مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶
صفحات: ۳۳۲-۳۲۳

الگوی تولید سایتوکاین مواد دفعی–ترشحی پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژوردر سلول های غدد لنفاوی موش BALB/c

عباس محمودزاده پورناکی[✍]، حسینعلی مهرانی[*]، کاظم احمدی[**]،
شهناز شیربازو [***]، علی فتاحی بافقی[****]

چکیـده

مقدمه: به دلیل وجود ایمنی محافظت کننده پس از بهبود از بیماری لیشـمانیوز پوسـتی ، امیـد بـه تولیـد واکسـن محافظت کننده در این بیماری برای انسان وجود دارد. یکی از مواد پیشنهادی برای مطالعه واکسن لیشمانیا، مـواد و ترکیبات دفعی–ترشحی انگل است.در این تحقیق تاثیر مواد دفعی–ترشحی انگل لیشـمانیا مـاژور بـر الگـوی تولیـد سایتوکاین ها در سلول های غده های لنفاوی موش کوچک آ.مایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: جهت ارزیابی پنج گروه موش BALB/c(در هر گروه ۱۲ سر) (گروه دریافت کننده آنتی‌ژن تـام، آنتی‌ژن دفعی– ترشحی۲۴ ساعته، آنتی‌ژن دفعی– ترشحی صفر ساعته و ادجوانت، گروه شم بـدون تزریـق)، تحـت چالش با پروماستیگوت لیشمانیا ماژور قرار گرفتند. در ماه دوم پس از ظهور زخم لیشمانیایی، سلول‌های غدد لنفاوی موش‌های گروه‌های مختلف جداسازی وکشت داده شد و۴۸ ساعت پس از چالش با مواد دفعی– ترشحی ۲۴ ساعته، پروفایل سایتوکاینی آنها مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان IL-4 و IL-10 در گروه دریافت کننده آنتی‌ژن تام، افزایش معنی‌داری در مقایسـه با سایر گروه‌ها داشت. در صورتی که IL-2 در سلول‌های موش‌هـای دریافـت کننـده آنتـی‌ژن ۲۴ سـاعته افـزایش معنی‌داری در مقایسه با سایر گروه نشان داد. همچنین IFN-γ در گروه دریافـت کننـده آنتـی ژن تـام و ۲۴ سـاعته افزایش معنی‌داری داشت. TNF-α نیز در گروه آنتی‌ژن تام افزایش معنی‌دار داشت، در صورتیکه در گـروه دریافـت کننده آنتی‌ژن دفعی–ترشحی ۲۴ ساعته کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد.

نتیجه گیری: مجموعه نتایج نشان‌دهنده الگوی تولید سایتوکاین Th1 برای مواد دفعی ترشحی ۲۴ ساعته و Th2 برای آنتی‌ژن تام را داشت.

کلمات کلیدی: لیشمانیاماژور، مواد دفعی– ترشحی، سیتوکاین ها

✍ نویسنده مسئول: دانشیار انگل شناسی دانشکده پزشکی وپژوهشکده طب رزمی–مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)
*استاد بیوشیمی دانشکده پزشکی وپژوهشکده طب رزمی–مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)
** استاد ایمنی شناسی دانشکده پزشکی وپژوهشکده طب رزمی–مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)
*** مربی انگل شناسی دانشکده پزشکی وپژوهشکده 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

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بر مبنای مطالعات انجام گرفته تمام فرم های بالینی بیماری که در انسان بروز می‌کند بطور تجربی در مدل موشی جهت تعیین سازوکارهای ایمنی مداخله کننده در مقاومت، قابل بررسی است. درلیشما نیوز پوستی نوع شهری و روستایی یافته‌ها حاکی از این است که اگر دوران عفونت بطور طبیعی سپری شود، پس از بهبودی، مقاومت طولانی مدت در برابر عفونت مجدد ایجاد می‌شود. همچنین گزارش‌هایی 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 پاسخ‌های قوی ایمنی سلولی بوجود می‌آید. مکانیزم‌های موثر در کنترل انگل لیشمانیا عبارتند از: فعال شدن ماکروفاژها توسط انترفرون گاما وتولید 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 راه‌های ارزیابی ایمنی سلولی است، استفاده می‌شود(۱).

سلول T غالبی که در طی لیشمانیوز فعال می‌شود نوع +CD4 است که هم در مقاومت و هم در حساسیت نقش دارد(۲). سلولهای +CD4 T سایتوکاین‌های گوناگونی ترشح می‌کنند 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 می‌شوند. گروه Th1 که اینترلوکین دو (IL-2)، اینترفرون گاما (IFN-γ)، TNF-α و لنفوتوکسین ترشح می‌کند 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 می‌کند که نقش مهمی در ایمنی هیومورال دارند. عفونت ناشی از L.major سبب مرگ در موش‌های حساس می‌شود ولی اثری بر موش نژاد مقاوم ندارد. سلولهای مشابه Th در بدن موش حساس به میزان زیادی تحریک می‌شود ولی به کنترل عفونت کمکی نمی‌کند، در صورتی که درموش‌های نژاد مقاوم سلولهای Th1 در پاسخ به عفونت تکثیر می‌یابند. تحقیقات نشان داده‌اند که سلولهای Th1 برای مقاومت در عفونت لیشمانیا ضروری هستند، برعکس پاسخ‌های Th2 کمک به عفونت است. با این وجود، بیشتر آنتی‌ژن‌های لیشمانیا که در طی عفونت تحریک کننده مسیر Th1 هستند اثر محافظت‌کنندگی ندارند. بطور متناقضی آنتی‌ژن های القاءکننده مسیر Th2 اگر در مرحله اولیه عفونت فعال شوند به Th1 ملحق میشوند که دارای اثر محافظت‌کنندگی 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 یا Th2 شکل می‌گیرد. اگر مسیر Th1 شکل بگیرد TNF-α,β، IFN-γ ، IL-12، IL-2 ترشح می‌شوند که IFN-γ تعیین کننده مقاومت در برابر عفونت است و اگر مسیر Th2 شکل بگیرد،IL-4، IL-5 ، IL-10 ترشح می‌شوند. ترشح IL-10 اثر مهاری بر روی ماکروفاژها دارد که عمل طبیعی آنها را مهار می‌کند که منجر به تشدید عفونت و بیماری می‌شود(۴).

برای القاء محافظت در موش حساسBALB/c نیاز به تزریق انگل کامل نیست، بلکه می‌توان از آنتی‌ژن‌های خاصی بعنوان واکسن استفاده کرد. در دههٔ گذشته معلوم شده است که مولکول‌های خاص تخلیص شده و نوترکیب می‌توانند در مدل‌های حیوانی موجب ایجاد ایمنی موثر برعلیه لیشمانیوز شوند. این مولکول‌ها شامل :gp63 ، gp46، LACK، Leif، LmSTI و TSA هستند. مولکول‌های 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 مولکول‌های دفعی-ترشحی از پاتوژن‌های داخل سلولی از قبیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و توکسوپلاسما گوندی آی حاوی آنتی‌ژن‌هایی هستند که به شدت ایمونوژن و محافظت کننده در مدل‌های واکسن هستند(۶). همچنین پروتئین‌های حاصل از کشت و فیلتر کردن محیط کشت پروماستیگوت‌های L.major موجب ایمنی قوی در موش BALB/c آلوده به L.major (۷) و سگ و انسان (۸) شده اند. یکی از پروتئین‌هایی که در لیشمانیا به عنوان دفعی-ترشحی معرفی شده، آنتی‌ژن۲- 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).

Archive of SID
www.SID.ir

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

در این تحقیق مواد دفعی- ترشحی پروماستیگوت L.major جداسازی و اثرات آن در الگوی تولید سایتوکاین در سلول های غده های لنفاوی حیوان آزمایشگاهی (BALB/c) مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

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

بررسی اثر مواد دفعی- ترشحی بر میزان سایتوکاین ها درموش‌های BALB/c

موش‌ها با سن اولیه۶ هفته بطور تصادفی در گروه های ۱۲ تایی گروه‌بندی شدندو 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- ترشحی صفر ساعت + ادجوانت کامل فروند

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

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

۴-گروه D: ادجوانت کامل فروند + H2O (در تمام گروه ها حجم تزریقی ۱۰۰ میکرولیتر بود)

۵-گروه E: هیچگونه تزریقی دریافت نکردند.

دو هفته بعد به همهٔ‌گروه‌ها به همان میزان قبلی آنتی‌ژن و به جای ادجوانت کامل ادجوانت ناقص تزیق 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 همهٔ موش‌ها در همهٔ گروه‌ها در ناحیهٔ قاعده دم و به صورت داخل جلدی تزریق شد (چالش). با پیگیری و بررسی روزانه، پس از ۲ هفته ندول‌ها در ناحیهٔ دم موش ها 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 باPBS در 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 ۵درصد CO2 کشت داده شدند. پس از این مدت به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن دفعی-ترشحی 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 سایتوکاین ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

سنجش سایتوکاین‌ها در سلول‌های لنفاوی موش BALB/c

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

Archive of SID
www.SID.ir

ریدر، جذب نمونه‌ها در ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از رسم منحنی استاندارد، غلظت سایتوکاین‌ها محاسبه گردید.

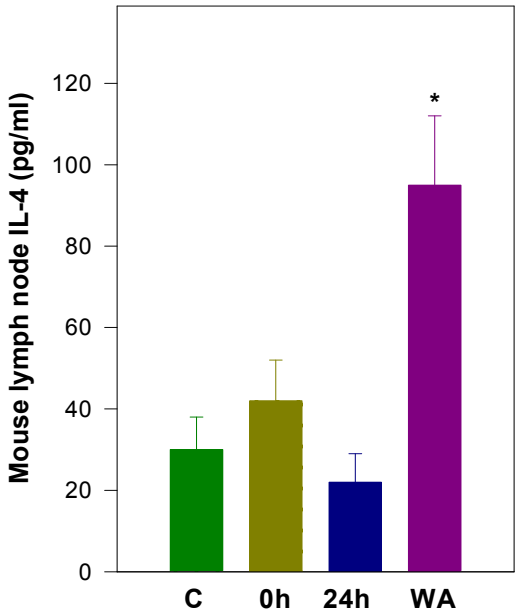
بررسی آماری: جهت بررسی داده ها از تست ANOVA استفاده گردید و p value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

نتایج اندازه‌گیری سایتوکاین ها در سلول‌های غدد لنفاوی BALB/c

IL-4

سلول‌های غدد لنفاوی موش‌هایی که آنتی‌ژن 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 معنی‌دار بود (P<0.01). در صورتیکه بین گروه شاهد، گروه ۲۴ ساعته و گروه صفر ساعته اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. باوجود این بین گروه صفرساعته در مقایسه با گروه ۲۴ ساعته تفاوت وجودداشت (نمودار شماره ۱)



نمودار شماره ۱ میزان IL-4 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-ترشحی ۲٤ ساعته

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

IL-10

چنانکه در نمودار شماره ۲ مشاهده میشود نتایج این سایتوکاین نیز تقریباً روند مشابه IL-4 در برداشت. گروهی که آنتی‌ژن 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 معنی‌داری 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 دریافت‌کننده آنتی‌ژن دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته که با آنتی‌ژن دفعی- ترشحی در محیط کشت چالش شده بود، نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری داشت (P<0.01). در صورتیکه بین گروه‌های دیگر تفاوت محسوسی مشاهده نشد(نمودار شماره ۳).

IFN-γ

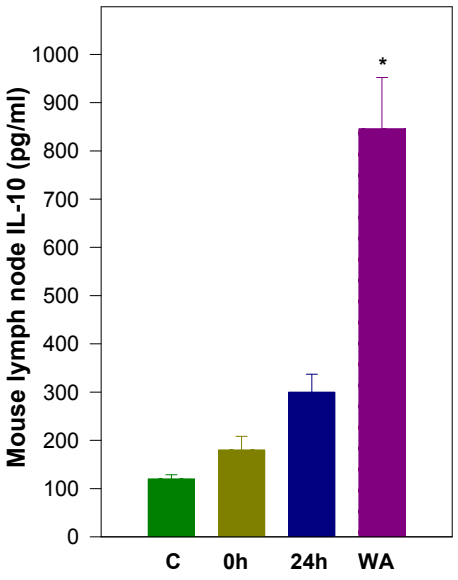
چنانکه نمودار شماره۴ نشان میدهد این سایتوکاین در سلول‌های لنفاوی موش‌هایی که آنتی‌ژن تام انگل دریافت کرده بودند در محیط کشت در چالش با آنتی‌ژن دفعی-ترشحی ۲۴ ساعته بیشتر از سایر گروه‌ها ترشح شده است و این تفاوت کاملاً معنی‌دار است (P<0.01). همچنین سلول‌های موش‌های دریافت‌کننده مواد دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته که با آنتی‌ژن ۲۴ ساعته در محیط کشت چالش شده بودند، نسبت به گروه‌های کنترل و صفرساعته، مقدار اینترفرون گامای بیشتری ترشح نمودند که این تفاوت نیز نسبت به گروه‌های مذکور معنی‌دار است (P<0.05).

TNF-α

این سایتوکاین در گروه دریافت کننده آنتی‌ژن تام که در محیط کشت با آنتی‌ژن دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته چالش شده بود، نسبت به گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<0.01). در صورتی که این سایتوکاین در گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن ۲۴ ساعته در چالش با آنتی‌ژن دفعی- ترشحی ۲۴ ساعته نسبت به دو گروه کنترل و صفرساعته، کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<0.05) (نمودارشماره۵)

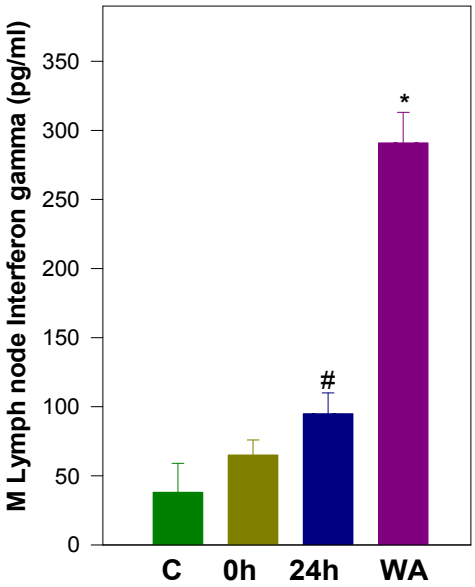
Archive of SID

www.SID.ir



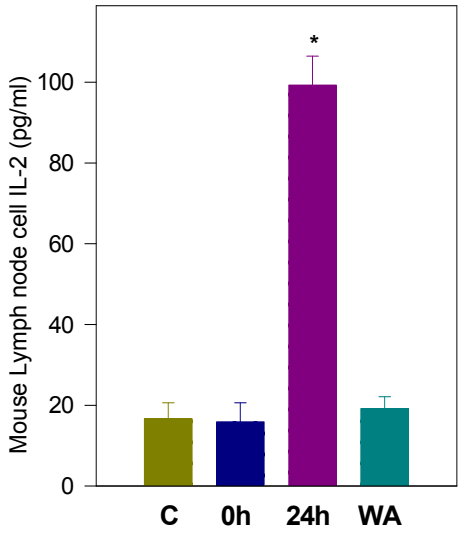
نمودار شماره ۲ میزان IL-10 ترشح شده در محیط کشت سلول های غددلنفاوی گروه های مختلف موش BALB/C دریافت کننده آنتی ژن های مختلف چالش یافته با مواد دفعی-ترشحی ۲٤ ساعته

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



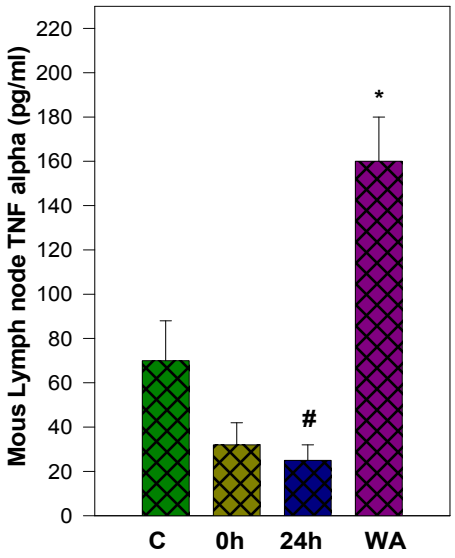
نمودار شماره ٤ میزان انترفرون گاما (IFN-γ) ترشح شده در محیط کشت سلول ها غدد لنفاوی گروه های مختلف موش BALB/C دریافت کننده آنتی ژن های مختلف چالش یافته با مواد دفعی-ترشحی ۲٤ ساعته

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



نمودارشماره 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-ترشحی ۲٤ ساعته

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



نمودار شماره ٥ 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-ترشحی ۲٤ ساعته

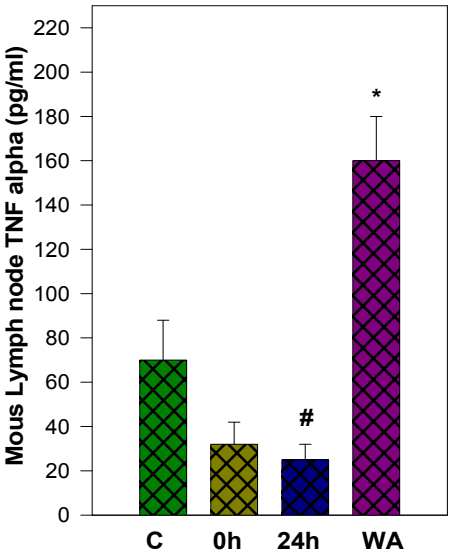
*. این گروه نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی داری را نشان می دهد (p< 0.01)

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

www.SID.ir

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 (نمودارشماره ۶)



نمودار شماره٦ غلظت پروتئین در مایع کشت سلول های غدد لنفاوی موش های چالش شده با مواد دفعی-ترشحی ٢٤ 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 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 مانیز 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 خنثی‌کردن 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 لیشمانیاماژور 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، ۱۸،۱۹، 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 جداشده 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

Archive of
www.SID.ir

مشاهده شده در نمودار نسبت به گروه شاهد معنی‌دارنبود. 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 می گردد. در غیاب IL-4 پاسخ Th2 بوجود نمی‌آید بطوریکه با خنثی سازی 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 بهبودنایابنده 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-ترشحی 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 تولیدکنند. ولی انتظار این است که آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی 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-ترشحی 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 پاسخ های 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 آنتی‌ژن‌تام 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 دست‌یافتند. آنها نشان دادند که سلول‌های لنفاوی موش‌هایی که قبلاًتوسط مواد دفعی-ترشحی 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-ترشحی ۲۴ ساعته تکرار شده است. در گروه دفعی-ترشحی ۲۴ ساعته تولید این سایتوکاین به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد و آنتی‌ژن تام افزایش نشان می دهد. 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-ترشحی 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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 می شوند 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 دراین 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 دناتوره شدن و ... حفظ شود، می‌تواند آنتی‌ژن مناسبی برای مطالعات بیشتر در مدل موشی و بخصوص با استفاده از مدل‌های 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 LPG و gp6 در موشBALB/c و بیماران انسانی بهبود یافته و بهبودنایابنده. پایان‌نامه دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته انگل شناسی. دانشگاه تربیت مدرس. دانشکده علوم پزشکی.

۵-دریانی، ا. (۱۳۷۹): مطالعه پاسخ‌های ایمنی سلولی فراکشن‌های حاصل از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندیی در مدل موشی. رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D) انگل شناسی 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 srcretory products of Leishmania. Parasitology. 108:63-71.

8- Lorelance, J.D. Gottlieb, M,(1986): comparison of extra cellulat acid phosphatase from obvious isolates

www.SID.ir

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 وفعالیت آنزیم های موجود در مواد دفعی- ترشحی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور ، دانشور(اردیبهشت ۱۳۸۴)، ۱۲(۵۶) ص۵۷-۶۳

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. ثباتی، ح. فقیه زاده، س. (۱۳۷۶) ارزشیابی لیشمانیزاسیون در نیروهای مسلح. مجله پزشکی کوثر (زمستان)

۱۵-محمودزاده، ع. مهرانی، ح.ع. (۱۳۷۹): کاربرد روشهای مولکولی در انگل‌شناسی تحلیلی. تالیف: 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-indued 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 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.

www.SID.ir

Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. Mol. Bioch. Parasitol. Availble online at WWW. Sciencedirect.com MOLBIO 5081 1-10.

30- Liew,F. Y.Li,Y.Millott, S.(1990). Tumor nescosis factor-alpha synergizes with IFN-γ in mediating killing of Leishmania major Through the induction of nitric oxide.J.Immunol. 145:4306-4310.

31- Nashleanas, 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. ebtekar,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 Immunulogy of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. Br. Med. Boll. 75-76:115-130.

29- Becker, I. Salaiza, N. Aguirre, M. et al. (2003):

Archive of SID

www.SID.ir