

## سلول‌های T تنظیمی در ضایعات حاد و مزمن لیشمانيوز جلدی ناشی از انگل لیشمانيما ماژور

شروین غفاری حسینی<sup>۱</sup>، دکتر شقایق حق جوی جوانمرد<sup>۲</sup>، دکتر سید حمید زرکش<sup>۳</sup>، علی خامسی پور<sup>۴</sup>، لاله رفیعی<sup>۵</sup>، خدیجه کربلایی<sup>۶</sup>، دکتر محمد علی نیلفروش‌زاده<sup>۷</sup>، دکتر مهدی بقایی<sup>۸</sup>، دکتر سید حسین حجازی<sup>۸</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** لیشمانيوز جلدی در بسیاری از کشورهای جهان یک مشکل بهداشتی مهم محسوب می‌شود. مطالعاتی که در مدل‌های حیوانی و همچنین، در انسان انجام شده است، نشان می‌دهد که نوع پاسخ ایمنی در محل ضایعه، به خصوص تعادل بین سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های T عملگر بر سیر بیماری موثر است و می‌تواند مشخص کند که بیماری خودبه‌خود بهبود می‌یابد یا این که به فرم‌های مزمن تبدیل می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی نقش سلول‌های T تنظیمی طبیعی (nTreg) در ضایعات حاد و مزمن لیشمانيوز جلدی ناشی از لیشمانيما ماژور بود.

**روش‌ها:** از ضایعات جلدی ۲۸ بیمار مبتلا به لیشمانيوز جلدی که از نظر آزمایشگاهی ابتلای آن‌ها به لیشمانيما ماژور ثابت شده بود، بیوپسی گرفته شد. این بیماران در دو گروه افراد مبتلا به ضایعات حاد و افراد مبتلا به ضایعات مزمن تقسیم شدند. میزان بیان ژن Forkhead box P<sub>۳</sub> (foxp<sub>۳</sub>) با روش Real-time PCR (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction) و تعداد سلول‌های nTreg با روش رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت در ضایعات بیماران دوگروه بررسی شد. از آزمون آماری Mann-Whitney U برای تعیین معنی‌داری تفاوت‌ها بین دو گروه استفاده شد.

**یافته‌ها:** میانگین بیان نسبی ژن foxp<sub>۳</sub> در ضایعات حاد و مزمن به ترتیب  $0.73 \pm 0.53$  و  $0.99 \pm 0.26$  بود که به صورت معنی‌داری در ضایعات مزمن بیشتر بود ( $P = 0.007$ ). در روش رنگ‌آمیزی بافتی ایمونوفلورسنت نیز تعداد سلول‌های nTreg ضایعات مزمن به صورت معنی‌داری بیشتر از ضایعات حاد بود.

**نتیجه‌گیری:** افزایش بیان ژن و همچنین بیان نشانگرهای پروتئینی سلول nTreg در ضایعات مزمن لیشمانيوز جلدی نشان می‌دهد که احتمال دارد این سلول‌ها در مزمن شدن ضایعات نقش داشته باشند و در نتیجه ممکن است بتوان از روش‌های ایمونوتراپی که هدف آن‌ها nTreg است، برای درمان این ضایعات مزمن استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** لیشمانيوز جلدی، ایمونوفلورسنت، لیشمانيما ماژور، سلول‌های T تنظیمی

**ارجاع:** غفاری حسینی شروین، حق جوی جوانمرد شقایق، زرکش سید حمید، خامسی پور علی، رفیعی لاله، کربلایی خدیجه، نیلفروش‌زاده محمد علی، بقایی مهدی، حجازی سید حسین. سلول‌های T تنظیمی در ضایعات حاد و مزمن لیشمانيوز جلدی ناشی از انگل لیشمانيما ماژور. مجله

دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۹): ۲۳۳۵-۲۳۲۶

## مقدمه

لیشمانیوز جلدی یا سالک، یک بیماری انگلی شایع در آسیای جنوب غربی و شمال آفریقا است که دو گونه‌ی انگل لیشمانیا یعنی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا آن را ایجاد می‌کنند. ضایعات جلدی در این بیماران به طور معمول، خودبه‌خود بهبود می‌یابند و ممکن است به فرم پاپول، ندول یا پلاک و به صورت زخمی یا غیر زخمی باشند که به درجات مختلف در این ضایعات التهاب وجود دارد (۱).

اشکال متنوع بالینی احتمال دارد به علت گونه‌های مختلف انگل عامل بیماری و یا نوع پاسخ ایمنی میزبان به عفونت باشد (۲). ضایعات ناشی از لیشمانیا ماژور اغلب در عرض ۳-۴ ماه بهبود می‌یابند و در مقایسه با ضایعات لیشمانیا تروپیکا، التهاب بیشتری دارند و بیشتر زخمی می‌شوند، اما ضایعات ناشی از لیشمانیا تروپیکا، سیر طولانی‌تری دارند و با التهاب کمتری همراه هستند (۳). لیشمانیا ماژور می‌تواند ضایعات مزمنی ایجاد کند که بیشتر از شش ماه و حتی سال‌ها فعال باقی می‌مانند (۴).

مکانیسم‌های ایمنی مختلفی در کنترل این بیماری مؤثر هستند. در این میان، نقش سلول‌های  $CD4^+$  T بیشتر از سایر مکانیسم‌ها بررسی شده است. سلول‌های T (Th یا helper T cells) که دو نوع  $Th_1$  و  $Th_2$  آن‌ها به خوبی شناخته شده هستند، نقش ثابت شده‌ای در بهبود ضایعات لیشمانیا در مدل موش دارند. پاسخ غالب  $Th_1$  همراه سایتوکاین‌های مربوط به آن، باعث فرم بهبود یابنده و پاسخ  $Th_2$  باعث ایجاد فرم مزمن می‌شود (۵-۶). اما در فرم انسانی لیشمانیوز جلدی، نقش دقیق  $Th_1$  و  $Th_2$  در ضایعات مزمن مشخص نشده است و اغلب مخلوطی از

پاسخ‌های  $Th_1$  و  $Th_2$  در هر نوع ضایعات حاد و مزمن دیده می‌شود (۷-۱۰).

به تازگی سلول‌های T تنظیمی که سلول‌های عملگر را مهار می‌کنند، در زمینه‌ی لیشمانیوز جلدی مزمن بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. سلول‌های T تنظیمی طبیعی (nTreg) که زیر گروهی از سلول‌های T تنظیمی هستند، به خصوص بیش از بقیه‌ی زیر گروه‌ها مطالعه شده‌اند. در مورد نشانگرهای مخصوص nTreg - به ویژه در انسان - اختلاف نظر وجود دارد.  $CD25$  که یک پروتئین سطحی است و Forkhead box P3 (foxp3) که یک عامل نسخه‌برداری است، هر دو برای تمایز و عملکرد صحیح nTreg ضروری هستند و نشانگرهای قابل اعتمادی برای این سلول‌ها محسوب می‌شوند (۱۱).

سلول‌های nTreg ابتدا به عنوان مهار کننده‌های سلول‌های T که علیه آنتی‌ژن‌های خود فرد واکنش می‌دهند (سلول‌های T خود واکنشی) و مهار کننده‌های واکنش‌های خود ایمنی شناخته شدند؛ اما اکنون ثابت شده است که این سلول‌ها در سیر بیماری‌های عفونی مزمن نیز اثراتی دارند.

این سلول‌ها التهاب و پاسخ ایمنی شدید را که منجر به پاتولوژی می‌شود، مهار می‌کنند و این کار را هم با واسطه‌ی تماس مستقیم با سایر سلول‌ها و هم با واسطه‌ی موادی که ترشح می‌کنند انجام می‌دهند. nTreg در کنار عملکرد پیش‌گفته، می‌تواند با مهار کردن واکنش‌های ایمنی فاز حاد باعث اختلال در کنترل عفونت و ایجاد عفونت مزمن شود (۱۲-۱۳).

شواهد اخیر در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که nTreg در بیماری لیشمانیوز نقش مهمی دارد و در مدل موشی این عفونت، تعامل بین سلول‌های nTreg و

بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتخاب شدند. رضایت آگاهانه از تمام بیماران گرفته شد و مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسید. بیماران بر اساس طول مدت بیماری به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل ۱۸ بیمار مرد با طول مدت بیماری کمتر از ۴ ماه (گروه بیماران حاد) و گروه دوم شامل ۱۰ نفر (۹ نفر مرد و ۱ زن) با طول بیماری بیشتر از ۶ ماه (گروه بیماران مزمن) بود. افراد با سابقه‌ی بیماری پوستی مزمن یا بیماری داخلی مزمن از مطالعه حذف شدند. مشخصات بالینی بیماران در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. ویژگی‌های بالینی بیماران

| ویژگی                               | ضایعات حاد   | ضایعات مزمن  |
|-------------------------------------|--------------|--------------|
| میانگین سن (دامنه) (سال)            | ۲۵/۴ (۱۶-۴۳) | ۳۶/۹ (۱۶-۵۸) |
| جنسیت (نسبت مرد به زن)              | ۱۸ به ۰      | ۹ به ۱       |
| میانگین طول مدت ضایعه (دامنه) (ماه) | ۱/۹ (۰/۵-۳)  | ۹/۸ (۶-۲۴)   |
| محل ضایعه                           |              |              |
| اندام فوقانی                        | ۱۲           | ۶            |
| اندام تحتانی                        | ۴            | ۳            |
| تنه                                 | ۲            | ۱            |
| صورت                                | ۰            | ۰            |

تشخیص بیماری بر اساس میکروسکوپی اسمیر لام مستقیم از ضایعه بود. در مورد دو بیمار در گروه مزمن اسمیر ضایعه منفی بود؛ اما نتیجه‌ی PCR (Polymerase chain reaction) آن‌ها برای انگل لیشمانیا مثبت بود. نوع انگل با استفاده از روش

سلول‌های T عملگر سیر بیماری را کنترل می‌کند (۱۴). تاکنون مطالعات محدودی به نقش nTreg در لیشمانیوز جلدی انسانی پرداخته‌اند. در یک مطالعه، سلول‌های T که CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>25</sub> بودند و از ضایعات پوستی ناشی از لیشمانیا برزیلینسیس جدا شده بودند، در محیط کشت عملکرد مهاری داشتند؛ اما نقش آن‌ها در پاتوژنز بیماری مشخص نشد. در سری مطالعاتی که بر روی لیشمانیا گویانسیس انجام شد، مشخص گردید که سلول‌های nTreg جدا شده از ضایعات بیماران مبتلا به فرم حاد بیماری، می‌توانستند سلول‌های عملگر اختصاصی علیه لیشمانیا را مهار کنند. همچنین بیان ژن foxp<sub>3</sub> در ضایعات پوستی بیماران، بیش از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی آنان بود که نشان می‌دهد این سلول‌ها از خون محیطی به ضایعه‌ی پوستی جذب شده‌اند. در این بیماران بیان ژن foxp<sub>3</sub> در ضایعات فرم حاد با پیش‌آگهی بد در بیماران ارتباط داشت و در ضایعات مزمن بیشتر بود.

در مورد نقش nTreg در لیشمانیوز دنیای قدیم، مطالعه‌ای انجام نشده بود. در تحقیق حاضر، میزان بیان ژن foxp<sub>3</sub> در ضایعات لیشمانیوز جلدی حاد و مزمن ناشی از لیشمانیا ماژور اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد. همچنین سلول‌های nTreg به کمک نشانگرهای CD<sub>4</sub> و CD<sub>25</sub> و foxp<sub>3</sub> در ضایعات جلدی بیماران شناسایی و مقایسه شدند تا نقش سلول‌های nTreg در مزمن شدن ضایعات مشخص گردد.

## روش‌ها

### بیماران

۲۸ بیمار مبتلا به ضایعات لیشمانیوز جلدی فعال از

نمونه‌ها لیز گردند (۱۶). به وسیله‌ی کیت RNeasy mini از نمونه‌های لیز شده، RNA استخراج شد. سپس به وسیله‌ی کیت QuantiTectRernerse transcription و طبق راهنمای آن، cDNA (Complementary DNA) ساخته شد. کیفیت و کمیت RNA به وسیله‌ی الکتروفورز آگارز ژل و اسپکتروفتومتر تعیین شد. واکنش‌های Real-time PCR با دستگاه (Corbett) ۶۰۰۰ Rotor gene و با استفاده از کیت (Qigen) Quanti fast SYBR green PCR انجام شد. هر واکنش PCR سه بار تکرار شد و ژن شاهد داخلی گلسیرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) یا phosphate Glyceraldehyde ۳-dehydrogenase انتخاب شد. برای ژن  $foxp_3$  و GAPDH، از پرایمرهای طراحی شده‌ی قبلی (۱۷) استفاده شد. معادله‌ی ( $\Delta - \Delta Ct$ ) برای کمی‌سازی بیان ژن  $foxp_3$  نسبت به GAPDH به کار رفت.

### رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

#### رنگ‌آمیزی یگانه

آنتی‌بادی‌های زیر در این مطالعه استفاده شدند: آنتی  $CD_4$  موشی مونوکلونال (رقت ۱ CMG درصد)، آنتی  $CD_{25}$  خرگوشی مونوکلونال (رقت ۰/۵ درصد Santacruz biotechnology)، آنتی  $foxp_3$  موشی مونوکلونال (رقت ۳/۳ درصد Santacruz biotechnology) و آنتی‌بادی‌های ثانویه کنژوگه با FITC (Fluorescein isothiocyanate) ضد خرگوشی از نوع IgG (Immunoglobulin G) (رقت ۱/۲۵ درصد، Sigma). برای نشان‌دار کردن  $CD_{25}$  و کنژوگه با TRITC از نوع IgG (رقت ۲ درصد، Sigma) که برای نشان‌دار کردن  $CD_4$  و  $foxp_3$  استفاده شد.

HRM (High-resolution melting analysis) تعیین شد (۱۵) که در تمام موارد لیشمانیا مازور بود.

### نمونه‌برداری از ضایعات

پس از بی‌حسی موضعی (زیلوکائین/آدرنالین: ۱ به ۱۰۰۰۰۰) نمونه‌برداری با پانچ به قطر ۳/۵ میلی‌متر از حاشیه‌ی فعال ضایعات انجام شد و محل نمونه‌برداری بخیه گردید. از ضایعات گروه بیماران مزمن، دو نمونه برداشته شد. نمونه‌هایی که برای انجام Real-time PCR (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction) در نظر گرفته شدند (۹ نمونه از بیماران گروه حاد و ۸ نمونه از بیماران گروه مزمن) در (Qiagen, Germany) RNAlater قرار داده شدند و در  $-20^{\circ}C$  درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند. نمونه‌هایی که برای رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت در نظر گرفته شده بودند (۹ نمونه از بیماران حاد و ۷ نمونه از بیماران مزمن)، در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $4^{\circ}C$  درجه‌ی سانتی‌گراد فیکس شدند. پس از آبگیری در محلول ساکارز ۳۰ درصد به وسیله‌ی دستگاه کرایوستات (Leica cryocut ۱۸۰۰) برش‌های ۶ میلی‌متری از آن‌ها تهیه شد و در  $-80^{\circ}C$  درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان رنگ‌آمیزی ذخیره شد.

### استخراج RNA و Real-time PCR

برای لیز کردن و هموژنیزه کردن نمونه‌های پوستی از روش لیز کردن با بید استفاده شد. نمونه‌ها وارد لوله‌های Matrix D (MP-Biomedical, Irvine, CA) شدند که حاوی بیدهای سرامیکی به قطر ۱/۴ میلی‌متر و ۶۰۰ میکرولیتر بافر RLT (Qiagen) بود. لوله‌های حاوی نمونه در دستگاه ریبولایزر (Hybaid, UK) قرار داده شدند تا با حرکات چند جانبه و شدید دستگاه

شدند. هر نشانگر در ۱۰ میدان میکروسکوپی تحت بزرگ‌نمایی  $\times 400$  که معادل یک میلی‌متر مربع است، شمرده شد. در مقاطع با رنگ‌آمیزی یگانه، از هر میدان میکروسکوپی دو بار تصویربرداری شد. یک بار برای آنتی بادی نشان‌دار شده‌ی مخصوص و یک بار برای دیدن هسته‌های رنگ شده با DAPI که برای هر تصویربرداری از فیلتر و شدت نور خاص استفاده شد. برای مقاطعی که رنگ‌آمیزی دوگانه شده بودند، از هر میدان میکروسکوپی سه بار تصویربرداری با فیلترهای مخصوص آنتی بادی‌های نشان‌دار و DAPI انجام شد. تصاویر به کمک نرم‌افزار فتوشاپ ترکیب شدند. شمارش سلول‌های مثبت در مقاطع انجام شد و نتایج به صورت تعداد سلول‌های مثبت برای هر نشانگر در میلی‌متر مربع گزارش شد. برای تعیین تعداد سلول‌های  $CD_{25}^+CD_{4}^{++}foxp_{3}^+$ ، تعداد سلول‌های  $CD_{4}^+CD_{25}^+foxp_{3}^+$  از سلول‌های  $CD_{25}^+foxp_{3}^+$  در هر نمونه کم شد تا سلول‌های شمرده‌ی نهایی  $CD_{25}^+foxp_{3}^+$  به طور قطع  $CD_{4}^+$  هم باشند. تعداد سلول‌های Treg به صورت درصدی از کل سلول‌های  $CD_{4}^+$  در هر نمونه گزارش شد.

#### تحلیل آماری

نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) برای آنالیز آماری به کار رفت. از آن جا که شرایط تحلیل آماری پارامتری در این مطالعه فراهم نبود، از آزمون ناپارامتری Mann-Whitney U برای مقایسه‌ی تفاوت بیان ژن و تفاوت تعداد سلول‌های nTreg بین دو گروه استفاده شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

پس از آبدهی مقاطع بافتی، مکان‌های اتصال غیر اختصاصی به کمک BSA ۱۰ mg/ml (Bovine serum albumin) بلوک شدند و مقاطع با آنتی بادی‌های  $CD_{25}$  و  $CD_{4}$  به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس با آنتی‌بادی ثانویه مناسب به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مجاور شدند. برای رنگ‌آمیزی foxp<sub>3</sub> ابتدا مقاطع بافتی به کمک Triton x-۱۰۰ نفوذ پذیر شدند. زمینه‌ی تمام مقاطع بافتی با رنگ DAPI (sigma) (۴,۶-diamidino-۲-phenylindole) رنگ‌آمیزی شد. حذف آنتی بادی اولیه به عنوان شاهد منفی و مقاطع تهیه شده از لوزه‌ی انسان به عنوان شاهد مثبت در کنار رنگ‌آمیزی‌ها استفاده شدند.

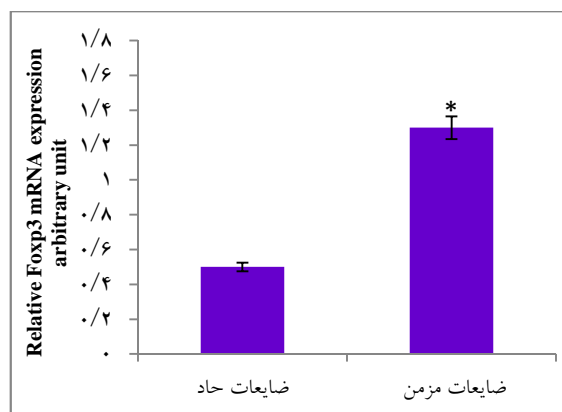
#### رنگ‌آمیزی دوگانه

رنگ‌آمیزی دوگانه برای  $CD_{25}$  و  $CD_{4}$  انجام شد. برای این کار، مخلوطی از آنتی  $CD_{4}$  و آنتی  $CD_{25}$  به عنوان آنتی بادی اولیه و مخلوطی از آنتی بادی‌های ثانویه ضد موش و ضد خرگوش برای مرحله‌ی دوم رنگ‌آمیزی به کار رفتند؛ به طوری که رقت آنتی بادی‌ها در محلول‌ها با رقت‌های استفاده شده در روش رنگ‌آمیزی یگانه، برابر بود. برای رنگ‌آمیزی دوگانه‌ی  $CD_{25}/foxp_{3}$  ابتدا مقاطع با آنتی foxp<sub>3</sub> به صورت شبانه انکوبه شدند و سپس انکوباسیون با آنتی  $CD_{25}$  انجام شد.

#### میکروسکوپی و کمی سازی

مقاطع به کمک میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند (Olympus-Bx-s۱, Japan) و تصاویر با یک دوربین دیجیتال (Olympus-DP-۷۲ Japan) گرفته شدند و از نرم‌افزار Cell\*A برای تحلیل آن‌ها استفاده شد. مقاطع به صورت کدبندی شده و یک سو کور بررسی

بیشتر تجمع‌های سلول‌های T در میان‌درم بودند (شکل ۲).



شکل ۱. بیان طبیعی شده‌ی Foxp3 mRNA که نسبت به بیان ژن Glyceraldehyde ۳-phosphate dehydrogenase (GAPDH) اصلاح شده است، در ضایعات حاد و مزمن بیماران مبتلا به لیشمانیا ماژور

### بحث

در این مطالعه بیان ژن و پروتئین Foxp3 در ضایعات بیماران مبتلا به لیشمانیا ماژور اندازه‌گیری شد. به علاوه، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت دوگانه برای Foxp3/CD25 و CD25/CD4 برای شناسایی nTreg در ضایعات بیماران انجام شد. با این روش، به آسانی این سلول‌ها شناسایی و شمارش شدند و این روش، برتری قابل توجهی نسبت به رنگ‌آمیزی یگانه با روش ایمونوهستئوشیمی داشت.

در ضایعات بیماران گروه مزمن بیان ژن Foxp3 حدود ۲/۳ برابر ضایعات حاد بود و این نشان می‌دهد که nTreg در پاتوفیزیولوژی لیشمانیوز مزمن ناشی از لیشمانیا ماژور نقش دارد. به علاوه، شمارش سلول‌های nTreg با روش ایمونوفلورسنت این نتایج را تأیید کرد (تعداد nTreg در ضایعات مزمن ۲/۲ برابر ضایعات حاد بود).

### یافته‌ها

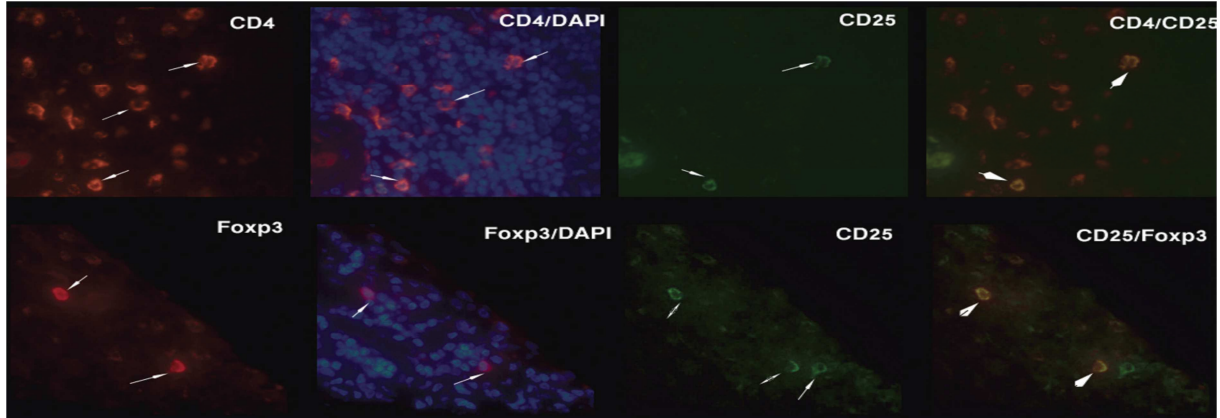
۱- بیان ژن Foxp3 در ضایعات مزمن بیشتر است. میانگین بیان ژن Foxp3 که نسبت به بیان GAPDH اصلاح شده بود، در ضایعات حاد  $0.53 \pm 0.23$  و در ضایعات مزمن  $1.26 \pm 0.99$  بود که به صورت معنی‌داری در ضایعات مزمن بیشتر بود ( $P = 0.007$ ) (شکل ۱). مشابه مطالعات قبلی، میزان بیان ژن Foxp3 در نمونه‌های مختلف به خصوص در نمونه‌های مزمن طیف وسیعی داشت و متفاوت بود. چهار نفر از بیماران گروه مزمن درمان ضد انگلی دریافت کرده بودند، اما در تحلیل آماری میزان بیان ژن Foxp3 در آن‌ها تفاوت معنی‌داری با سایر افراد گروه مزمن نداشت.

۲- تعداد سلول‌های nTreg در ضایعات مزمن بیشتر است.

میانگین درصد سلول‌های Foxp3+ Foxp3- در صورت  $CD4+CD25+$ ،  $CD4+CD25+$  و  $CD4+Foxp3+$  به صورت معنی‌داری در ضایعات مزمن بیشتر از ضایعات حاد بود. (جدول ۲). در همه‌ی نمونه‌ها سه نشانگر مورد نظر مثبت بودند، اما تفاوت تعداد سلول‌های مثبت بین نمونه‌ها زیاد بود. ضایعات مزمن به صورت معنی‌داری تعداد سلول  $CD4+$  کمتری داشتند، اما نسبت سلول‌های Treg به سلول‌های  $CD4+$  (T کمک دهنده) در آن‌ها بیشتر بود. در مقاطع تهیه شده از لوزه، هر دو نوع سلول  $CD4+CD25+$  و  $CD4+Foxp3+$  وجود داشتند، اما در نمونه‌های بیماران سلول‌های  $CD4+CD25+$  خیلی کم (کمتر از ۱ درصد) بود و سلول‌های  $CD4+Foxp3+$  دیده نشدند. از آن‌جا که نمونه‌ها از حاشیه‌ی غیر زخمی ضایعات برداشت شده بودند سلول‌های التهابی خیلی کم در اپیدرم وجود داشتند و

جدول ۲. فراوانی نشانگرهای سلول Treg در ضایعات حاد و مزمن لیشمانیوز جلدی

| (%) CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> CD <sub>25</sub> <sup>+</sup> foxp <sub>3</sub> <sup>+</sup> | foxp <sub>3</sub> <sup>+</sup> CD <sub>25</sub> <sup>+</sup> | (%) CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> CD <sub>25</sub> <sup>+</sup> | CD <sub>25</sub> <sup>+</sup> per mm <sup>2</sup> | CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> per mm <sup>2</sup> |             |
|---|--|--|---|--|-------------|
| ۱۱/۸۵ ± ۴/۵۷  | ۱۳/۰۱ ± ۵/۷۵   | ۱۶/۶۱ ± ۶/۹۷   | ۱۶/۵۵ ± ۱۰/۳۹                                     | ۸۷/۱۱ ± ۴۴/۲۶                                    | ضایعات حاد  |
| ۲۶/۶۵ ± ۱۴/۹۱   | ۲۸/۸۶ ± ۱۲/۶۳  | ۳۲/۵۰ ± ۱۲/۴۳  | ۹/۴۲ ± ۷/۰۶                                       | ۲۷/۲۹ ± ۱۶/۱۶                                    | ضایعات مزمن |
| ۰/۰۴۰   | ۰/۰۰۵  | ۰/۰۱۰  | ۰/۲۵۰   | ۰/۰۰۱  | مقدار P     |



شکل ۲. رنگ‌آمیزی دوگانه‌ی نشانگرهای CD<sub>4</sub>/CD<sub>25</sub> و CD<sub>25</sub>/Foxp<sub>3</sub> در دو برش از نمونه‌های بیماران. فلش‌ها نشان دهنده‌ی سلول‌های مثبت و سرفلش‌ها نشان دهنده‌ی سلول‌های مثبت دوگانه هستند که به دلیل ادغام رنگ‌های قرمز و سبز با رنگ نارنجی رنگ شده‌اند. Foxp<sub>3</sub> هم سیتوپلاسم سلول و هم هسته را رنگ‌آمیزی می‌کند، در نتیجه هسته‌های آبی رنگ با لکه‌های Foxp<sub>3</sub> هم‌پوشانی دارند.

بیماری نداشت (۲۰). لیشمانیا ماژور سابقه‌ی طولانی همزیستی با انسان دارد و به خوبی با انسان هماهنگ و منطبق شده است. در نتیجه، پاسخ‌های ایمنی به آن بسیار با لیشمانیا گویانسیس و سایر کمپلکس‌های انگلی دنیای جدید متفاوت است.

بیشتر مطالعاتی که در زمینه‌ی nTreg انجام شده است، بر روی مدل حیوانی لیشمانیا ماژور بوده است. جالب آن که نقش nTreg در پیشرفت بیماری در این مدل‌ها هم به گونه‌ی موش و هم به گونه‌ی انگل بستگی دارد. Belkaid و همکاران نشان دادند که در ضایعات خود محدود شونده، در اثر تلقیح لیشمانیا ماژور به موش C57BL/6 تعدادی انگل زنده باقی می‌مانند که این انگل‌ها ایمنی طولانی مدت را در موش ایجاد می‌کنند (۲۱). سلول‌های nTreg در این

در مطالعات گذشته Bourreau و همکاران گزارش دادند که بیان ژن foxp<sub>3</sub> در ضایعات ناشی از عفونت لیشمانیا گویانسیس حدود ۸ برابر ضایعات حاد است (۱۸). نتایج مطالعه‌ی ما تفاوت کمتری را بین دو گروه نشان داد (۲/۳ برابر). تفاوت گونه‌ی انگل عامل بیماری، می‌تواند این تفاوت را توجیه کند؛ چرا که هر گونه انگل لیشمانیا مجموعه‌ی خاص از پاسخ‌های ایمنی را برمی‌انگیزد. مطالعات حیوانی قبلی این موضوع را تأیید می‌کنند. در مدل عفونت با لیشمانیا آمازونسیس، سلول‌های nTreg اثرات مفیدی بر بهبود ضایعات داشتند و ایمونوپاتولوژی را کم می‌کردند (۱۹)، اما در عفونت لیشمانیا مکزیکانا حذف سلول‌های CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> سیر بیماری را تغییر ندادند. در نتیجه، nTreg در ظاهر اثری در این مدل

۱۰، TGF- $\beta$ ، اینترلوسین ۳۵ و cAMP (Cyclic adenosine monophosphate) را برای کنترل سلول‌های عملگر به کار می‌برند، (۱۱).

هنوز مشخص نیست که سلول‌های nTreg تا چه حد و چگونه بر لیشمانیوز حاد یا مزمن اثر می‌کنند و از چه مکانیسم‌هایی برای عملکرد مهاری خود استفاده می‌کنند. به علاوه، نقش سایر زیر گروه‌های Treg در این بیماری مشخص نیست و تحقیقات وسیع‌تری برای روشن کردن این موضوعات لازم است. این تحقیقات با روشن کردن وضعیت تعادل سلول‌های تنظیمی به سلول‌های عملگر می‌توانند راه حل‌های درمانی به خصوص برای فرم‌های مزمن لیشمانیوز پوستی ابداع کنند.

تفاوت در بیان ژن و تعداد سلول‌های nTreg در نمونه‌های بیماران در سایر بیماری‌ها از جمله پسوریازیس، درماتیت اگزمایی و آلرژی فصلی، همچنین در پوست سالم دیده شده است (۲۷-۲۹). این موضوع می‌تواند به علت تماس‌های خاص هر فرد با عوامل آلرژن یا پاتوژن و یا به علت تفاوت در مرحله‌ی بیماری و نوع پاسخ ایمنی در آن فرد باشد.

این تحقیق اولین تجربه در زمینه‌ی نقش nTreg در عفونت انسانی لیشمانیا ماژور است. گرچه مکانیسم‌های عمل سلول‌های تنظیمی در این مطالعه بررسی نشد، اما این مطالعه قدم مؤثری در جهت انجام سایر تحقیقات تکمیلی در این زمینه است.

مدل، محیط امنی برای این انگل‌ها فراهم می‌کنند و در نتیجه، هم انگل امکان زنده ماندن و انتقال به میزبانان دیگر را پیدا می‌کند و هم میزبان به عفونت مجدد ایمنی پیدا می‌کند (۲۱).

در تجربه‌های دیگری عفونت با سویه‌ی مقاوم لیشمانیا ماژور در موش C57BL/6 باعث ضایعات مزمنی شد که زخمی بودند و بار انگلی زیادی داشتند که این به خاطر تجمع nTreg در این زخم‌ها و مهار پاسخ Th<sub>۱</sub> بود (۲۲).

در موش حساس BALB/C سلول‌های nTreg پاسخ ابتدایی Th<sub>۲</sub> را مهار می‌کردند و باعث محدود شدن تکثیر انگل و اندازه‌ی زخم می‌شدند (۲۳).

هیچ کدام از این مدل‌های حیوانی به طور کامل با بیماری انسانی مشابهت ندارند. به علاوه، زیر گروه‌های متعددی از سلول‌های تنظیمی از جمله Treg القایی و سیتوکین‌های مهاری مانند اینترلوکین ۱۰ و TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) ممکن است باعث مهار پاسخ ایمنی در بیماری لیشمانیوز شوند (۲۴).

در دو مطالعه‌ی مجزا در مدل‌های مزمن بیماری، اینترلوکین ۱۰ مشتق از سلول‌های عملگر در ضایعات مزمن نقش مهمی در مهار پاسخ ایمنی در محل عفونت داشتند (۲۵-۲۶). سلول‌های Treg همچنین مکانیسم‌های متنوعی از جمله تماس مستقیم سلول با سلول، ترشح مولکول‌های مهاری مثل اینترلوکین

## References

1. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis 1996; 22(1): 1-13.
2. Nylen S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. J Glob Infect Dis 2010; 2(2): 135-46.
3. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: an overview. J Postgrad Med 2003; 49(1): 50-4.
4. Karamian M, Motazedian MH, Fakhari M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous



- leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22(8): 958-62.
5. Louis J, Himmelrich H, Parra-Lopez C, Tacchini-Cottier F, Launois P. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(4): 459-64.
  6. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 151-77.
  7. Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol* 1999; 91(3): 314-20.
  8. Louzir H, Melby PC, Ben SA, Marrakchi H, Aoun K, Ben IR, et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* 1998; 177(6): 1687-95.
  9. Ajdary S, Jafari-Shakib R, Riazi-Rad F, Khamesipour A. Soluble CD26 and CD30 levels in patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *J Infect* 2007; 55(1): 75-8.
  10. Jafari-Shakib R, Shokrgozar MA, Nassiri-Kashani M, Malakafzali B, Nikbin B, Khamesipour A. Plasma sCD26 and sCD30 levels in cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2009; 109(1): 61-3.
  11. Shalev I, Schmelzle M, Robson SC, Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol* 2011; 23(4): 282-92.
  12. Belkaid Y, Sun CM, Bouladoux N. Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(4): 406-12.
  13. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 353-60.
  14. Sacks D, Anderson C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev* 2004; 201: 225-38.
  15. Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid diagnosis of Old World Leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J Clin Microbiol* 2010; 48(6): 2240-2.
  16. Berglund SR, Schwiertert CW, Jones AA, Stern RL, Lehmann J, Goldberg Z. Optimized methodology for sequential extraction of RNA and protein from small human skin biopsies. *J Invest Dermatol* 2007; 127(2): 349-53.
  17. Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K, Horiuchi Y, Onda K, et al. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 2009; 128(3): 405-19.
  18. Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte MD, Clity E, et al. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 2009; 77(4): 1465-74.
  19. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 2005; 174(11): 7147-53.
  20. Thomas BN, Buxbaum LU. FcγRIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun* 2008; 76(2): 623-31.
  21. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420(6915): 502-7.
  22. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2005; 174(5): 2934-41.
  23. Aseffa A, Gumy A, Launois P, MacDonald HR, Louis JA, Tacchini-Cottier F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2002; 169(6): 3232-41.
  24. Wohlfert E, Belkaid Y. Role of Endogenous and Induced Regulatory T Cells During Infections. *J Clin Immunol* 2008; 28(6): 707-15.
  25. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007; 204(2): 285-97.
  26. Nagase H, Jones KM, Anderson CF, Noben-Trauth N. Despite increased CD4+Foxp3+ cells within the infection site, BALB/c IL-4 receptor-deficient mice reveal CD4+Foxp3-negative T cells as a source of IL-10 in *Leishmania major* susceptibility. *J Immunol* 2007; 179(4): 2435-44.
  27. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(6): 1467-72, 1472.
  28. Bovenschen HJ, van Vlijmen-Willems IM, van de Kerkhof PC, van Erp PE. Identification of lesional CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in Psoriasis. *Dermatology* 2006; 213(2): 111-7.
  29. de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, van der Wal AC, Teunissen MB. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem* 2007; 55(9): 891-8.

## Regulatory T-cell Profile in Early and Late Lesions of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania Major*

Shervin Ghaffari-Hoseini<sup>1</sup>, Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD<sup>2</sup>, Syyed Hamid Zarkesh PhD<sup>3</sup>, Ali Khamesipour<sup>4</sup>, Laleh Rafiei<sup>2</sup>, Khadijeh Karbalaie<sup>5</sup>, Mohamad Ali Nilforoushzadeh MD<sup>6</sup>, Mehdi Baghaei PhD<sup>7</sup>, Seyed Hossin Hejazi PhD<sup>8</sup>

### Original Article

### Abstract

**Background:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is a public health problem in several endemic countries. Recent studies on mouse model and a few clinical experiments showed that the type of immune response generated at the site of infection and especially balance between regulatory and effector T-cells determines the outcome of the disease toward self-limiting or long-lasting lesions. The aim of this study was to evaluate the role of natural regulatory T-cells (nTregs) in early and late cutaneous lesions of human *Leishmania major* (*L. major*) infection.

**Methods:** Skin biopsies were collected from parasitologically proven lesions of 28 patients with cutaneous leishmaniasis, divided into two groups of early and late lesions. The causative agents were identified to be *L. major*. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) and immunofluorescent staining of biopsies were used to assess the Foxp3 mRNA expression and frequency of nTregs in two groups. Mann-Whitney *U* test was used to determine the significance of differences between the two groups.

**Findings:** Mean relative expressions of Foxp3 mRNA were  $0.53 \pm 0.23$  and  $1.26 \pm 0.99$  in early and late lesions, respectively, which was significantly upper in chronic lesions ( $P = 0.007$ ). Parallel results were obtained in tissue staining method.

**Conclusion:** Increased in gene expression and protein staining of nTreg markers in chronic biopsy samples indicates a role for these cells in chronic *L. major* induced leishmaniasis and supports the effectiveness of regulatory T cell-based immunotherapy for treatment of chronic cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** Cutaneous, Fluorescent antibody technique, *Leishmania major*, Leishmaniasis, Real-time reverse transcription polymerase chain reaction, Regulatory T-cells

**Citation:** Ghaffari-Hoseini Sh, Haghjooy-Javanmard Sh, Zarkesh SH, Khamesipour A, Rafiei L, Karbalaie Kh, et al. **Regulatory T-cell Profile in Early and Late Lesions of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania Major***. J Isfahan Med Sch 2014; 31(269): 2326-35

1- Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Department of Physiology, Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Center for Research in Skin Disease and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Department of Cell and Molecular Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Animal Biotechnology, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Isfahan, Iran

6- Associate Professor, Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

7- Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shrekord, Iran

8- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.mui.ac.ir