ارزیابی تاثیر مایع رویی کشت سلول‌های توموری CT26 بر زخم جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

سحر هامون نورد[۱]، حسین رضوان*[۱] محمد حسین فیض حداد[۲]و[۳]

۱-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳-گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
*نشانی برای مکاتبه: h.rezvan@basu.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف:*لیشمانیا ماژور* عامل بیماری لیشمانیوز جلدی بوده که منجر به ضایعات بافتی مقاوم به درمان و اسکار در محل آسیب می شود. استفاده از روشهای درمانی بر پایه ترکیبات شیمیایی خط اول درمان در موارد ابتلا می باشد که علیرغم عوارض جانبی، منجر به بهبودی کامل نمی شود. هدف از بررسی حاضر، ارزیابی تاثیر فاکتورهای محلول ناشی از سلولهای توموری CT26 در تنظیم پاسخ ایمنی علیه بیماری لیشمانیوز جلدی است.

مواد و روش ها:موش‌های جنس ماده نژاد BALB/c با سویه استاندارد *لیشمانیا ماژور* آلوده و پس از بروز زخم، مایع رویی سلول‌های CT26 به موشهای مبتلا به لیشمانیوز جلدی به دو فرم وریدی و داخل زخمی تزریق شد، پس از گذشت ۳۰ روز از تیمار، نمونه بافتی طحال و سلول‌های ماکروفاژ از حفره صفاق، جهت بررسی تکثیر سلولی و فاگوسیتوز برداشته و اندازه زخم نیز در طول مدت تیمار ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰، آزمون‌های t-test و One-Way ANOVA تست Tukey تحلیل شدند(*Pvalues* ≤0.05).

یافته ها:اندازه زخم در گروه‌های تحت تیمار با مایع رویی کشت سلول‌های CT26 به صورت وریدی و داخل زخم بیشتر بود ولی این اختلاف معنادار نبود. میزان تکثیر لنفوسیتی، فاگوسیتوز و متعاقباً التهاب ناحیه زخم در گروهای تحت تیمار با مایع رویی کشت سلول‌ها، نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده ولی این افزایش نیز معنادار نبود(*Pvalues* ≤0.05) .

نتیجه گیری: استفاده از فاکتورهای محلول مایع رویی کشت سلول‌های CT26 می تواند منجر به تغییر پاسخ ایمنی در موضع التهاب ناشی از زخم لیشمانیوز جلدی شود که تعیین عوامل موثر در این زمینه باید مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

کلمات کلیدی: مایع رویی کشت سلول‌های CT26، لیشمانیوز جلدی، موش BALB/c

مقدمه

انگل *لیشمانیا ماژور* تک یاخته‌ایی از جنس *لیشمانیا* و عضوی از خانواده تریپانوزوماتیده است که گونه‌های مختلف آن باعث ایجاد بیماری لیشمانیوزیس می‌شوند(۱). این بیماری در انسان به اشکال جلدی، جلدی- مخاطی، جلدی- منتشره و احشایی دیده می‌شود (۲). محققان نشان دادند که بسیاری از گونه‌های *لیشمانیا* توانایی تعدیل و تضعیف پاسخ‌های سیستم ایمنی در بدن میزبان را داشته و در نتیجه باعث افزایش بقا انگل در میزبان و پیشرفت بیماری می‌شوند. عواملی چون ژنتیک میزبان، دستگاه گوارش پشه خاکی به عنوان ناقل و فاگولیزوزوم‌های ماکروفاژ نقش مهمی را در افزایش پاتوژنسیته و مقاومت انگل در بدن میزبان دارد(۳). خط اول درمان این بیماری استفاده از ترکیبات آنتی موان ۵ ظرفیتی از جمله پنتوستام و گلوکانتیم بوده که علاوه بر مشکلاتی چون عدم دسترسی کافی و عوارض جانبی بالا در بیمار، مقاومت نسبت به درمان با این دارو که شامل: عوامل ژنتیکی از جمله پروتئین-های شوک حرارتی و پروتئین‌های متصل شونده به گلوتاتیون، عوامل پروتئینی و عوامل آنزیمی همانند پروتئین‌های انتقال دهنده دارو که یوبی کوییتین، کینازها، آنزیم‌های مسیر گلیکولیز و بتاااکسیداسیون اسید چرب می‌باشند، دوز ناکافی دارو، مهار فعال شدن آن و ضعف سیستم ایمنی میزبان نظیر

کاهش میزان لنفوسیت‌های $T\ CD_4^+$ نیز گزارش گردیده است (۴). توانایی فاگوسیتوز انگل توسط سلولهای ماکروفاژ درکنترل بیماری لیشمانیوز مهم بوده و وابسته به ویرولانس انگل می-باشد و در این حین لنفوسیت T نقش کلیدی در فعال سازی ماکروفاژها و افزایش قدرت فاگوسیتوز آن‌ها دارد، مونوسیت‌ها با اتصال گیرنده کموکاینی خود (CCR2) از خون به محل زخم ناشی از *لیشمانیا* حرکت کرده و این سلول‌ها برخلاف نوتروفیل‌ها توانایی کافی برای از بین بردن انگل *لیشمانیا* را از طریق (ROS) را دارند و از طرف دیگر مونوسیت‌ها به سلول-های دندرتیک تمایز و به غدد لنفی مهاجرت کرده و با تولید IL-12 منجر به تمایز T_H1 می‌شوند. سلول‌های T_H1 به سمت موضع التهاب در پوست حرکت کرده و انگل را از طریق تحریک تولید ترکیبات نیتریک اکساید و یا افزایش انفجار تنفسی (Respiratory burst) از بین می‌برد (۵).

اخیراً با توجه با ایجاد عارضه جلدی دردناک ناشی از این بیماری و فقدان درمان قطعی و بدون عوارض ناشی از درمان، تحقیقات در زمینه ارائه راهکارهایی در جهت ترمیم زخم در فرم جلدی بیماری در حال انجام می‌باشد. مطالعات گسترده ای در زمینه ی تغییر در نوع پاسخ ایمنی بر اساس تغییر فضای سایتوکاینی و مواد محلول در طی واکنشهای ایمنی انجام گرفته است و با توجه به اهمیت این موضوع در مورد پاسخ های ایمنی موثر علیه انگل *لیشمانیا* و ترمیم ضایعه، بررسی حاضر طراحی گردیده است. لذا در این مطالعه، از عوامل مترشحه سلول‌های CT26 در جهت تحریک موثر سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی علیه *لیشمانیا* استفاده گردید. سلول‌های CT26 از رده کولون کارسینوما موش می‌باشند؛ این سلول‌ها در مطالعات دارویی و بررسی واکنش‌های ایمنولوژیک کاربرد فراوانی داشته و با توجه به اینکه این رده از سلول‌ها دارای ایمنوژنسیته ضعیفی بوده و برای برانگیختن پاسخ ایمنی نیاز به القا آنتی ژن‌های بیشتری دارند از اینرو برای مقاصد بررسی پاسخ ایمونولوژیک مناسب هستند. سلول‌های توموری سایتوکاین‌های IFN-γ, TNF-□, IL-6, IL-7, IL-4, IL-2 و IL-12 را بیان کرده و قادر به تحریک پاسخ ایمنی از طریق لنفوسیت‌های T در مدل موشی مشخصی هستند(۶). در برخی از مطالعات نیز بدون بررسی محتویات فاکتورهای تولید شده، از مایع رویی کشت سلول CT26 جهت ایمنی زایی و افزایش توان آنتی ژنیسیته واکسنهای توموری استفاده شده است(۷) این ویژگی می‌تواند در بررسی‌های ایمنوتراپی حائز اهمیت بوده و از طرفی با توجه به قدرت آنتی ژنیک بالا این سلول‌ها، فرض بر این است که بتوانند به عنوان ادجوانت در مسیر پاسخ ایمنولوژیک علیه لیشمانیوز جلدی مهم باشند. اهمیت فضای سایتوکاینی در چگونگی پاسخهای ایمنی در محل ضایعه لیشمانیوز جلدی به اثبات رسیده است (۸) به نحوی که پاسخ ایمنی کارآمد علیه این عارضه، افزایش سطح IFN-Y و کاهش میزان لنفوسیتهای Treg بوده و می تواند منجر به کنترل عفونت و افزایش سرعت روند بهبودی گردد. توانایی این سلولها در پذیرش ایمنوژن *لیشمانیا* و بیان پروتئین این تک یاخته جهت کاربرد در طراحی واکسن علیه این بیماری توسط محققین همین گروه انجام شده و بیانگر قابلیت این سلولها به عنوان سلول یوکاریوت به منظور استفاده در اهداف پیشگیرانه بوده (۹) که با توجه به این ویژگی، هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیرات ناشی از تولید فاکتورهای محلول، عوامل مختلف سایتوکاینی تولید شده توسط سلولهای توموری و امکان استفاده از فاکتورهای ترشحی محلول توسط این سلول‌ها، به عنوان ادجوانت، جهت افزایش توان آنتی ژنیک در موضع زخم ناشی از *لیشمانیا ماژور* بوده که در صورت اثرگذاری، ارزیابی فاکتورهای تولید شده در مایع رویی کشت این سلولها، لازم و ضروری می باشد و از طرفی انتقال ژن سایتوکاینهای کلیدی در روند بهبود زخم *لیشمانیا* در سلولهای CT26 و تولید این فاکتورها می تواند در اقدامات پیشگیرانه و درمانی علیه این بیماری مفید واقع گردد.

مواد و روشها:

حیوانات مورد آزمایش

جامعه آماری مورد مطالعه شامل موش‌های ماده خالص (Inbred) نژاد BALB/c با سن ۶ تا ۸ هفته بوده که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. این موش‌ها در حیوان خانه دانشکده پیرادامپزشکی در محدوده دمایی۲۰-۲۵ C º و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه داشته شدند (کد اخلاقIR.BASU.REC.1398.053). در طول مدت مطالعه حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذا را داشتند. سویه استاندارد انگل *لیشمانیا ماژور* [MRHO/IR/75/ER] از انستیتو پاستور ایران تهیه و پس از کشت در محیط in-vitro به میزان ۲×۱۰^۶/ml به قائده دم موش BALB/cجنس ماده و به صورت داخل جلدی تزریق شد. پس از بروز زخم لیشمانیا در حیوان حساس، گروه بندی حیوانات جهت دریافت مایع رویی کشت سلول‌های CT26 انجام پذیرفت.

گروه بندی حیوانات

گروه۱: دارای زخم *لیشمانیا* و بدون دریافت کننده مایع رویی سلول (Cont Leish)

گروه ۲: دارای زخم *لیشمانیا* و دریافت کننده مایع رویی به صورت وریدی از طریق ورید دم (IV, CT26)

گروه۳: دارای زخم *لیشمانیا* و دریافت کننده مایع رویی سلول از طریق بافت اطراف زخم (IL, CT26)

گروه۴: بدون زخم *لیشمانیا* و دریافت کننده مایع رویی از طریق ورید دمی (IV, Cont CT26)

گروه۵: بدون زخم *لیشمانیا* و دریافت کننده مایع رویی از طریق زیر جلد ناحیه دمی (IL, Cont CT26)

جمع آوری مایع رویی سلول‌های CT26

سلول‌های CT26 از موسسه پاستور تهیه و پس از کشت و تکثیر، تعداد ۵×۱۰^{۵} از سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 و فاقد آنتی بیوتیک و FBS کشت داده شد، پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای $۳۷^{\circ}C$ در داخل انکوباتور CO_2 دار و بدون اینکه محیط سلول‌ها تعویض شود، مایع رویی سلول‌ها با احتیاط جمع آوری گردید. مایع رویی با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از جدا کردن پلت سلولی، جهت ارزیابی فاکتورهای ترشح شده ناشی از رشد سلول، میزان پروتئین توتال مایع رویی به روش برادفورد(Bradford) سنجیده و سپس در دمای $-۸۰^{\circ}C$ جهت تزریق، نگه داری شد.

سنجش میزان پروتئین با استفاده از کیت برادفورد

طبق پروتکل کیت، محلول استاندارد BSA به عنوان کنترل در رقت‌های مختلف تهیه شد. میزان جذب نوری محلول استاندارد پس از افزودن معرف برادفورد با طول موج 595nm سنجیده و منحنی استاندارد رسم شد، جذب نوری نمونه مجهول پروتئین نیز پس از افزودن معرف برادفورد، با طول موج 595nm ارزیابی و بر اساس منحنی استاندارد غلظت پروتئین مشخص شد.

تزریق مایع رویی سلول CT26 به حیوانات

پس از بروز زخم *لیشمانیا* و جمع آوری مایع رویی سلول‌های CT26، میزان ۶۰۰ul از مایع رویی در دو نوبت به فاصله هفت روز به موش‌های دریافت کننده در ورید دمی و داخل زخم تزریق شد.

دوره درمانی و نمونه گیری

موش‌های دریافت کننده مایع رویی سلول، به مدت چهار هفته نگه‌داری شدند، در طی این مدت سه مرتبه از اندازه زخم عکس برداری شد. پس از گذشت زمان مذکور، نمونه‌های ماکروفاژ حفره بطنی جهت ارزیابی فاگوسیتوز و بافت طحال برای بررسی تکثیر سلولی اخذ شدند.

جداسازی ماکروفاژهای حفره بطنی(۱۰)

تحت شرایط آسپتیک، حیوان آسان کشی شده و سطح شکمی با الکل ۷۰٪ ضد عفونی شد. با استفاده از تیغه اسکالپل شکافی در سطح حفره بطنی ایجاد شده و میزان ۵ml از سرم فیزولوژی سرد داخل حفره بطنی تزریق گردید. با عملکرد پیپتینگ، سرم فیزولوژی تزریق شده از داخل حفره شکمی جمع آوری و تا زمان انتقال به آزمایشگاه در کنار یخ نگه داشته شد. پس از سه مرتبه شست و شو، مایع حاوی سلول‌های حفره بطنی جمع آوری و شمارش شد. سلول‌های جدا شده پس از شمارش در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی سیلین ۵۰۰۰IU/ml، استرپتومایسین ۵۰۰۰ g/ml کشت داده شدند.

ارزیابی اندازه ضایعه زخم *لیشمانیا* و نمونه برداری

پس از شروع درمان، بررسی اندازه زخم به صورت هفتگی در طول دوره ۳۰ روزه انجام گرفت. با استفاده از دوربین دیجیتال(Canon ژاپن) در فاصله مشخص از موضع و به همراه معیار مشخص بر حسب میلی متر عکس برداری شد. تصاویر اخذ شده با استفاده از نرم افزار Image J تحلیل و ارزیابی گردید. پس از گذشت ۳۰ روز از زمان شروع درمان و پس از آسان کشی حیوان، ماکروفاژهای حفره بطنی برای بررسی فاگوسیتوز و سپس بافت طحال به منظور ارزیابی میزان تکثیر سلولهای طحالی اخذ گردید.

کشت سلول‌های طحالی جهت آزمایش بار انگلی و تکثیر سلولی(۱۱)

طحال جدا شده در PBS حاوی آنتی بیوتیک (۵٪) قرار داده و سه مرتبه در PBS شست و شو شد. بافت طحال در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS قرار داده شده و با سرنگ ۲/۵ml به طور کامل تخلیص سلولی شد. برای لیز گلبول‌های قرمز طحال از محلول لیز کننده ACK استفاده شد (میزان ۸/۲۹g از کلرید آمونیوم، ۱g از بی‌کربنات پتاسیم و ۳۲/۲mg از EDTA توزین و به ۸۰۰ml آب دیونیزه افزوده شد. در این مرحله PH محلول با افزودن محلول ۱ نرمال اسید کلریدریک بر روی ۷/۲ الی ۷/۴ تنظیم و با آب دیونیزه به حجم یک لیتر

رسانده شد). تعداد کل سلول‌های استخراج شده از طحال شمارش و تعداد ۲×۱۰۶ جهت آزمایش تکثیر سلولی استفاده شد.

تهیه آنتی ژن محلول *لیشمانیا* SLA (۱۲, ۱۳)

جهت تهیه عصاره انگلی *لیشمانیا*، از فاز لگاریتمی انگل در پاساژ ۴ استفاده شد. از سوسپانسیون سلولی حاوی انگل، پلت سلولی تهیه و سه مرتبه با PBS شسته شد (سانتریفیوژ rpm ۲۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه) پلت سلولی مذکور در لایزینگ بافر(50mM Tris base+ 5mM EDTA =PH=7.1) ترکیب و محلول همگن شد. تیوپ حاوی انگل، به مدت ۵ دقیقه سونیکیت شد. سپس تیوپ مورد نظر به دفعات ۵ مرتبه داخل ازت مایع به مدت یک دقیقه قرار داده شد به نحوی که پس از یک دقیقه جهت ذوب، بلافاصله تیوپ در بنماری ºC۷۲ انکوبه گردید. تیوپ به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm۵۰۰۰ سانتریفیوژ شده و پس از تهیه غلظت ug/ml۱۰، در فریزر ۲۰- تا زمان استفاده نگه‌داری شد.

بررسی میزان تکثیر سلول ایمنی با روش(۱۰)MTT

تعداد ۲×۱۰۶ سلول از هر طحال در ۶ چاهک در محیط RPMI حاوی ٪۱۰ FBS کشت داده شد. در سه چاهک از آنتی ژن محلول *لیشمانیا* (14) به میزان ug/ml۱۰ (ul۵۰) و در سه چاهک دیگر پروتئین کنترلی BSA نیز به میزان ug/ml۱۰ (ul۵۰) افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ساعت در انکوباسیون ºC۳۷ و CO_2٪۵ نگه داشته شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، مقدار ul۲۰ از محلول(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT (۵ mg/ml) تهیه و به تمام چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت مذکور در انکوباتور ºC۳۷ و CO_2 ٪۵ به مدت ۴ ساعت نگه داشته شد. بعد از انکوباسیون، ul۷۰ از محلول ایزوپروپانول اسیدی (حاوی HCL ۰/۰۴M) به چاهک‌ها افزوده و جذب نوری محلول در طول موج nm۶۳۰ قرائت شد.

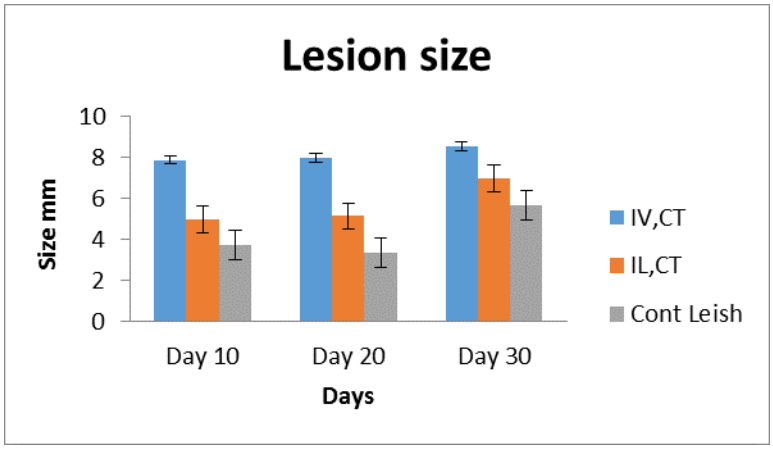
آنالیز آماری

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون‌های Kolmogorov-Smirnov و Shapiro-Wilk داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تحلیل قرار گرفتند. آزمون‌های t-test و One-Way ANOVA تست Tukey برای گروه سلول مزانشیمال و گروه‌های مایع رویی سلول استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم شده و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد (SD) در سطح معنی داری ($P\text{-value}\leq ۰/۰۵$) بیان شدند.

یافته ها:

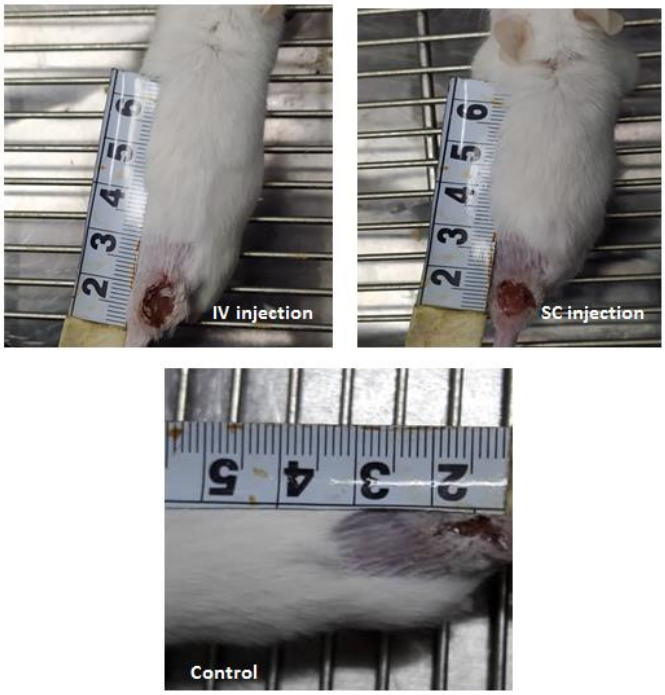
ارزیابی اندازه زخم

در سه دوره پس از تزریق مایع رویی، اندازه زخم در گروه‌ها ارزیابی شد. در کل دوره تیمار در روز ۳۰ از درمان اندازه زخم در گروه مبتلا به لیشمانیوز جلدی بدون درمان نسبت به گروه دریافت کننده مایع رویی به صورت وریدی ($P\leq ۰/۰۵$) و داخل زخم ($P\leq ۰/۰۵$) کمتر بود و به طور نسبی اندازه زخم با افزایش طول زمان تیمار در روز ۳۰ از درمان در گروه‌ها افزایش پیدا کرد، در گروه دریافت کننده مایع رویی به صورت داخل وریدی (IV,CT26) نسبت به گروه کنترل اندازه زخم روند افزایش داشت که هیچکدام از موارد فوق معنادار نبودند ($P\leq ۰/۰۵$) (شکل ۱).

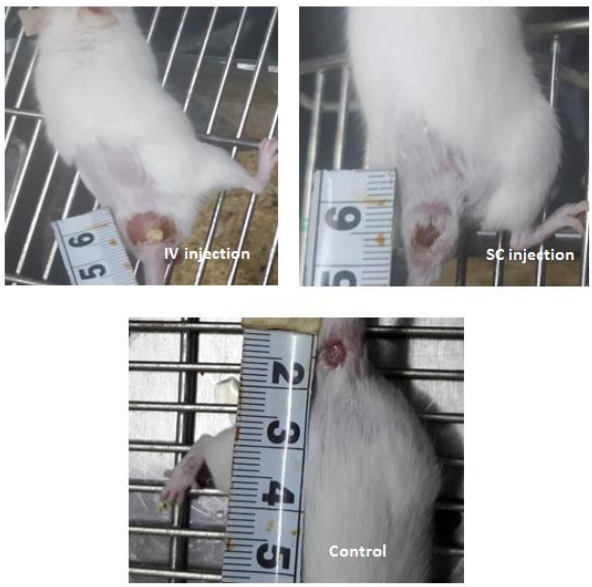


شکل۱: ارزیابی اندازه زخم در دو گروه تیمار با مایع رویی سلول‌های CT26 ، شامل (IV,IL) و در گروه بدون درمان (Cont Leish)

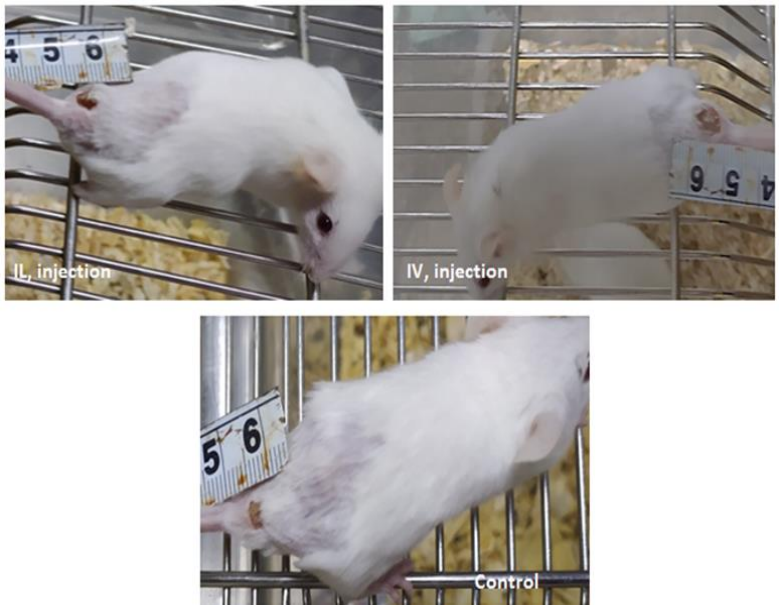
شکل۲: تصویر اندازه زخم در دو گروه تیمار با مایع رویی سلول‌های CT26، شامل (IV,IL) و در گروه کنترل بدون درمان (Cont Leish) در روز ۱۰ از درمان



شکل۳: تصویر اندازه زخم در دو گروه تیمار با مایع رویی سلول‌های CT26، شامل (IV,IL) و در گروه کنترل بدون درمان (Cont Leish) در روز ۲۰ از درمان

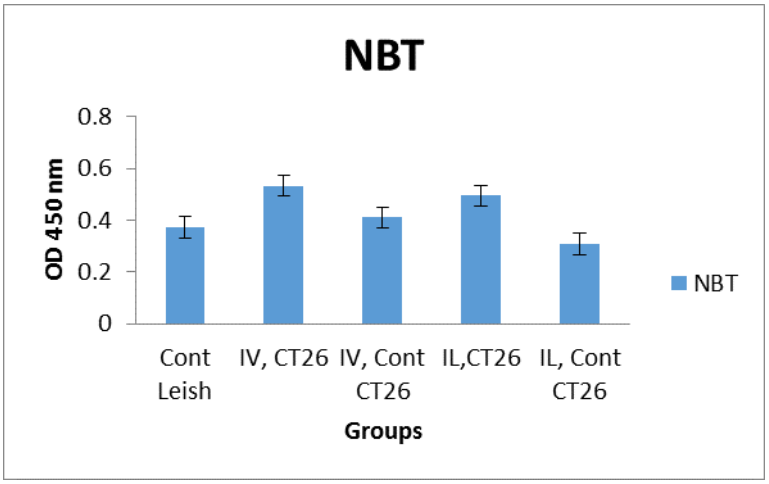


شکل۴: تصویر اندازه زخم در دو گروه تیمار با مایع رویی سلول‌های CT26، شامل (IV,IL) و در گروه کنترل بدون درمان (Cont Leish) در روز ۳۰ از درمان



بررسی میزان فاگوسیتوز سلول‌های ماکروفاژ جدا شده از حفره بطنی موش‌های تیمار شده با مایع رویی سلول-های CT26

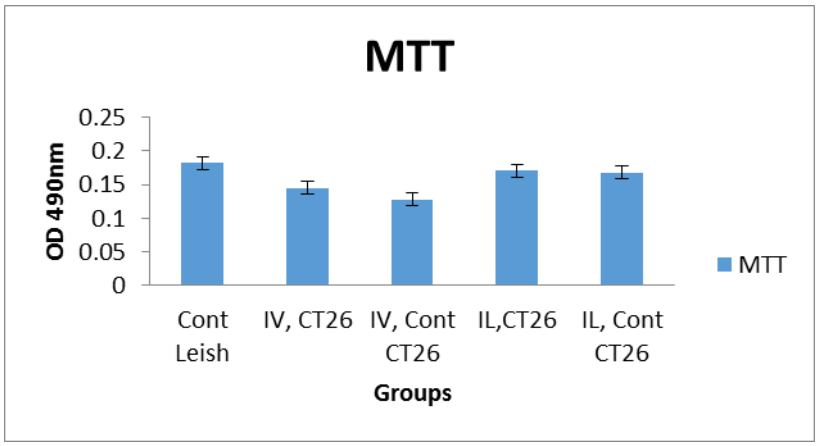
از ماکروفاژهای حفره بطنی جهت بررسی میزان فاگوسیتوز استفاده گردیده و نتایج نشان داد که میزان فاگوسیتوز در گروه‌های دریافت کننده مایع رویی سلول‌های CT26 به صورت داخل زخم نسبت به گروه کنترل زخم *لیشمانیا* ($P\leq ۰/۰۵$) بالاتر بود و همچنین به صورت سیستمیک ($P\leq ۰/۰۵$) نیز بیشتر از گروه کنترل زخم بوده ولی این افزایش معنا دار نبود، از طرفی در گروه‌های دارای زخم و دریافت کننده مایع رویی سلول به شکل داخل زخم، میزان فاگوسیتوز نسبتا بیشتر از کنترل بدون زخم همان گروه بود که این نتایج نیز معنا دار نبود ($P\leq ۰/۰۵$) و به همین ترتیب در گروه دریافت کننده مایع رویی به شکل وریدی نیز همین نسبت برقرار بود ($P\leq ۰/۰۵$) (شکل ۵).



شکل۵ : میزان فاگوسیتوز در گروه‌های دریافت کننده مایع رویی سلول‌های CT26

ارزیابی میزان تکثیر سلولی در گروه‌های دریافت کننده مایع رویی سلول‌های CT26

جهت سنجش میزان تکثیر لنفوسیتی از سلول‌های طحالی استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان تکثیر سلولی بدنبال تیمار با مایع رویی سلولی در گروه‌های تحت درمان با مایع رویی سلول به صورت سیستمیک ($P\leq ۰/۰۵$) و دریافت کننده به شکل داخل زخم ($P\leq ۰/۰۵$) نسبتا کمتر از گروه کنترل بدون درمان بودند ولی این نسبت‌ها معنا دار نبود. از طرفی میزان تکثیر در گروه‌های دریافت کننده مایع رویی به صورت داخل زخم بالاتر از تجویز سیستمیک($P\leq ۰/۰۵$) و کنترل زیر جلد نیز بیشتر از کنترل تزریق وریدی بود($P\leq ۰/۰۵$) اما این نسبت‌ها نیز معنادار نبود (شکل ۶).



شکل۶: ارزیابی میزان تکثیر سلولی در سلول‌های طحالی و در گروه‌های دریافت کننده مایع رویی CT26

بحث

بیماری لیشمانیوزیس توسط تک یاخته داخل سلولی از جنس *لیشمانیا* ایجاد و دارای اشکال متفاوتی در بیماران می باشد. این عارضه بر اساس طبقه‌بندی سازمان جهانی بهداشت به عنوان یک بیماری‌های گرمسیری، منجر به یک مشکل بهداشتی جهانی شده است. این بیماری بعد از مالاریا، بالاترین میزان آسیب را در بین عفونت‌های انگلی داشته و استفاده از ترکیبات آنتی موان و آمفوتریسین B به منظور اهداف درمانی در نظر گرفته می‌شود. با توجه به اثرات توکسیک داروهای شیمیایی، امتناع بیمار از مصرف دارو، بروز مقاومتهای دارویی و درمان ناموفق منجر به بررسی سایر روش‌های نوین بر پایه ایمنوتراپی در درمان این بیماری شده است (۱۵). تحریک پاسخ ایمنی به سمت افزایش فعالیت لنفوسیتهای Th1 و تولید سایتوکاینهای موثر در جهت فعال سازی ماکروفاژهای موجود در موضع زخم *لیشمانیا* بر پایه ایمنوتراپی می تواند به نحو مطلوب در کنترل ضایعات ناشی از لیشمانیوز مفید باشد؛ بر همین اساس در مطالعه پیشین نیز قابلیت پذیرش ژن حدت انگل *لیشمانیا* توسط سلولهای توموری CT26 را مورد بررسی قرار داده (۹) و در مطالعه حاضر اثرگذاری فاکتورهای محلول ناشی از این سلولها در موضع زخم *لیشمانیا* به منظور تغییر فضای سایتوکاینی موضع التهاب مورد ارزیابی قرار گرفت. ماکروفاژها به عنوان مهم ترین سلول در پاسخ ایمنی در اثر مواجهه با انگل *لیشمانیا*، سه نوع سایتوکاین را ترشح می‌کنند؛ مهمترین این سایتوکاینها، IL-12 بوده که سیستم ایمنی را به سمت Th1 تغییر و باعث تولید IFN-γ شده و در نتیجه التهاب ناشی از ضایعه را بهبود می بخشد. پاسخ سیستم ایمنی در مواجهه با انگل *لیشمانیا* و تغییر مسیر به سمت تولید Th1 یا Th2 به عوامل مختلفی از جمله تغذیه و ژنتیک میزبان بستگی دارد. وجود سایتوکاینهای مختلف باعث تغییر پاسخ به سمت تقویت ایمنی سلولی و یا تولید آنتی بادی علیه عامل *لیشمانیا* خواهد شد به این ترتیب که حضور سایتوکاین IL-12 و IL-18 تولید شده توسط ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک در فعال شدن NK cell تاثیر گذاشته و NK cell از طریق تولیدIFN-γ و TNF-α نقش مهمی در محدود کردن عفونت اولیه و از بین بردن انگل‌های داخل سلولی دارد. فعال شدن TLR-2 منجر به تولید IL-12 ,TNF-αو نیتریک اکساید[۱] (NO) از ماکروفاژها شده و در نهایت موجب ایجاد پاسخ ایمنی از مسیر Th-1 می‌شود(۱۶). وجود سایتوکاینهای پیش التهابی شامل TNF-α, IL-12 و IFN-γ در عفونت لیشمانیوز و پاسخ ناشی از مسیر Th1، اثر محافظتی علیه عامل داشته و هرگونه قصور در میزان تولید این سایتوکاینها منجر به ایجاد عارضه ناشی از بیماری گردد (۱۷). در بررسی حاضر با توجه به افزایش التهاب در محل ضایعه و افزایش فاگوسیتوز ناشی از ماکروفاژها، وجود فاکتورهای محلول ناشی از تومور می تواند شامل IFN-Y و IL-12, IL-4 بوده که باعث افزایش فعالیت فاگوسیتوز در ماکروفاژها شده ولی پیشرفت ضایعه می تواند دلیلی بر فعالیت

[۱] Nitric Oxide

ناشی از Th2 و به دنبال تولید IL-4 و IL-13 و تحریک تولید آنتی بادی هایی چونIgG, IgA باشد به طوری که سایتوکاین‌های گروه سلولی Th2 مانند IL-13 و IL-4 نیز باعث بدتر شدن زخم ناشی از *لیشمانیا* خواهند شد (۱۸) که این سایتوکاینهای تولیدی توسط T helper2 موجب تحریک تولید آنتی بادی‌های IgG, IgA, IgE و ایجاد پاسخ‌های خارج سلولی هومورال شده و موجب عدم کنترل بیماری و پیشرفت ضایعه خواهند شد، به نحوی که کنترل عفونت با فعالیت ایمنی سلولی و با واسطه Th1 و ناتوانی درکنترل عفونت به دلیل فعالیت بارز Th2 است (۱۹). میزان تکثیر لنفوسیتی در طحال نیز تغییر قابل توجهی را در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل نشان نداد و حتی در موارد تزریق داخل وریدی تکثیر لنفوسیتی کاهش یافته، معنادار نبود.

فضای سایتوکاینی و تولید فاکتورهای رشد اهمیت بالایی را در روند ترمیم زخم لیشمانیوز جلدی دارد در مطالعه حاضر با استفاده از مواد ترشحی توسط سلول‌های توموری میزان اثر بخشی سایتوکاین‌ها و عوامل مترشحه از جمله فاکتورهای رشد ناشی از تکثیر بالای سلول‌های توموری بر ضایعه ناشی از *لیشمانیا ماژور* مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به اینکه سلول‌های توموری CT26 یکی از رده های سلولی بسیار معمول در بررسی‌های ایمنوتراپی است، اثرات سایتوتوکسیک فاکتورهای متعدد تولیدی از این سلول‌ها در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۰) و در این مطالعه نیز به بررسی اثر بخشی عوامل مترشحه احتمالی از این سلول‌ها بر روند ترمیم زخم لیشمانیوز جلدی پرداخته شد. این سلول‌ها در محیط in-vivo یک سیستم همگن را ایجاد کرده و اغلب در ارزیابی مقاصد ایمنوتراپی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۱). استفاده از مایع رویی سلول‌های CT26 نیز نتایج متفاوتی را بر روند ترمیم زخم *لیشمانیا ماژور* نشان داد که می‌تواند نقش مهم عوامل مترشحه از این سلول‌ها را در سیر درمانی و تغییر نوع پاسخ‌های ایمونولوژیکی در این بیماری نشان دهد. در این بررسی مشخص شد، تولید عوامل پروتئینی مترشحه از این سلولها می تواند منجر به تغییر پاسخ ایمنی میزبان علیه *لیشمانیا ماژور* شود، نتایج ما نشان داد که اندازه زخم در گروه‌های درمانی با مایع رویی کشت CT26 خصوصاً در روش تجویز سیستمیک نسبت به گروه کنترل بدون درمان بالاتر بوده و با گذشت طول درمان میزان التهاب زخم نیز بالاتر می‌رود که می‌تواند دلیلی بر افزایش تکثیر لنفوسیتی در برخی گروه‌های دریافت کننده مایع رویی سلول باشد ولی میزان تکثیر سلولی در گروه‌های دریافت کننده مایع کشت نسبت به گروه کنترل بدون درمان با روند معمول ترمیم زخم، اختلاف زیادی نداشت، از طرفی میزان فاگوسیتوز ارزیابی شده نشان داد که مایع کشت سلولی CT26 روند فاگوسیتوز را نسبت به گروه کنترل کاهش نداده و حتی در مورد تجویز سیستمیک این میزان را افزایش داد و نشان دهنده تاثیر فاکتورهای محلول تولیدی از این سلول‌ها و اثرات آن بر تغییر ایجاد فضای سایتوکاینی و پاسخ ایمنولوژیک می باشد که مکانیسم دقیق این واکنش در دسترس نبوده و نیاز به بررسی دقیق تولید این فاکتورهای محلول دارد، در خصوص بررسی اثرات استفاده از مایع رویی کشت سلول‌های CT26 بر عوامل عفونی اطلاعاتی در دسترس نیست اما در مورد مشابهی ماکروفاژها را در مواجهه با مایع رویی کشت سلولهای سرطانی دهانه رحم در شرایط آزمایشگاهی نگه داشته اند، این محققان نشان دادند که عوامل مترشحه از این سلول‌ها در مایع رویی کشت آن‌ها می‌تواند منجر به تغییر فنوتایپ ماکروفاژها از نوع کلاسیک (M1) به نوع آلترناتیو (M2) شود که توجیه این مکانسیم از طریق افزایش بیان CD163، کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی، کاهش تولید نیتریک اکساید و افزایش تولید IL-10 انجام شده است (۲۲). با توجه به قابلیت تولید سایتوکاین‌های IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, TNF-α, γ -IFN و IL-12 توسط سلولهای توموری(۶)، تغییر نوع پاسخ ایمنی در مدل مورد مطالعه حاضر نیز می تواند ناشی از عوامل تولید شده در مایع رویی حاصل از کشت CT26 باشد.

نتیجه گیری

بررسی اولیه تاثیر فاکتورهای محلول تولید شده توسط سلولهای توموری CT26 بر تغییر قدرت فاگوسیتوز و روند ترمیم زخم لیشمانیوز جلدی از اهداف اصلی مطالعه حاضر بوده است. طبق یافته ها، عوامل محلول تولید شده در مواردی موجب تغییر میزان فاگوسیتوز به عنوان عملکرد موثر در روند درمان لیشمانیوزیس شده، ولی با توجه به معنادار نبودن این تاثیر، بررسی تولید سایتوکاینهای کلیدی و موثر در روند بهبود زخم *لیشمانیا* از جمله IL-4, IFN-Y و IL-12 در مایع رویی حاوی کشت این سلولها و نیز تغییر دوز تجویز شده در مطالعات آتی جهت دستیابی به مدل ایجاد تغییر و تحریک پاسخ ایمنی ناشی از Th1 در موضع زخم *لیشمانیا* توسط ویژگی آنتی ژنیک این سلولها لازم و ضروری می باشد.

تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه مستخرج از بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی ایمنی شناسی در دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا همدان می باشد. مراتب سپاسگزاری را از همکاران محترم بخش ایمنولوژی در دانشکده پیرا دامپزشکی را بجا می آوریم.

REFERENCE

.۱ Mehdi M. Visceral leishmaniasis in Iran: review of the epidemiological and clinical features. 2013.
.۲ Loeuillet C, Bañuls A-L, Hide M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. Parasites & vectors. 2016;9(1):1-12.
.۳ Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. Clinical microbiology reviews. 2005;18(2):293-305.
.۴ Fariba Jaffary LAS, Mohammad Ali Nilforoushzaheh Review of the prevalence and causes of antimony compounds
resistance in different societies: review article. Tehran Univ Med J (TUMJ). 2017;75(6):399-407.
.۵ Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. Journal of Experimental Medicine. 2011;208(6):1253-65.
.۶ Tepper RI, Mule JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. Human gene therapy. 1994;5(2):153-64.
.۷ Zhang Q, Xie C, Wang D, Yang Y, Liu H, Liu K, et al. Improved antitumor efficacy of combined vaccine based on the induced HUVECs and DC-CT26 against colorectal carcinoma. Cells. 2019;8(5):494.
.۸ Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. Pathogens and global health. 2016;110(6):247-60.
.۹ Rezvan H. Molecular cloning of leishmania major gp63 Gene in BALB/c Mouse CT26 Cell Line. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2015;17(5.(
.۱۰ Zahiri M, Mohebali M, Khanavi M, Sahebgharani M, Saghafipour A, Esmaeili J, et al. Therapeutic effect of scrophularia striata ethanolic extract against localized cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major (MRHO/IR/75/ER). Iranian Journal of Public Health. 2016;45(10):1340.
.۱۱ Asadi F, Mirzaei MR, Froushani SMA. Comparison of the effects of 17β-estradiol treated and untreated mesenchymal stem cells on ameliorating animal model of multiple sclerosis. Iranian journal of basic medical sciences. 2018;21(9.۹۳۶:(
.۱۲ Hojatizade M, Badiee A, Khamesipour A, Mirshafiey A, Akhtari J, Mehravaran A, et al. DDA/TDB liposomes containing soluble Leishmania major antigens induced a mixed Th1/Th2 immune response in BALB/c mice. Nanomedicine Journal. 2017;4(2):71-82.
.۱۳ Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology. 2007;37(10):1097-106.
.۱۴ Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood. 2005;105(5):2214-9. Epub 2004/10/30.
.۱۵ Mcgwire BS, Satoskar A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM: An International Journal of Medicine. 2014;107(1.۷-۱۴:(

.۱۶ Prajeeth CK, Haeberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C. Leishmania-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. Infection and immunity. 2011;79(7):2699-708.
.۱۷ Pompeu MMdL, Brodskyn C, Teixeira M, Clarêncio J, Van Weyenberg J, Coelho I, et al. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to Leishmania amazonensis in healthy volunteers. Infection and immunity. 2001;69(12):7453-60.
.۱۸ Park H ,Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nature immunology. 2005;6(11):1133-41.
.۱۹ Tolouei S, Hejazi SH, Hasheminia SJ, Arjmand R, Khamesipour A, Nilforoushzadeh MA. Study of IL-12 Agonists in Macrophages from Patients with Healing and Non-Healing Forms of Cutaneous leishmaniasis. Journal of Isfahan Medical School. 2013;31(252.(
.۲۰ van Houdt WJ, Hoogwater FJ, de Bruijn MT, Emmink BL, Nijkamp MW, Raats DA, et al. Oncogenic KRAS desensitizes colorectal tumor cells to epidermal growth factor receptor inhibition and activation. Neoplasia. 2010;12(6):443-IN2.
.۲۱ Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, et al. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. BMC genomics. 2014;15(1):1-12.
.۲۲ Sánchez-Reyes K, Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, Lerma-Díaz JM, Jave-Suárez LF, Gómez-Lomelí P, et al. Cervical cancer cell supernatants induce a phenotypic switch from U937-derived macrophage-activated M1 state into M2-like suppressor phenotype with change in Toll-like receptor profile. BioMed research international. 2014;2014.