پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۰ (۲۹۴-۲۸۵)

بررسی اثر درمانی سایتوکین IL22 بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

هاجر ضیایی هزار جریبی[۱]
فاطمه غفاری فر[۲]
عبدالحسین دلیمی اصل[۲]
زهره شریفی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: IL۲۲ یک سیتوکین عضو خانواده IL۱۰ است که به وسیله سلول‌های NK و Th ۲۲ و Th۱۷ ایجاد می‌شود و اخیراً نقش IL۲۲ در ایجاد حفاظت و مکانیسم دفاع ذاتی، در کنترل عفونت‌های باکتریال، ویرال، هموستازی و ترمیم بافت ثابت شده است. لذا در این تحقیق اثر درمانی IL۲۲ بر زخم ناشی از لیشمانیاماژور در موش BALB/c بررسی شد.

مواد و روش ها: ۲۴ سرموش BALB/c ماده ۸ هفته را با تعداد حداقل ۲×۱۰۶ پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور L.major سویه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ازطریق تلقیح زیرجلدی چالش نموده و به سه گروه ۸تایی موش‌ها IL۲۲ نوترکیب موشی را در دو دوز مختلف ۵ ng /ml و ۱۰ ng /ml به صورت IM تزریق نمودیم. بررسی ایمنی سلولاروهومورال با سنجش سایتوکین‌های IL- ۴ و گامااینترفرون و کشت سلول‌های لنفوسیت طحال و بررسی IgG2a,IgG Total با روش الیزا و انجام روش رنگ سنجی MTT و بررسی‌های بالینی با اندازه‌گیری روند زخم، و طول عمر موش‌ها و ثبت مرگ و میر انجام شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان می‌دهد که رشد زخم به‌صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL- ۲۲ کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با (۵ng) IL ۲۲ بوده است. ng ۵-۲۲ IL سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید اینترلوکین ۴ شده است نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که میزان گاما اینترفرون و IGg total گروه تحت درمان با ng ۵-۲۲ IL با p <۰/۰۵ نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان ۴ IL گروه تحت درمان با ng ۵-۲۲ IL با p <۰/۰۵ نسبت به ng ۱۰-۲۲ IL معنی‌دار نیست ولی با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IGg2a گروه تحت درمان با ng ۵-۲۲ IL با p <۰/۰۵ نسبت به ng ۱۰-۲۲ IL معنی دار نیست ولی باسایر گروه‌ها اختلاف معنی دار است.

استنتاج: MTT درگروه دریافت کننده ng ۵-۲۲ IL با ng ۵-۲۲ IL با افزایش تولید گاما اینترفرون وکاهش تولید اینترلوکین ۴ سبب ایجاد پاسخ‌های سایتوکین Th1 شده و سبب ایجاد پاسخ حفاظتی در مقابل انگل لیشمانیا میشود لذا اگر با داروهای ضد لیشمانیا تواما تجویز شود شاید اثرات بهتری را در درمان بر علیه لیشمانیا فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین۲۲، گاما اینترفرون، اینترلوکین۴، لیشمانیاماژور و موش BALB/c

مقدمه

لیشمانیازیس بیماری ناشی از انگل داخل سلولی است که توسط گونه‌های مختلف لیشمانیا ایجاد می‌شود. ماهیت بالینی آن از زخم پوستی تا فرم سیستمیک کشنده است گرچه جز بیماری‌های فراموش شده است ولی

مولف مسئول: فاطمه غفاری فر- تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی E mail: ghafarif@modares.ac.ir
۱. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران (دانشجوی دکترای انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس)
۲. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران
تاریخ دریافت : ۹۰/۱۰/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۱۱/۱۹ تاریخ تصویب : ۹۰/۱۲/۹

Archive of SID
www.SID.ir

دومین عامل مرگ و میر و چهارمین عامل شیوع بیماری‌های عفونی در مناطق گرمسیری است(۱،۲). بیماری لیشمانیازیس در ۸۸ کشور اندمیک می‌باشد حدود ۱۵ میلیون نفر به آن مبتلا بوده و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض. خطر آلودگی هستند و تعداد موارد جدید سالانه حدود ۲ میلیون نفر می باشد. که ۱/۵ میلیون نفر مربوط به لیشمانیازیس جلدی و ۰/۵میلیون مربوط به لیشمانیازیس احشایی هستند به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی بعد از مالاریا، لیشمانیازیس را در اولویت قرارداده است(۳). گرچه لیشمانیوز جلدی در بیش از ۸۰ کشور جهان گزارش شده ۹۰ درصد موارد آن در ۶ کشور جهان افغانستان، ایران، برزیل، پرو، عربستان و سوریه قرار گرفته است(۲، ۴).

تغییر روند بیماری سالک در سال‌های اخیر، نمایان‌گر افزایش موارد بیماری می‌باشد. لیشمانیوز پوستی گرچه از لحاظ مرگ و میر مشکل زیادی به وجود نمی‌آورد ولی به دلیل طولانی بودن دوره زخم و هزینه‌های سنگین درمانی، وجود جوشگاه زخم، احتمال ایجاد عفونت‌های ثانویه و یا ایجاد عوارض و گاهی بدخیمی‌هایی در محل اسکار و عوارض ناشی از درمان با داروهای موجود مشکلات مختلفی را ایجاد می‌کند .هدف از درمان بیماری بهبود سریع زخم عدم ایجاد جوشگاه و جلوگیری از عفونت ثانویه است(۵،۶). استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان که ازسال ۱۹۱۱ جهت درمان اشکال مختلف بالینی لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته است دارای عوارض جانبی متعدد بوده و نیز در روش استفاده تزریقی از آن به‌دلیل دردناک بودن آن و طولانی بودن مدت استفاده آن که سبب تزریقات مکرر دارو می‌شود سبب شده تا از روش‌های درمانی جایگزین استفاده (۷،۸).

۲۲ IL یک سیتوکین عضو خانواده ۱۰- IL است و اعضای این خانواده سایتوکاینی شامل ۱۰- IL و ۱۹- IL و ۲۰- IL و (۲۴- IL) ۷ MDA و (TIF)IL و ۲۲ IL و ۲۶- IL چنان‌که می‌دانیم ۱۰IL به‌عنوان سردسته این خانواده سایتوکاین،یک مهارکننده مؤثر ایمنی سلولی و تقویت‌کننده قوی ایمنی هومورال است(۹). گرچه اعضای این خانواده مشترکات ساختمانی بسیار زیادی دارند ولی از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمنولوژیک تفاوت‌های فاحشی بین آن‌ها وجود دارد. لوکوس‌ژنی رسپتورهای این خانواده سایتوکاینی نیز بر روی کروموزوم‌های مختلفی واقع شده‌اند و مشخص شده که پدیده پلئوتروپیسم (تأثیر چند سایتوکاین برروی یک رسپتور) و هم پوشانی Redundancy (تأثیر یک سایتوکاین روی چند رسپتور) در مورد رسپتورهای این خانواده وجود دارد. این سایتوکاین دارای خاصیت پلئوتروبیک هم در داخل سیستم ایمنی و هم در خارج آن می‌باشد رسپتور هترودیمر IL22 شامل گیرنده (CRF ۲-۴) ۱۰- IL زنجیر R- IL۲۲ و IL۱۰ R۲ و IL۱۰ R۳ (CRF ۲-۹) است که علی رغم داشتن این رسپتور مشترک پاسخ ۲۲- IL مستقل از ۱۰- IL است(۱۲-۹). IL۲۲ که به آن IL-TIF و ۱۰ IL related Tcell- derived inducible factor نیز گفته می‌شود توسط Th۱۷ خصوصاً NK Cells و Th۲۲ و (CCR۱۰) و TCells(Th۱) به محض فعال شدن به ۴- IL و همچنین به‌وسیله ماست سل‌های تیموس و مغز پس از فعال شدن با ConA ترشح می‌شود و از معدود سایتوکاین‌های است که وجودش حتی در غیر از پستانداران نظیر ماهی‌ها به اثبات رسیده است(۱۱، ۱۳). ۴-۲ CRF بین ۲۲- IL و ۱۰- IL مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است درحالی که ۹-۲ CRF مختص ۲۲- -IL است و دارای هومولوژی با دومین زنجیره گیرنده ۱۰- IL است. وجود ۹-۲ CRF و ۴-۲ CRF یعنی دو زنجیره گیرنده این سایتوکاین در سیگنالینگ مؤثر هستند و در مسیر سیگنالینگ این سایتوکاین STAT شامل STAT۱ و STAT۳ و STAT۵ فعال شده و متعاقب آن تولید پروتئین‌های فاز حاد از کبد افزایش می‌یابد و نقش این سایتوکاین را به‌عنوان یک سایتوکاین التهابی تثبیت می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

IL-۲۲ باعث فعال‌سازی JAK۱، TYK۲، STAT۱، STAT۳ و STAT ۵ و مسیر MAP کیناز می‌شود.

امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجدگیرنده برای این سایتوکاین هستند(۱۶-۱۱). IL- ۲۲ هم نقش مضر وهم نقش محافظتی دارد و اثر زیان‌آور آن در القای هیپرپلازی اپی‌تلیال پوست در بیماری پسوریازیس انسانی است و یا IL- ۲۲ همراه با IL- ۱۷ سیتوکین‌های پیش‌التهابی را در سلول‌های برونشیال اپی‌تلیال و میوفیبروبلاست‌های کولون تحریک می‌کند و سبب ایجاد آلرژی و کولیت می‌شود(۱۷، ۱۸). از طرفی اثر محافظتی IL۲۲ رباکتری گرم منفی عامل بیماری پنومونی که IL ۲۲ ترشح عامل ضد میکروبی را در سلول‌های اپی‌تلیال ریوی افزایش می‌دهد(۱۸). IL۲۲ به تنهایی نه با IL- ۱۷ در کبد مبتلا به هپاتیت با پیشگیری از آپتوزیس هپاتوسیت‌ها را محافظت می‌کند(۱۹). در پوست IL- ۲۲ سبب القای پپتیدهای ضدمیکروبی می‌شود و تکثیر کراتینوسیت‌ها را افزایش و تمایز آن‌ها را مهار می‌کند و یک نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد(۱۶). نقش IL- ۲۲ در اختلالات پوستی نظیر AE (Atopic eczema) درماتیت (ACD) Allergic contact dermatitis حساسیتی تماسی ناشناخته است(۱۶). IL- ۲۲ تولید شده به‌وسیله سلول‌های NK رشد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را با فعال کردن ماکروفاژها وافزایش فعالیت فاگولیززوم مهار می‌کند(۲۰). IL- ۲۲ یک اثر حفاظتی در بیماری کالازار انسانی دارد و لیشمانیا دونوانی تمایز سلول‌های Th- ۱۷ و IL- ۲۲ و گاما اینترفرون تحریک می‌کند(۲۱).

با توجه به این‌که هنوز عواملی که صددرصد در جهت بهبودی و در روند مشکلات ریشه‌کنی انگل و مشکلات مربوط به کنترل ناقلین بند پا باشد تعریف نشده است و اخیراً نیز نقش IL- ۲۲ در ایجاد حفاظت و مکانیسم دفاعی ذاتی خصوصاً اجرام داخل سلولی ثابت شده لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر درمانی IL- ۲۲ بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c می‌باشد.

مواد و روش ها

آماده سازی و تزریق سایتوکین IL ۲۲

IL۲۲ موشی از شرکت R&D با Cat.number 582-L براساس دستور برنامه در PBS استریل به‌صورت ۱ درصد در BSA آماده شد.

آماده سازی موش‌ها به تعداد ۳۲ سرموش سفید کوچک ماده خالص BALB/c inbred به دلیل حساس بودن به پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در سن ۸ هفتگی از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج به‌عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی در این تحقیق انتخاب و خریداری شدند و تحت شرایط استاندارد از لحاظ آب و غذا نگهداری شدند. گروه‌بندی موش‌ها بر اساس نوع ماده تزریقی انجام شد. روش آلوده‌سازی موش‌های BALB/c با انگل لیشمانیا ماژور صورت گرفت که کل موش‌ها با تعداد حداقل ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژورL.major سویه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا (stationary) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ازطریق تلقیح زیرجلدی در قاعده دم چالش شده که بعد از۴-۳ هفته بعد از تزریق در لمس ناحیه تزریق برجستگی و ندول احساس می‌شد و سپس زخم حاصل از رشد انگل در قاعده دم موش تشکیل شد. قبل از شروع درمان از تمامی زخم‌ها نمونه‌برداری شد و بعد از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۲۴موش به سه گروه ۸ تایی، یک گروه ۸ تایی دریافت‌کننده PBS به‌عنوان گروه کنترل (۱۰۰ میکرو لیتر و ۱۶موش دیگر درد و گروه ۸ تایی IL-22 را در دو دوز مختلف ۵ng/ml و ۱۰ng/ml به‌صورت داخل عضلانی و تک‌دوز در عضله چهار سر ران quadriceps در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سورنگ انسولین با سرسوزن ۳۰gauge دریافت نمودند. تعداد ۴ موش در هر گروه برای بررسی ایمنی هومورال و سلولار و تعداد ۴ موش دیگر در هرگروه برای بررسی طول عمر و بررسی قطر زخم و وضعیت مرگ ومیر آن‌ها چالش می شوند(۲۲).

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی ایمنی سلولا روهومورال

بررسی ایمنی سلولاروهومورال با سنجش سایتوکین‌های IL- ۴ و گاماااینترفرون و بررسی TgG Total و IgG۲a و MTT و بررسی‌های بالینی با اندازه‌گیری قطر زخم و ثبت مرگ و میر به‌طور هفتگی بررسی شدند. برای بررسی ایمنی هومورال ۷ هفته بعد از چالش با انگل به کمک لوله‌های موئینه از گوشه، چشم موش‌ها خونگیری انجام شد. سرم جدا شد. سپس سرم خون موش‌ها برای بررسی ایمنی هومورال جمع‌آوری و در فریزر-۲۰ نگهداری شدند. سرم‌های گرفته شده ازموش‌های کنترل و موش‌های دریافت‌کننده IL۲۲ با آزمایش الیزا طی مراحل مختلف زیر به انجام پذیرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن با غلظت‌های ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر کربنات- بی‌کربنات ۰/۱ مولاربه همه چاهک‌ها بجز چاهک‌های کنترل بلانک در پلیت‌های الایزا ریخته شد. و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه و یا یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. تا آنتی‌ژن به کف پلیت کوت شود. پس از شستشو با بافر PBST، ۵- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده (۱/۱۰) در بافر رقیق‌کننده (PBS) به حفرات اضافه شده و پلیت‌ها ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از شستشو با بافر PBST، ۱۰۰ میکرولیتر Anti mouse HRP conjugate با رقت ۱/۱۰۰۰۰ در PBS یا بافر رقیق‌کننده، رقیق نموده و در حفرات ریخته شده و پلیت‌ها ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. شستشوی پلیت‌ها با بافر PBST،وبا اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB به همه چاهک‌ها و پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در محل تاریک و یا ۳۷ درجه انکوبه شدند، اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ مولار برای توقف واکنش به همه چاهک‌ها پلیت‌ها بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای اندازه‌گیری میزان جذب نوری قرائت می شود. برای بررسی ایمنی سلولار ۷ هفته بعد ازچالش باانگل اندازه‌گیری سایتوکاین‌های گاما اینترفرون و ۴ IL ایمنی سلولی مورد بررسی قرار گرفت. ۷ هفته پس ازچالش با انگل استخراج لنفوسیت از طحال موش‌های مورد و شاهد به صورت زیر انجام گرفت.

ابتدا موش‌های کشته شده و از سلول‌های طحال موش در شرایط استریل در محلول PBS سوسپانسیون سلولی تهیه شد. رسوب سلول ها پس از شستشو و سانتریفیوژ با محیط RPMI 1640 که حاوی ۱۰ FCS درصد است، به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد و کشت سلول‌های لنفوسیت طحال موش جهت بررسی وجود سایتوکائین‌های IFN-γو ۴IL در پلیت ۲۴ خانه‌ای به تعداد $۲/۵\times۱۰^{۶}$ کشت داده شد. از سوپ سلولی لنفوسیت‌های طحالی موش‌های چالش شده و درمان شده پس از در ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت جمع‌آوری شد و در ویال اپندورف جمع شده و در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی در مقادیر ۳۰۰ میکرولیتر در ویال‌ها تقسیم شده و تا زمان سنجش سایتوکائین در دمای $۷۰^{o}C$- نگهداری شدند(۲۳) وسپس جهت بررسی وجود سایتوکین‌های گاما اینترفرون و اینترلوکین ۴ از سوپ سلولی لنفوست‌های طحال موش‌های دریافت‌کننده IL۲۲ و PBS که در- ۷۰ نگهداری شده استفاده گردید وبا روش الیزا و با استفاده ازکیت شرکت U-cytech- biosciences استفاده شد.

روش MTT برای سنجش تکثیر لنفوسیت ها

از روشMTT برای بررسی پرولیفراسیون لنفوسیتها به‌صورت زیر استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لنفوسیتی استخراج شده به هر چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول اضافه شد (یعنی ۳۰۰/۰۰۰ سلول به ازای هر چاهک). سوسپانسیون حاصل از طحال هر موش در ۳ چاهک کشت داده شد.

به دو چاهک از هر گروه، 50 میکرو گرم در میلی لیتر از آنتی ژن انگل لیشمانیا ماژور افزوده شد به یک چاهک دیگر همان گروه هیچ آنتی‌ژنی اضافه نگردید. حجم نهایی هر چاهک با FBS ۱۰ درصد+ RPMI به

Archive of SID

www.SID.ir

۲۰۰ میکرولیتر رسید.

بعد از چاهک‌های هر گروه، ۲ چاهک به عنوان کنترل کشت داده می‌شود که یکی از این چاهک‌ها با PHA فیتوهماگلوتینین به عنوان میتوژن تحریک شده و دیگری تحریک نمی‌شود. پلیت‌های کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷oC دارای ۵ درصد CO2 قرار می‌گیرد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک حاوی 200λ لنفوسیت مقدار(۲۰λ) از محلول MTT (غلظت ۵ mg/ml) اضافه گردید. پلیت مذکور مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO2 انکوبه شد(تا بلورهای فورمازان نمایان شوند). سوپ سلولی به آرامی بدون هم زدن محتویات چاهک‌ها سانتریفوژ شده محتویات رویی و به طور کامل خارج شد. به هر چاهک به مقدار ۱۰۰ λ از DMSO اضافه گردید. جذب حاصل در طول موج ۴۵۰ nm توسط دستگاه Reader Elisa خوانده شد.

- نتایج آزمایش به صورت اندیکس تحریک SI محاسبه گردید(۲۴).

بررسی زخم موش های درمان شده و کنترل

برای بررسی میزان آلودگی در موش‌ها در شروع و یک و سه و چهار هفته بعد از درمان نمونه‌گیری و تهیه اسمیر از زخم و شمارش تعداد انگل(آماستیگوت) در ۱۰ شان انجام شد. اندازه‌گیری قطر زخم، پس از چالش و ظاهر شدن زخم در قاعده دم موش با استفاده از کولیس دیجیتال به‌طور هفتگی اندازه‌گیری شد. بدین‌نحو که حاصل جمع طول و عرض قطر زخم بر عدد ۲ تقسیم و به عنوان عدد مربوط به قطر زخم در نظر گرفته می شد. وزن موش‌ها طی درمان به‌صورت هفتگی با ترازو کشیده و یادداشت گردید.

آنالیز آماری

نتایج به‌دست آمده از ندازه گیری گاماااینترفرون و IL ۴ و توتالIgG و MTT و وa IGg ۲ و بررسی قطر زخم و بقاء موش‌ها در گروه‌های کنترل و مورد با اطلاعات نرم‌افزار SPSS وارد شدو از آزمون ANOVA ONE WAY و برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون‌های تعقیبی LSD و TUKEY استفاده شد.

یافته ها

نتایج مطالعه نشان داد که اثر درمانی IL۲۲ در دو دوز ۵ و ۱۰ نانو گرم نسبت به گروه کنترل PBS گسترش زخم را به تأخیر می‌اندازد و رشد زخم به صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng بوده است و شروع بروز زخم در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng (۵۱) روز پس از درمان بوده در صورتی‌که در سایر گروه‌ها(۳۰) روز پس از درمان بوده است (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: میانگین و انحراف معیار اندازه زخم در روزهای مختلف بعد از درمان بادوزهای ۵ و ۱۰ نانوگرم IL۲۲ در عفونت لیشمانیاماژور موش BALB/c

Group	IL22-5n		IL22-10n		PBS	
Day	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
۳۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۵۰	۰/۵۸	۲/۴۴	۰/۶۳
۳۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۵۵	۰/۶۴	۳/۹۸	۱/۶۱
۴۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۷۲	۱/۴۵	۸/۰۵	۳/۲۹
۵۱	۰/۲۵	۰/۵۰	۱/۶۰	۰/۴۹	۱۱/۷۸	۲/۷۰
۵۸	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۱۰	۰/۲۰	۱۸/۴۹	۹/۵۵
۵۶	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۹۴	۰/۷۶	۲۰/۰۵	۱۱/۳۷
۷۲	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۳۹	۰/۸۱	۲۸/۶۲	۹/۳۳
۷۹	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۱۳	۱/۶۲	۳۰/۰۱	۸/۸۲
۸۶	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۴۲	۰/۶۸	۳۲/۸۰	۲/۹۰
۹۳	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۱۲	۱/۴۳	۳۲/۷۳	۴/۴۴
۱۰۰	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۴۸	۰/۶۳	۳۲/۴۳	۴/۳۵
۱۰۷	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۳۴	۰/۵۵	۳۲/۶۳	۴/۴۱
۱۱۴	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۳۴	۰/۵۹	۳۲/۴۴	۳/۸۲

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، ۱۰ng - ۲۲ و IL ۲۲-۵ng نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح $p<۰/۰۰۰$ در ۴ گروه حداقل دریک زوج گروه اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. برای آشکار سازی این اختلاف‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که در گروهIL۲۲ -۵Ng با $p<۰/۰۵$ با دو گروه دیگر در روزهای ۳۰ و۳۷

Archive of SID
www.SID.ir

اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ولی در سایر روزها فقط با گروه PBS اختلاف آماری معنی‌دار دیده شد ($p<0/05$). جهت بررسی روند آلودگی پس از گذشت ۵۱ روز در گروه تحت درمان با IL ۲۲-۵ng ندول بسیار کوچکی مشاهده شد و میانگین تعداد اماستیگوت این گروه در ۱۰ فیلد(۴، ۵) درمقایسه با میانگین تعداد اماستیگوت‌ها در گروه IL ۲۲ -۱۰ng (۱۱،۵۰) و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است.با اینکه در پایان دوره درمان تعداد اماستیگوت‌های گروه‌های دریافت کننده IL-22 کاهش داشت ولی بیشترین کاهش تعداد اماستیگوت را در گروه IL22-5ng داشتیم. در مقایسه میزان مرگ ومیر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ‌گونه مرگ ومیر در گروه‌های تحت درمان با IL۲۲ نداشتیم در صورتی‌که در گروهPBS (۱) مرگ در هفته چهارم اتفاق افتاد. قبل از شروع درمان از لحاظ میانگین اندازه وزن اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. ولی بررسی میانگین وزن با انجام آزمونLSD در هفته‌های مختلف نشان می‌دهد که گروه تحت درمان با IL22-5ng از نظر افزایش وزن با $p<0/05$ با دو گروه دیگر در روزهای ۱۱۴ و ۱۰۷ اختلاف معنی داری ندارد ولی در سایر روزها با گروه PBS اختلاف آماری معنی‌دار آماری دیده شد. نتایج بررسی‌های IFN-γ, IL4,IGg total, IGg2a نشان می‌دهد که IL ۲۲ -۱۰ng به طور مشخص سبب افزایش تولید گاماااینترفرون و کاهش تولید IL4 می‌شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، IL ۲۲ – ۱۰ng و IL۲۲ -۵ng نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که میزان گاما اینترفرون و IGg total گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با $p<0/05$ نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL4 گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با $p<0/05$ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IGg2a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با $p<0.05$ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار است(جدول شماره ۲). میانگین MTT در چهار گروه به‌صورت زیر است که گروه تحت درمان با IL ۲۲-۵ ng با $p<0/05$ اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد. میانگین (OD) MTT در گروه دریافت کننده IL ۲۲-۵ng، IL۲۲-۱۰ng و pbs به ترتیب۷۹۴، ۰، ۴۱۰ و ۵۵۵ می باشد.

جدول شماره۲: میانگین و انحراف معیار IFNγ، IL4، IgGtotal و IgG2a، در هفته هفتم بعد از درمان عفونت لیشمانیاماژور در موش BALB/c

	IL22-5n		IL22-10n		PBS	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
IFNγ	۱۷۶۹/۵	۳۳/۰۳	۲۷۱	۴۶/۹۵	۱۳۱	۱۰/۸۹
IL4	۳/۷۵	۴/۵۰	۱۴/۲۵	۵/۱۲	۲۰۳/۷۵	۱۴/۳۳
IgGtotal	۰/۰۴۹۲	۰/۰۱۵	۰/۱۷۵	۰/۰۶۲	۰/۱۳۷۲	۰/۰۲۶۷
IgG2a	۱/۴۳۹	۰/۲۸۵	۱/۲۴۹	۰/۱۴۱	۰/۰۱۸۶۷	۰/۲۸۵

بحث

از آنجایی که درمان بیماری لیشمانیوز جلدی در بهترین شرایط تنها ۸۰ درصد موفقیت داشته و برخی از درمان‌ها کارایی بسیار اندکی در بیماری دارند لذا مطالعه روش‌های درمانی جدید گریز ناپذیر است. نتایج اثر درمانی IL۲۲ دردو دوز ۵ و ۱۰ نانو گرم نسبت به pbs نشان رشد زخم به صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL ۲۲۵ng کاهش می یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL ۲۲۵ng بوده است و شروع بروز زخم در گروه تحت درمان با IL ۲۲-۵ ng (۵۱) روز پس از درمان بوده در صورتی‌که در سایر گروه‌ها(۳۰) روز پس از درمان بوده است.از آن جایی‌که نتایج روی موش‌های BALB/c ماده نشان داد که در هفته های پس از عفونت با لیشمانیا ماژور، روند افزایش قطر زخم در گروه‌هایی که IL ۲۲-۵ ng در یافت کردند کندتر از گروه دریافت‌کننده IL ۲۲-۱۰ ng و PBS است ولی روند افزایش قطر و اندازه زخم در گروه دریافت کننده IL ۲۲-۱۰ng و PBS مشاهده شده است. امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجدگیرنده برای این سایتوکاین هستند(۲۵). در پوست IL-۲۲ سبب القای

Archive of SID

www.SID.ir

پپتیدهای ضد میکروبی می‌شود و تکثیر کراتینوسیت‌ها را افزایش و تمایز آن‌ها را مهار می‌کند و یک نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد(۱۶، ۲۵).

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان باPBS، IL۲۲-۱۰ng و IL۲۲-۵ng نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح p =۰/۰۰۰ در ۳ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی‌دار اماری در اندازه زخم وجود دارد.که با استفاده از آزمون LSD نشان می‌دهد که گروه IL۲۲-۵ng با p <۰/۰۵ با دو گروه دیگردر روزهای ۳۰ و۳۷ اختلاف معنی‌دار آماری در اندازه زخم دارد ولی در روزهای ۸۶، ۹۳، ۱۰۷، ۱۱۴، ۱۲۱، ۴۴ و ۵۱ فقط با IL ۲۲-۱۰ng اختلاف معنی‌دار نیست ولی در روزهای ۵۸، ۷۲، ۶۵، و ۷۹ با p <۰/۰۵ فقط با گروه PBS اختلاف آماری معنی دار دیده شد. نتایج روی موش‌های BALB/c ماده نشان داد که در هفته‌های پس از عفونت با لیشمانیا ماژور، روند افزایش قطر زخم در گروه‌هایی که IL۲۲-۵ng دریافت کردند کندتر از گروه دریافت‌کننده PBS است ودر مجموع نتایج اندازه زخم درگروهی که IL۲۲-۵ng را دریافت کرده، به مقدار گروه ng ۵-۲۲ IL نزدیک است ولی روند افزایش قطر و اندازه زخم در گروه دریافت‌کننده PBS مشاهده شده است که شاید نمایانگر اثر بهتر سایتوکین IL۲۲ باشد. امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سایتوکاین هستند. در پوست IL- ۲۲ سبب القای پپتیدهای ضد میکروبی می‌شود و تکثیر کراتینوسیت‌ها را افزایش و تمایز آن‌ها را مهار می‌کند و یک نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد(۱۶، ۲۵). در موش‌هایی که گروه کنترل را تشکیل می دادند و فقط PBS را دریافت کرده بودند روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه‌ها نیزمعنی دار بود. جهت بررسی روند آلودگی پس از گذشت ۵۱ روز در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng ندول بسیار کوچکی مشاهده شد و میانگین تعداد اماستیگوت این گروه در ۱۰ فیلد(۴، ۵) درمقایسه با میانگین تعداد اماستیگوت‌ها درگروه IL22-10ng (۱۱، ۵۰) و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است.با این‌که در پایان دوره درمان تعداد اماستیگوت‌های گروه‌های دریافت‌کننده IL۲۲ کاهش داشت ولی بیشترین کاهش تعداد اماستیگوت را در گروه IL۲۲-۵ng داشتیم. که شاید بتوان توجیه نمود که چون عفونت لیشمانیایی در موش بستگی به فعال شدن یکی از دو زیر گروه‌های سلولی CD+4 یعنی Th۱ و ۲ Th دارد و پاسخ Th1 با بهبودی و پاسخ Th2 با عفونت منتشر ارتباط دارد و سلول‌های Th1 با ترشح سایتوکائین‌هایی مانند: IFN-γ,IL-2,TNF-ß واسطه بهبودی می‌باشند و IFN-γ حاصل از این سلول‌ها به‌عنوان قوی‌ترین سایتوکاین فعال کننده ماکروفاژهاست و فعال شدن ماکروفاژها منجر به تولید نیتریک اکسید NO و سرانجام منجر به مرگ انگل می‌شود(۲۶، ۲۷ و ۲۸).

نتایج سایر تحقیقات زیر شاید تأئید یافته فوق باشد.۲۲- IL با آن‌که یک سیتوکین عضو خانواده ۱۰- IL است و ۱۰- IL به عنوان سردسته این خانواده سایتوکاین، یک مهارکننده مؤثر ایمنی سلولی و تقویت‌کننده قوی ایمنی هومورال است. ولی علی‌رغم داشتن مشترکات ساختمانی بسیار زیاد این دو در این خانواده از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمنولوژیک تفاوت‌های فاحشی بین آن‌ها وجود دارد. و رسپتورهای CRF2-4 بین ۲۲ IL و ۱۰IL مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است در حالی‌که CRF2-۹ مختص ۲۲- IL است و دارای هومولوژی بادومین زنجیره گیرنده ۱۰IL است.

وجود۹-۲ CRF و ۴-۲ CRF یعنی دو زنجیره گیرنده این سایتوکاین در سیگنالینگ مؤثر هستند و در مسیر سیگنالینگ این سایتوکاین STAT شامل STAT۱، STAT۳ و ۵ STAT فعال شده و متعاقب آن تولید پروتئین‌های فاز حاد از کبد افزایش می‌یابد و نقش این سایتوکاین را به‌عنوان یک سایتوکاین التهابی تثبیت می‌کند. IL۲۲ باعث فعال‌سازی JAK۱، TYK۲، STAT ۱، STAT۳، STAT۵ و مسیر MAP کیناز می‌شود(۱۶-۱۱).

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعات زیادی در لیشمانیوز تجربی ناشی از لیشمانیا ماژور انجام گرفته است که نشان از ارتباط قوی بین تولید اینترفرون گاما و توانایی محدود کردن عفونت و از سویی ارتباط بین اینترلوکین ۴ و عدم توانایی کنترل عفونت است به طوری که تجویز anti-IFN-γ به موش‌های مقاوم سبب بزرگ شدن زخم و تأثیر در بهبودی می‌شود و بر عکس تجویز IFN-γ به موش‌های حساس سبب کوچک شدن زخم‌ها شده است. افزایش مقدار اینترفرون گاما نسبت به اینترلوکین ۴در گروه‌های دریافت‌کننده IL ۲۲ نشان‌دهنده این است که بیماری به سمت بهبودی می رود. زیرا ثابت شده که در مدل‌های موش‌های آزمایشگاهی که پاسخ‌های ایمنی به‌سمت ۱TH و اینترفرون گاما می‌رود، بیماری به‌سوی خودبه‌خود بهبود شونده می‌رود. در زمانی که پاسخ ایمنی به‌سمت Th۲ و اینترلوکین ۴ می‌رود بیماری شدت می‌یابد و وخیم می شود(۲۷، ۲۸).

IL -۲۲ یک اثر حفاظتی در برابر بیماری کالاآزار انسانی دارد و لیشمانیا دونووانی تمایز سلول‌های Th- ۲۲ را برای تولید IL۱۷ و IL۲۲ و گاما اینترفرون تحریک می‌کنند(۲۱). در مقایسه میزان مرگ ومیر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ‌گونه مرگ و میر در گروه‌های تحت درمان با IL-22 نداشتیم در صورتی‌که در گروه pbs (۱) مرگ در هفته چهارم اتفاق افتاد. قبل از شروع درمان از لحاظ میانگین اندازه وزن موش‌ها اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. از آنجایی که فاکتور زمان تاثیر قاطع بر روند بیماری و وزن و اندازه قطر زخم دارد بدیهی است که با گذشت زمان عفونت در حیوان تثبیت شده و بیماری بروز می‌کند. این مسئله منجر به بروز علایم در حیوان، کم خوراکی و از سویی تحلیل رفتن آن و در مجموع کاهش وزن حیوان را سبب می‌شود. در موش‌هایی که گروه کنترل را تشکیل می‌دادند و فقط PBS را دریافت کرده بودند روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بود. نتایج بررسی‌های IFN-γ، IGg۲a، IGg total و IL۴ نشان می‌دهد که IL۲۲-۵ng، به‌طور مشخص سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL4 می‌شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان IL۲۲-۵ng IL۲۲-۱۰ng و PBS نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح p =۰/۰۰۱ در ۳ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. که برای آشکار سازی این اختلاف‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که میزان گاما اینترفرون و IGg total گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p <۰/۰۵ نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL4 گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p <۰/۰۵ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است.میزان IGg2a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p <۰/۰۵ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی دار نیست ولی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار است. میانگین MTT در چهار گروه نشان داده است که گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p <۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد. در این روش رنگ سنجیMTT قادر به عبور از غشای سلول‌ها می‌باشد. آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی قادر است پس از ورود MTT به سلول‌های سالم، حلقهٔ تترازولیوم آن را بشکند و آن را به فورمازان نامحلول و آبی رنگ تبدیل کنند. در حالی که سلول‌های مرده از این عمل ناتوان هستند.که در این آزمایش حداکثر پرولیفراسیون و حداکثر تکثیر و تحریک لنفوسیت‌ها در مربوط به گروه دریافت‌کننده IL22-5NG می‌باشد(۲۴).

در مجموع نشان داده شده بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان باIL۲۲-۵ ng بوده است زیرا IL۲۲-۵ng سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید اینترلوکین ۴ شده است و نمایانگر آن است که موش‌های تحت درمان با IL۲۲ سبب ایجاد پاسخ‌های سایتوکین Th1 می‌شود از طرفی درصد بقاء بالا و کاهش مرگ ومیر وافزایش چشمگیر وزن و کاهش قطر زخم و افزایشIgG2a واینترفرون گاما وکاهش میزان IL4 نمایانگر کارایی این سایتوکاین در درمان لیشمانیوز جلدی می‌باشدکه باید در آینده همراه با واکسن‌های لیشمانیا مورد ارزیابی قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLOS Negl Trop Dis. 2008; 2: e313
2. Handman E. Leishmaniasis; current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 229-300.
3. Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. Clin Dermat 1996; 14: 425-431.
4. Atlashewski MG. Leishmania infection and virulence. Med Microbiol Immunol 2001; 190: 37-42.
5. Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, et al. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterization of the causative organisms. Int J Parasitol 2004; 34: 655-664.
6. Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A, Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol 1999; 17(3): 257-260.
7. Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol 2003; 97(Suppl 1): 3-15.
8. Chang KP, Fong D, Bray RS. Biology of Leishmania and leishmaniasis. In: Chang Kp, Bray RS. editors. Leishmaniasis. New York: Elsevier; 1985. p 1-30.
9. Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. J Immunol 2001; 167(7): 3545-2549.
10. Conti P, Kempuraj D, Frydas S, Kandere K, Boucher W, Letourneau R, Madhappan B, et al. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. Immunol Lett 2003; 88(3): 171-174
11. Igwa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL) 22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. Mol Immunol 2006; 43(7): 999-1009
12. Dumoutier L, Van RE, Ameye G, Michaux L, Renauld JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse gene. Genes Immun 2000:1-8: 488-94
13. Alves R NPCDDLRJOCeal. Crystal structure of recombinant human interleukin-22. stucture 2002:10:1051-62
14. Gurney AL. IL-22, a Th1 cytokine that target the pancreas and select other peripheral tissue. Int Immunopharmacol 2004:4(5):669-77.
15. Jones SA R-JS. The role of soluble receptors in cytokine biology the agonistic prosperities of the s IL-6R/IL-6 complex. Biochim Biophys Acta 2002 :1592:251-63
16. Boniface K etal 2005 IL22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes J. Immunol 174:3695-3702.
17. Andoh, A et al. 2005 IL22a member of the IL10 subfamily induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts Gastroenterology . 129:969-984.
18. Aujla, S.J. et al. 2008 IL22 mediates mucosal host defense against Gram – negative bacterial pneumonia Nat. Med 14:275-281.
19. Zenewicz LA, et al. 2007 IL22 but not IL17 provides protection on hepatocytes during acute inflammation immunity 27: 647-659.
20. Dhiman R. Indramohan M. Barnes PF. Nayak RC. et al. IL22 produced by human

Archive of SID
www.SID.ir

NK cells inhibits growth of Mycobacterium Tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion J Immunol 2009 Nov15; 183(10): 6639-45. Epub2009 Oct 28.aniasis. Med J 2001. Nov30,Volume 2 Number11

21. Maira G.R.Pitta et al. Audrey Romano Sandrine Cabantous et al IL17 and IL22 are associated with Protection against human Kala azar caused by Leishmania donovani. the J.of Clinical Investigation V119 N8 August 2009 2379- 2387.
22. Sasaki S,Takeshita F, Ke-qin X, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulation and delivery systems for DNA vaccines. Methods 2003; 31: 243-254.
23. Farnandez-Botran R, Vetyickaz V, Methods in Cellular Immunology.2 edition by CRF Press LNC 2001
24. Avantika Verma, Kashi N. Prasad, Aloukick K. Singh, Kishan K. Nyati, Rakesh K. Gupta, Vimal K. Paliwal . Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosisof neurocysticercosis. Journal of Microbiological Methods 81 (2010) 175–178
25. Kenner R.Leishm60- Boniface K etal 2005 IL22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol 174:3695-3702.
26. Mcsorley S Proudfoot L, O Donnel CA, Liew FY Immunology of murine Leishmanhasis. Clin Dermatol 1996:14:451-64.
27. Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous Leishmaniasis. Exp parasitol 1989-68:369-72.
28. 28- Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Humman and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. Infect Immun 1998; 66(7): 3279-89.

Archive of SID

www.SID.ir