌شود (۳۱). مقدار TNF- α در مطالعه ما در مقایسه با گروه شاهد و گروه آنتی‌ژن تام کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد و نیز گروه آنتی‌ژن تام در مقایسه با گروه شاهد و گروه ۲۴ ساعته افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد چون مجموعه سلول‌هایی که از غدد لنفاوی موش استخراج شده حاوی ماکروفاژ نیز بوده‌اند، لذا آنتی‌ژن فعال‌کننده ماکروفاژها باعث ترشح این سایتوکاین شده است و به دلیل تعدد آنتی‌ژن‌های گروه آنتی‌ژن تام، در این گروه تحریک بیشتری صورت گرفته و باعث ترشح بیشتر TNF- α شده است.

در مجموع با توجه به توان آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی در تاخیر مرگ و میر حیوان، کوچک‌بودن زخم‌ها (۲۵) و بروز پاسخ‌های Th1 در سنجش سایتوکاین‌های مترشحه توسط سلول‌های غدد لنفاوی چالش شده با مواد دفعی- ترشحی که از خود نشان داده است، چنانچه تمام شرایط لازم برای استخراج از جمله جلوگیری از دنا توره شدن و ... حفظ شود، می‌تواند آنتی‌ژن مناسبی برای مطالعات بیشتر در مدل موشی و بخصوص با استفاده از مدل‌های

- regulation in experimental cutaneous leishmaniasis. *Chem. Immunol.* 63:98-114.
- 18-Afonso, L.C.C. Scott, P. (1993): Immune responses associated with the susceptibility of C57BL/6 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 32:277-285.
- 19-Viana da costa, A. Huerre, M. Delacre, M.Auriault. C. et al. (2002): IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection. *Parasitology International.* 51:367-379.
- 20-Mork, T.M. et al.(2005): IL-4 and IL-10 collude vaccine failure for Novel Excretory Antigens in Murine *Leishmania major* infection. *Infection and Immunity.* Nov:7620-7628.
- 21- Titu, S.R. Theodos,M, Shankar,A. Hall,R. (1994): Interactions between *Leishmania major* and macrophage. *Immunol. Ser.* 60:437-459.
- 22-Kopf,M. Brombacher,F. Kohler,G. et al (1996): IL-4 deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 184:1127-1136.
- 23-Noben-Trauth, N. kropf, P.Muller, I.(1996): Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4 deficient mice. *Science.* 271:987-990.
- 24- Mattner, F. Alber, G. Magram, J. Kopf, M. (1997): The role of IL-12 and IL-4 in *Leishmania major* infection. *Chem. Immunol.* 68:86-109.
- 25- Mehrani, H. Mahmoodzadeh, A. (2007): Immunological effects of *Leishmania major* secretory and excretory products on cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Iranian J parasitol.* 2(2): 9-19.
- 26- Kane, M.M. Mosser, M (2001): The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. of leishmania. Am.J.Trop. Med. Hyp.* 1986:35:112-8
- 9-Chenik,M.Lakhal, S. Ben Khalef, N.Zribi, L.Louzir, H. Dellasi, K.(2006): Approches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *leishmania major* parasites. *Parasitology.* 132:493-509.
- ۱۰- مهرانی ح ع، محمودزاده ع، شیربازو ش، جعفری م . بررسی نوع فعالیت آنزیم های موجود در مواد دفعی- ترشحاتی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور ، دانشور(اردیبهشت ۱۳۸۴)، ۱۲(۵۶) ص ۶۳-۵۷
- 11-Desjeux, P. (1996): Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 14:417-423.
- 12-Badaro, R. Carvalho, E.M. Rocha, H. Queroz, A.C. Jones, T. C. (1986): *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet.* 22: 647-649.
- 13-Dillon, D. C. Day, C.H. Whittle, J.A. Magill A. J. Reed, S.G. (1995): Characterization of a *Leishmania tropica* antigen that detects immune responses in Desert Storm viscerotropic leishmaniasis patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:7981-7985.
- ۱۴-محمودزاده، ع. محقق حضرتی، ص. نباتی، ح. فقیه زاده، س. (۱۳۷۶) ارزشیابی لیشمانیازاسیون در نیروهای مسلح. مجله پزشکی کوثر (زمستان)
- ۱۵-محمودزاده، ع. مهرانی، ع.ع. (۱۳۷۹): کاربرد روشهای مولکولی در انگلشناسی تحلیلی. تألیف: میشل. تی، روگن، انتشارات گوهر منظوم. تهران. ص:۱۴۴-۹۷.
- 16-Oliver, M. Romero-Gallo, B.J. Matte, C. et al. (1998): Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatase inhibition: effect on murine *Leishmaniasis* progression. *J. Biol. Chem.* 273:13944-13949.
- 17-Scott, P. (1996): T.helper cell development and

- Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Bioch. Parasitol.* Available online at WWW. Sciencedirect.com MOLBIO 5081 1-10.
- 30- Liew, F. Y., Li, Y., Millott, S. (1990). Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of Leishmania major Through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.* 145:4306-4310.
- 31- Nashleenas, M., Kanaly, S., Scott, P. (1998): Control of Leishmania major infection in mice lacking TNF receptors. *J. Immunol.* 160:5506-5513.
- Immunol.* 166:1141-7.
- 27- Ghazanfari, T., Hassan, M., Eftekar, M., Ahmadian, A., Naderi, G., Azar, A. (2000): Garlic Induces a shift cytokine pattern in Leishmania major-Infected BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.* 52:491-495.
- 28- Roberts, M. T. (2006): Current understanding on the Immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br. Med. Bull.* 75-76:115-130.
- 29- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M. et al. (2003):

Archive 03