

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

هاجر ضیایی هزار جریبی<sup>۱</sup>  
فاطمه غفاری فر<sup>۲</sup>  
عبدالحسین دلیمی اصل<sup>۲</sup>  
زهرا شریفی<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** IL22 یک سیتوکین عضو خانواده IL10 است که به وسیله سلول‌های NK و Th ۲۲ و Th ۱۷ ایجاد می‌شود و اخیراً نقش IL22 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 IL22 بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c بررسی شد.  
**مواد و روش‌ها:** ۲۴ سرموش BALB/c ماده ۸ هفته را با تعداد حداقل  $2 \times 10^6$  پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور L.major سویه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از طریق تلقیح زیرجلدی چالش نموده و به سه گروه ۸ تایی موش‌ها IL22 نوترکیب موشی را در دو دوز مختلف ۵ ng/ml و ۱۰ ng/ml به صورت IM تزریق نمودیم. بررسی ایمنی سلول‌ها و همومورال با سنجش سایتوکین‌های IL-4 و گاما اینترفرون 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 به صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL-22 کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL ۲۲ (۵ng) بوده است. IL ۲۲-۵ ng 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 IL ۲۲-۵ ng با IL ۲۲-۵ ng  $p < 0.05$  نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL ۴ گروه تحت درمان با IL ۲۲-۵ ng با IL ۲۲-۵ ng  $p < 0.05$  نسبت به IL ۲۲-۱۰ ng معنی‌دار نیست ولی با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IGg2a گروه تحت درمان با IL ۲۲-۵ ng با IL ۲۲-۱۰ ng  $p < 0.05$  نسبت به IL ۲۲-۱۰ ng معنی‌دار نیست ولی با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار است.  
**استنتاج:** MTT در گروه دریافت کننده IL ۲۲-۵ ng با IL ۲۲-۵ ng با افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش 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:** اینترلوکین ۲۲، گاما اینترفرون، اینترلوکین ۴، لیشمانیا ماژور و موش BALB/c

### مقدمه

لیشمانیا زیس 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

E mail: ghafarif@modares.ac.ir

**مؤلف مسئول:** فاطمه غفاری فر - تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

۱. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران (دانشجوی دکتری انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس)

۲. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳. 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

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 می‌باشد. که ۱/۵ میلیون نفر مربوط به لیشمانیازیس جلدی و ۰/۵ میلیون 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 از سال 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 به دلیل 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) MDA ۷ و (TIF) IL و ۲۲ IL و ۲۶-IL چنان که می‌دانیم ۱۰IL به‌عنوان سردسته این

خانواده سایتوکاین، یک مهارکننده مؤثر ایمنی سلولی و تقویت کننده 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 بر روی رسپتور) و هم پوشانی Redundancy (تأثیر یک سایتوکاین روی چند رسپتور) در مورد رسپتورهای این خانواده وجود دارد. این سایتوکاین دارای خاصیت پلئوتروپیک هم در داخل سیستم ایمنی و هم در خارج آن می‌باشد رسپتور هترو دیمر IL22 شامل گیرنده (۲-۴) CRF ۱۰-IL زنجیره R-۲۲ IL و R۲ ۱۰ IL و R۳ ۱۰ IL (۲-۹) CRF است که علی‌رغم داشتن این رسپتور مشترک پاسخ ۲۲-IL مستقل از ۱۰-IL است (۹-۱۲). ۲۲ IL که به آن IL-TIF و ۱۰ IL می‌شود توسط Th۱۷ خصوصاً NK Cells و Th۲۲ و (CCR1۰) TCells (Th۱) به محض فعال شدن به ۴-IL و همچنین به وسیله ماست سل‌های تیموس و مغز پس از فعال شدن با ConA ترشح می‌شود و از محدود سایتوکاین‌های است که وجودش حتی در غیر از پستانداران نظیر ماهی‌ها به اثبات رسیده است (۱۱، ۱۳). ۲-۴ CRF بین ۲۲-IL و ۱۰-IL مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است در حالی که ۲-۹ CRF مختص ۲۲-IL است و دارای هومولوژی با دومین زنجیره گیرنده ۱۰-IL است. وجود ۲-۹ CRF و ۲-۴ 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.



بررسی ایمنی سلولاروهمورال با سنجش سایتوکین‌های ۴-IL و گامااینترفرون و بررسی MTT و IgG $\gamma$ a و TgG Total اندازه‌گیری قطر زخم و ثبت مرگ و میر به‌طور هفتگی بررسی شدند. برای بررسی ایمنی همورال 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 همورال جمع‌آوری و در فریزر -۲۰ نگهداری شدند. سرم‌های گرفته شده از موش‌های 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-بی کربنات ۰/۱ مولار به همه چاهک‌ها بجز چاهک‌های کنترل بلانک در پلیت‌های الیزا 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، و با 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 بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای اندازه‌گیری میزان جذب نوری قرائت می‌شود. برای بررسی ایمنی سلولار ۷ هفته بعد از چالش با انگل اندازه‌گیری سایتوکاین‌های گاما اینترفرون و ۴ IL ایمنی سلولی مورد بررسی قرار گرفت. ۷

هفته پس از چالش 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 سلول‌ها پس از شستشو و سانتریفیوژ با محیط RPMI 1640 که حاوی FCS ۱۰ درصد است، به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد و کشت سلول‌های لنفوسیت طحال موش جهت بررسی وجود سایتوکائین‌های IFN- $\gamma$  و IL۴ در پلیت ۲۴ خانه‌ای به تعداد  $2/5 \times 10^6$  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 سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی در مقادیر ۳۰۰ میکرولیتر در ویال‌ها تقسیم شده و تا زمان سنجش سایتوکائین در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند (۲۳) و سپس جهت بررسی وجود سایتوکین‌های گاما اینترفرون و اینترلوکین ۴ از سوپ سلولی لنفوسیت‌های طحال موش‌های دریافت‌کننده IL۲۲ و PBS که در -۷۰ نگهداری شده استفاده گردید و با روش الیزا و با استفاده از کیت شرکت U-cytech-biosciences استفاده شد.

#### روش MTT برای سنجش تکثیر لنفوسیت‌ها

از روش MTT برای بررسی پرولیفراسیون لنفوسیت‌ها به صورت 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، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی ژن انگل لیثمانیا ماژور افزوده شد به یک چاهک دیگر همان گروه هیچ آنتی‌ژنی اضافه نگردید. حجم نهایی هر چاهک با FBS ۱۰ درصد + RPMI به

۲۰۰ میکرولیتر رسید.

بعد از چاهک‌های هر گروه، ۲ چاهک به عنوان کنترل کشت داده می‌شود که یکی از این چاهک‌ها با PHA فیتوماگلو تینین به عنوان میتوزن تحریک شده و دیگری تحریک نمی‌شود. پلیت‌های کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C دارای ۵ درصد CO<sub>2</sub> قرار می‌گیرد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک حاوی 200 $\mu$ ل نفوسیت مقدار (۲۰ $\mu$ ل) از محلول MTT (غلظت ۵ mg/ml) اضافه گردید. پلیت مذکور مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ ل 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 می‌شد. وزن موش‌ها طی درمان به‌صورت هفتگی با ترازو کشیده و یادداشت گردید.

#### آنالیز آماری

نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری گاما اینترفرون و IL ۴ و توتال IgG و MTT و IgG ۲ a و بررسی قطر زخم و بقاء موش‌ها در گروه‌های کنترل و مورد با

اطلاعات نرم‌افزار SPSS وارد شد و از آزمون ANOVA و ONE WAY و برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون‌های تعقیبی LSD و TUKEY استفاده شد.

### یافته‌ها

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 صورتی که 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

لیشمانیا ماژور موش BALB/c

Group	IL22-5n		IL22-10n		PBS	
	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	۱/۴۴	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 ۵ng-۲۲ IL نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح  $p < ۰/۰۰۰$  در ۴ گروه حداقل در یک 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 گروه ۵Ng-IL۲۲ با  $p < ۰/۰۵$  با دو گروه دیگر در روزهای ۳۰ و ۳۷

اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ولی در سایر روزها فقط با گروه PBS اختلاف آماری معنی دار 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 اماستیکوت این گروه در ۱۰ فیلد (۴،۵) در مقایسه با میانگین تعداد اماستیکوت‌ها در گروه IL ۲۲-۱۰ng (۱۱،۵۰) و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است. با اینکه در پایان دوره درمان تعداد اماستیکوت‌های گروه‌های دریافت کننده IL-22 کاهش داشت ولی بیشترین کاهش تعداد اماستیکوت را در گروه IL22-5ng داشتیم. در مقایسه میزان مرگ و میر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ‌گونه مرگ و میر در گروه‌های تحت درمان با IL۲۲ نداشتیم در صورتی که در گروه PBS (۱) مرگ در هفته چهارم اتفاق افتاد. قبل از شروع درمان از لحاظ میانگین اندازه وزن اختلاف معنی داری بین گروه‌ها دیده نشد. ولی بررسی میانگین وزن با انجام آزمون LSD 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 معنی دار آماری دیده شد. نتایج بررسی‌های IFN- $\gamma$ ، IL4، IGg total، IGg2a، ۲۲-۱۰ng نشان می‌دهد که IL به طور مشخص سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL4 می‌شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، ۲۲-۱۰ng IL و ۵ng-۲۲ IL 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 معنی دار است و میزان IL4 گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با  $p < 0.05$  نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری است. میزان IGg2a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با  $p < 0.05$  نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی دار نیست ولی با گروه کنترل

اختلاف معنی دار است (جدول شماره ۲). میانگین MTT در چهار گروه به صورت زیر است که گروه تحت درمان با IL ۲۲-۵ ng با  $p < 0.05$  اختلاف معنی داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد. میانگین (OD) MTT در گروه دریافت کننده IL ۲۲-۵ng، IL ۲۲-۱۰ng و PBS به ترتیب ۷۹۴، ۴۱۰ و ۵۵۵ می‌باشد.

جدول شماره ۲: میانگین و انحراف معیار IL4، IFN $\gamma$ ، IgGtotal و IgG2a، در هفته هفتم بعد از درمان عفونت لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

	IL22-5n		IL22-10n		PBS	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
IFN $\gamma$	۱۶۹/۵	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	۱/۴۲۹	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 در دو دوز ۵ و ۱۰ نانو گرم نسبت به PBS نشان رشد زخم به صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL ۲۲۵ng کاهش می‌یابد 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 صورتی که در سایر گروه‌ها (۳۰) روز پس از درمان بوده است. از آن جایی که نتایج روی موش‌های BALB/c ماده نشان داد که در هفته‌های پس از عفونت با لیشمانیا ماژور، روند افزایش قطر زخم در گروه‌هایی که IL ۲۲-۵ ng دریافت کردند کندتر از گروه دریافت کننده 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 واجد گیرنده برای این سایتوکاین هستند (۲۵). در پوست ۲۲-IL سبب القای

در گروه IL22-10ng (۱۱، ۵۰) و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است. با این که 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 Th۲ دارد و پاسخ Th۱ با بهبودی و پاسخ Th۲ با عفونت منتشر ارتباط دارد و سلول‌های Th۱ با ترشح سایتوکائین‌هایی مانند: IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$  واسطه بهبودی می‌باشند و IFN- $\gamma$  حاصل از این سلول‌ها به عنوان قوی‌ترین سایتوکاین فعال‌کننده 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 تأیید یافته فوق باشد. IL-۲۲ با آن که یک سایتوکاین عضو خانواده IL-۱۰ است و IL-۱۰ 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 IL ۲۲ و IL ۱۰ مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است در حالی که CRF2-۹ مختص IL-۲۲ است و دارای هومولوژی با دومین زنجیره گیرنده IL۱۰ است.

وجود CRF ۲-۹ و CRF ۲-۴ یعنی دو زنجیره گیرنده این سایتوکاین در سیگنالینگ مؤثر هستند و در مسیر سیگنالینگ این سایتوکاین STAT شامل STAT۱، STAT۳ و STAT۵ فعال شده و متعاقب آن تولید پروتئین‌های فاز حاد از کبد افزایش می‌یابد و نقش این سایتوکاین را به عنوان یک سایتوکاین التهابی تثبیت می‌کند. IL۲۲ باعث فعال‌سازی JAK۱، TYK۲، STAT۱، STAT۳، STAT۵ و مسیر MAP کیناز می‌شود (۱۶-۱۱).

پتیدهای 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 با PBS، ۱۰ng-۲۲ IL و ۵ng-۲۲ IL نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح  $p=0/000$  در ۳ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی‌دار آماری در اندازه زخم وجود دارد. که با استفاده از آزمون LSD نشان می‌دهد که گروه ۵ng-۲۲ IL با  $p < 0/05$  با دو گروه دیگر در روزهای ۳۰ و ۳۷ اختلاف معنی‌دار آماری در اندازه زخم دارد ولی در روزهای ۸۶، ۹۳، ۱۰۷، ۱۱۴، ۱۲۱، ۴۴ و ۵۱ فقط با ۱۰ng-۲۲ IL اختلاف معنی‌دار نیست ولی در روزهای ۵۸، ۷۲، ۶۵ و ۷۹ با  $p < 0/05$  فقط با گروه PBS اختلاف آماری معنی‌دار 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 ۵ng-۲۲ IL دریافت کردند کندتر از گروه دریافت‌کننده PBS است و در مجموع نتایج اندازه زخم در گروهی که ۵ng-۲۲ IL را دریافت کرده، به مقدار گروه ۵-۲۲ IL نزدیک است ولی روند افزایش قطر و اندازه زخم در گروه دریافت‌کننده PBS مشاهده شده است که شاید نمایانگر اثر بهتر سایتوکاین IL۲۲ باشد. امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سایتوکاین هستند. در پوست IL-۲۲ سبب القای پتیدهای 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 می‌دادند و فقط PBS را دریافت کرده بودند روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه‌ها نیز معنی‌دار بود. جهت بررسی روند آلودگی پس از گذشت ۵۱ روز در گروه تحت درمان با ۵ng-۲۲ IL ندول بسیار کوچکی مشاهده شد و میانگین تعداد اماستیگوت این گروه در ۱۰ فیلد (۴، ۵) در مقایسه با میانگین تعداد اماستیگوت‌ها

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 سوی ارتباط بین اینترلوکین ۴ و عدم توانایی کنترل عفونت است به طوری که تجویز  $\gamma$ -IFN-anti به موش‌های مقاوم سبب بزرگ شدن زخم و تأثیر در بهبودی می‌شود و بر عکس تجویز  $\gamma$ -IFN به موش‌های حساس سبب کوچک شدن زخم‌ها شده است. افزایش مقدار اینترفرون گاما نسبت به اینترلوکین ۴ در گروه‌های دریافت‌کننده IL ۲۲ نشان‌دهنده این است که بیماری به سمت بهبودی می‌رود. زیرا ثابت شده که در مدل‌های موش‌های آزمایشگاهی که پاسخ‌های ایمنی به سمت TH۱ و اینترفرون گاما می‌رود، بیماری به سوی خودبه‌خود بهبود شونده می‌رود. در زمانی که پاسخ ایمنی به سمت Th۲ و اینترلوکین ۴ می‌رود بیماری شدت می‌یابد و وخیم می‌شود (۲۷، ۲۸).

IL-۲۲ یک اثر حفاظتی در برابر بیماری کالآآزار انسانی دارد و لیشمانیا دونووانی تمایز سلول‌های Th-۲۲ را برای تولید IL ۱۷ و IL۲۲ و گاما اینترفرون تحریک می‌کنند (۲۱). در مقایسه میزان مرگ و میر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ‌گونه مرگ و میر در گروه‌های تحت درمان با IL-22 نداشتیم در صورتی که 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 تأثیر 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 علائم در حیوان، کم‌خوراکی و از سوی 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  $\gamma$ -IFN، IgG total، IgG۲a، IL۴ و IL۴ نشان می‌دهد که IL۲۲-۵ng، به‌طور مشخص سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL۴ می‌شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان IL۲۲-۵ng و IL۲۲-۱۰ng و PBS نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح  $p=0/001$  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 IL۲۲-۱۰ng نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL۴ گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با IL۲۲-۱۰ng نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IgG2a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با IL۲۲-۱۰ng نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار است. میانگین MTT در چهار گروه نشان داده است که گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با IL۲۲-۱۰ng اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد. در این روش رنگ سنجی MTT قادر به عبور از غشای سلول‌ها می‌باشد. آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی قادر است پس از ورود MTT به سلول‌های سالم، حلقه 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 پروفیراسیون و حداکثر تکثیر و تحریک لئوسیت‌ها در مربوط به گروه دریافت‌کننده IL22-5NG می‌باشد (۲۴). در مجموع نشان داده شده بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng 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 IL۲۲-۵ng سبب ایجاد پاسخ‌های سایتوکین Th1 می‌شود از طرفی درصد بقاء بالا و کاهش مرگ و میر و افزایش چشمگیر وزن و کاهش قطر زخم و افزایش IgG2a و اینترفرون گاما و کاهش میزان IL4 نمایانگر کارایی این سایتوکاین در درمان لیشمانیوز جلدی می‌باشد که باید در آینده همراه با واکسن‌های لیشمانیا مورد ارزیابی قرار گیرد.

## References

- Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLOS Negl Trop Dis*. 2008; 2: e313
- Handman E. Leishmaniasis; current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 229-300.
- Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermatol* 1996; 14: 425-431.
- Atlashewski MG. Leishmania infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190: 37-42.
- 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.
- Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A, Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1999; 17(3): 257-260.
- Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(Suppl 1): 3-15.
- 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.
- Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renault 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.
- 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
- 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
- Dumoutier L, Van RE, Ameye G, Michaux L, Renault JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse gene. *Genes Immun* 2000;1-8: 488-94
- Alves R NPCDDLRLJOCeal. Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *stucture* 2002;10:1051-62
- Gurney AL. IL-22, a Th1 cytokine that target the pancreas and select other peripheral tissue. *Int Immunopharmacol* 2004;4(5):669-77.
- 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
- Boniface K etal 2005 IL22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes *J. Immunol* 174:3695-3702.
- Andoh, A et al. 2005 IL22a member of the IL10 subfamily induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts *Gastroenterology* . 129:969-984.
- Aujla, S.J. et al. 2008 IL22 mediates mucosal host defense against Gram – negative bacterial pneumonia *Nat. Med* 14:275-281.
- Zenewicz LA, et al. 2007 IL22 but not IL17 provides protection on hepatocytes during acute inflammation *immunity* 27: 647-659.
- Dhiman R. Indramohan M. Barnes PF. Nayak RC. et al. IL22 produced by human

- 
- 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 diagnosis of neurocysticercosis. Journal of Microbiological Methods 81 (2010) 175–178
25. Kenner R. Leishm60- Boniface K et al 2005 IL22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol 174:3695-3702.
26. Mcorley S Proudfoot L, O Donnel CA, Liew FY Immunology of murine Leishmaniasis. 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. Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human 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.