مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۵۲/هفته دوم آبان ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۲۰

مقایسه‌ی سطح آگونیست‌های ترشحی IL-12 از ماکروفاژهای بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی التیامی و غیر التیامی

دکتر سپیده طلوعی[۱]، دکتر سید حسین حجازی[۲]، سید جواد هاشمی‌نیا[۳]، رضا ارجمند[۴]،
دکتر علی خامسی‌پور[۵]، دکتر محمدعلی نیلفروش‌زاده[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز پوستی یک بیماری است که اغلب خود به خود بهبود می‌یابد، ولی در موارد نادری و به علل نامعلوم زخم‌ها ممکن است گسترش یابند و شکل مقاومی از بیماری را ایجاد کند. هنوز شاخص ایمونولوژیک مهمی که نشان‌دهنده‌ی روند بهبود لیشمانیوز پوستی در انسان باشد، شناخته نشده است. در این مطالعه سطح تولید سیتوکین‌های خانواده‌ی IL-12 (Interleukin-12) (IL-23 و IL-27) در دو گروه افراد مبتلا به فرم التیامی و غیر التیامی لیشمانیوز بررسی شد تا احتمال نقش این دو سیتوکین در روند بهبود زخم‌های ناشی از عفونت با L.major (Leishmania major) بررسی شود.

روش‌ها: ۲۶ بیمار مقیم استان اصفهان که به دو شکل التیامی و غیر التیامی لیشمانیوز پوستی مبتلا بودند، انتخاب شدند. سطح تولید IL-23 و IL-27 از ماکروفاژهای خون محیطی در محیط کشت، در دو گروه بیماران و شاهد، قبل و بعد از تحریک با پروماستیگوت‌های انگل L.major به روش ELISA اندازه گیری شد.

یافته‌ها: میانگین تولید IL-23 و IL-27 از ماکروفاژهای افراد مبتلا به شکل التیامی به طور معنی‌داری از بیماران مبتلا به شکل غیر التیامی بیشتر بود. همچنین سطح تولید این دو سیتوکین در سوپرناتانت محیط کشت، قبل و بعد از تحریک، در دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تولید آگونیست‌های IL-12 در روند بهبود زخم‌های ناشی از لیشمانیوز پوستی می‌تواند مؤثر باشد. به همین دلیل مطالعات بیشتری در این زمینه در مدل انسانی بیماری لازم است تا نقش این سیتوکین‌ها در این بیماری بهتر شناخته شود.

واژگان کلیدی: آگونیست، اینترلوکین ۲۳، اینترلوکین ۲۷، ماکروفاژ، پروماستیگوت، لیشمانیوز پوستی

ارجاع: طلوعی سپیده، حجازی سید حسین، هاشمی‌نیا سید جواد، ارجمند رضا، خامسی‌پور علی، نیلفروش‌زاده محمدعلی. **مقایسه‌ی سطح آگونیست‌های ترشحی IL-12 از ماکروفاژهای بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی التیامی و غیر التیامی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۲): ۱۴۴۲-۱۴۳۵

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- استاد، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوستی و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶- دانشیار، مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین حجازی
Email: hejazi@med.mui.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز پوستی (Cutaneous leishmaniasis یا CL) یک بیماری خود محدود شونده است و در بیشتر موارد در یک طیف زمانی چند ماهه تا یک سال بهبود می‌یابد (۱). در مواردی زخم حالت مزمن پیدا می‌کند و سال‌ها باقی می‌ماند و نسبت به درمان دارویی مقاوم می‌شود و یا ممکن است التیام یابد ولی به طور مجدد عود نماید که در این صورت به آن شکل غیر التیامی گفته می‌شود (۲). به نظر می‌رسد سیستم ایمنی میزبان از یک طرف و گونه های مختلف انگل از طرف دیگر در تعیین زمان بهبود افراد از عوامل مؤثر باشند (۳). تاکنون درمان‌های شیمیایی و همچنین واکسیناسیون علیه بیماری لیشمانیوز موفقیت‌های قابل قبولی نداشته است (۴). به همین دلیل شناسایی بر هم کنش های سیستم ایمنی با انگل جهت موفقیت در دست‌یابی به یک درمان مؤثر و واکسن محافظت‌کننده ضروری می‌باشد. تا کنون اطلاعات زیادی با استفاده از مدل حیوانی آلوده به لیشمانیوز در مورد سیستم ایمنی فراهم شده است که نشان می‌دهد پاسخ‌های Th1 (T helper) در روند بهبود زخم مؤثر هستند و از طرف دیگر پاسخ های Th2 می‌تواند باعث وخامت بیماری شود (۷-۵). با این وجود هنوز مارکر کلیدی مشخصی که در روند بهبود زخم و محافظت از انسان مؤثر باشد، شناخته نشده است (۱۲-۸). در سال‌های اخیر مطالعه بر روی سیتوکین‌های پروفایل Th1/Th2 نتایج متفاوتی را به همراه داشته است (۱۲، ۱۰، ۸). سیتوکین‌ها نقش اساسی در تنظیم سیستم ایمنی علیه بیماری‌های عفونی و غیر عفونی دارند (۱۳). IL-23 (Interleukin-23) و IL-27 دو سیتوکینی هستند که از نظر ساختمانی و عمل در خانواده‌ی سیتوکین‌های IL-12 قرار می‌گیرند و می‌توانند در روند تولید IFN-Y (Interferon gamma) و سلول‌های Th1 مؤثر باشند (۱۵-۱۴). از نظر ساختمانی IL-12 از دو زیر واحد P35 و P40 تشکیل شده است (۱۶). IL-23 دارای زیر واحد P19 و زیر واحد مشترک P40 می‌باشد (۱۶). IL-27 نیز دارای زیر واحد P28 و P40 می‌باشد (۱۷). شواهد حاکی از آن است که IL-27 می‌تواند باعث افزایش پاسخ‌های Th1 شود و IL-23 نقش مهمی در تمایز سلول‌های خاطره‌ای Th1 دارد (۱۸).از طرفی این دو سیتوکین در تنظیم پاسخ‌های Th17 نیز دخیل هستند (۱۹). IL-23 قادر است تمایز سلول‌های Th17 را القا کند و از طرف دیگر IL-27 باعث مهار تمایز Th17 و تولید IL-17 از طریق بیان GATA3 از مسیر STAT 1 شود (۲۰). با توجه به این که یک کنترل موفق علیه پاتوژن های داخل سلولی نیاز به تولید IFN-Y دارد، به نظر می‌رسد حضور خانواده‌ی IL-12 به عنوان یک القاکننده‌ی پاسخ‌های Th1 در روند بهبود زخم اهمیت زیادی داشته باشد (۲۱).

در این مطالعه سطوح سیتوکین‌های وابسته به IL-12 یعنی IL-23 و IL-27 تولیدشده از ماکروفاژهای مشتق‌شده از خون محیطی افراد در دو شکل التیامی و غیر التیامی CL قبل و بعد از تیمار با انگل لیشمانیا مقایسه شد، تا نقش احتمالی این دو سیتوکین در روند بهبود زخم ناشی از L.major (Leishmania major) مشخص شود.

روش‌ها

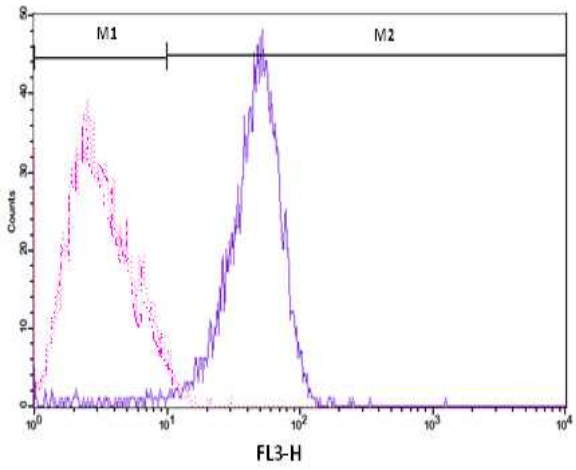
پس از تأیید کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم

پزشکی اصفهان افراد مورد مطالعه از بین بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات پوست و سالک صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان انتخاب شدند. داوطلبان جهت شرکت در مطالعه فرم رضایت‌نامه و پرسشنامه را تکمیل کردند. فرم های تکمیل شده برای هر بیمار دارای اطلاعاتی در مورد سن، جنس، سابقه‌ی بیماری در گذشته از قبیل بیماری‌های اتوایمن، دیابت، محل سکونت، سابقه‌ی مسافرت در شش ماه گذشته، داروهای مصرف‌شده و دیگر عوامل مستعدکننده‌ی احتمالی بود. پس از همسان‌سازی سن و جنس، در گروه التیامی ۱۳ نفر از افرادی شرکت داشتند که به اولین دوره‌ی درمانی با گلوکانتیم پاسخ داده بودند و همچنین حداکثر پس از یک ماه از اتمام دوره‌ی درمان از نظر بالینی و آزمایشگاهی علایمی نداشتند. گروه بیماران غیر التیامی ۱۳ نفر از افرادی بودند که پس از بیش از یک دوره‌ی درمانی (حداقل دو دوره) و گذشت یک ماه از آخرین دوره‌ی درمانی به درمان پاسخ نداده بودند.

تشخیص بیماری با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسای لام مستقیم و همچنین کشت انگل در محیط کشت NNN انجام شد. پس از استخراج DNA از ایزوله‌های به دست‌آمده تعیین گونه‌ی L.major با استفاده از تکنیک (Polymerase chain reaction) PCR انجام شد. همچنین گروه شاهد شامل ۱۳ نفر از افرادی بود که تاکنون به بیماری لیشمانیوز مبتلا نشده بودند و نتیجه‌ی تست لیشمانین آن‌ها منفی بود.

جهت جداسازی سلول‌های PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) خون حاوی هپارین همراه فایکول به مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰g سانتریفوژ شد. سلول‌های جداشده جهت خالص‌سازی دو بار با محلول فسفات بافر سالین شستشو داده شدند. جهت اطمینان از زنده بودن سلول‌ها رنگ‌آمیزی توسط رنگ تریپان بلو انجام شد. سلول‌ها به نسبت ۵×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر محیط کشت حاوی FBS غیر فعال‌شده به همراه ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در دو پلیت کشت ۳/۵ سانتی‌متری تقسیم شدند. پس از این که سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور با CO۲ ۵ درصد قرار گرفتند، سلول‌های آزادی که به کف پلیت نچسبیده بودند با استفاده از فسفات بافر سالین شستشو داده شدند و از پلیت خارج شدند. جهت تمایز سلول‌ها به ماکروفاژ، سلول‌ها به مدت ۶ روز در انکوباتور نگهداری شدند و هر ۷۲ ساعت محیط کشت آن‌ها تعویض گردید.

وجود ماکروفاژها هم از نظر مورفولوژی (اندازه‌ی سلول و وجود پای کاذب) و هم از نظر فنوتیپ با استفاده از فلوسایتومتری و آنتی‌بادی مونوکلونال CD14 تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱. آنالیز فلوسایتومتریک ماکروفاژها با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال CD14 (M1 ایزوتایپ کنترل و M2 سلول‌های CD14 مثبت با خلوص ۹۰ درصد)

پروماستیگوت‌های سویه‌ی استاندارد L.major (MRHO/IR/75/ER) که در شرایط انجماد در تانک ازت نگه‌داری می‌شد، ابتدا جهت تکثیر به محیط کشت NNN (Mac Neal, Norvy, Nicolle) وارد شد و سپس به محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) به همراه FBS (Fetal bovine serum) ده درصد منتقل شد. پروماستیگوت‌های تکثیریافته در فاز ایستا برداشت شدند و پس از شستشو با Phosphate buffered saline (PBS) و شمارش جهت تحریک ماکروفاژها از آن‌ها استفاده شد.

برای تحریک ماکروفاژها به وسیله‌ی انگل، ماکروفاژهای مشتق‌شده از مونوسیت‌ها با پروماستیگوت‌های L.major به نسبت ۵ به ۱ مجاور شدند. ۶ ساعت بعد پروماستیگوت‌های آزاد با استفاده از PBS شسته شدند و از محیط خارج شدند. پس از ۱۸ ساعت سوپرناتانت سلول‌های تحریک‌شده و تحریک‌نشده جمع‌آوری شد و جهت بررسی سیتوکین‌های مورد نظر در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمایشات ELISA با استفاده از کیت های IL-23 و IL-27 (ساخت کمپانی Abcam) بر روی سوپرناتانت جمع‌آوری‌شده انجام شد. مقایسه‌ی مقادیر این دو سیتوکین در دو گروه مورد مطالعه قبل و بعد از تحریک با انگل با تجزیه و تحلیل اطلاعات به وسیله‌ی آزمون‌های آماری ANOVA و Mann-Whitney در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. در بررسی‌های انجام‌شده $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۲۶ بیمار مبتلا به CL التیامی و غیر التیامی که وارد مطالعه شده بودند، ۴ نفر زن و ۲۲ نفر مرد بودند. تعداد در گروه التیامی و غیر التیامی به ترتیب ۳ نفر و ۱ نفر و تعداد مردان به ترتیب ۱۰ نفر و ۱۲ نفر بود. محدوده‌ی سنی بیماران در گروه التیامی ۵۵-۱۸ سال و در گروه غیر التیامی ۶۰-۲۲ سال بود. در جدول ۱ برخی از مشخصات افراد دو گروه نشان داده شده است.

جدول ۱. مشخصات بالینی در دو گروه التیامی و غیر التیامی

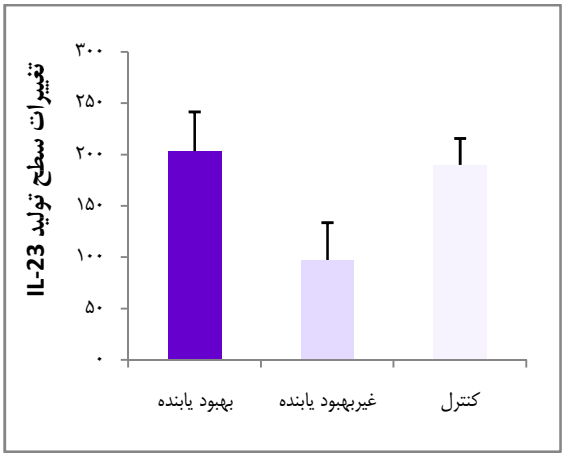
	غیر التیامی	التیامی
سن (سال)*	۱۲/۰ ± ۳۸	۱۰/۷ ± ۳۴
مدت زمان بیماری (ماه) *	۳/۷ ± ۱۶/۳	۱/۰ ± ۲/۵
تعداد زخم*	۱/۰ ± ۲/۵	۱/۷ ± ۳/۱
درصد زخم در دست‌ها	۳۷/۳	۳۹/۷
درصد زخم در پاها	۳۴/۹	۳۰/۳
درصد زخم در تنه	۲۰/۳	۱۹/۴
درصد زخم در صورت و گردن	۷/۵	۱۰/۶

*: انحراف معیار ± میانگین

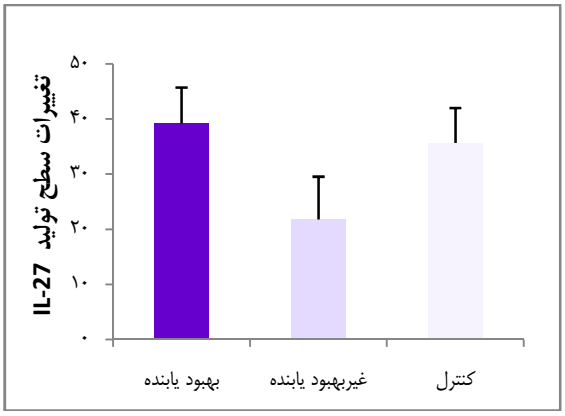
نتایج نشان داد که تغییرات سطح تولید IL-23 قبل و بعد از تحریک در گروه التیامی (۲۵/۲۳ ± ۲۰۳/۵۴ پیکوگرم در میلی‌لیتر) نسبت به گروه غیر التیامی (۲۸/۵۵ ± ۹۷/۴۱ پیکوگرم در میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین تفاوت معنی‌داری در اختلاف میزان ترشح IL-23 قبل و بعد از تحریک بین گروه غیر التیامی و گروه شاهد دیده شد ($P < ۰/۰۰۱$). در حالی که تغییرات سطح تولید IL-23 قبل و بعد از تحریک در گروه التیامی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ($P = ۰/۶۲۰$) (شکل ۲).

همچنین تغییرات سطح تولید IL-27 قبل و بعد از

تحریک در گروه التیامی (۶/۴۸ ± ۳۹/۲۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر) نسبت به گروه غیر التیامی (۷/۷۳ ± ۲۱/۷۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری افزایش داشت (P < ۰/۰۰۱). همچنین تفاوت معنی‌داری دراختلاف میزان ترشح IL-27 قبل و بعد از تحریک بین گروه غیر التیامی و گروه شاهد دیده شد (P < ۰/۰۰۱). در حالی که این تغییرات سطح تولید IL-27 قبل و بعد از تحریک در گروه التیامی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (P = ۰/۳۲۰) (شکل ۳).



شکل ۲. مقایسه‌ی تغییرات سطح تولید IL-23 قبل و بعد از تحریک در سه گروه التیامی، غیر التیامی و شاهد



شکل ۳. مقایسه‌ی تغییرات سطح تولید IL-27 قبل و بعد از تحریک در گروه التیامی نسبت به گروه غیر التیامی و شاهد

بحث

تاکنون مطالعات زیادی در مورد پاسخ های ایمنی علیه لیشمانیوز انجام شده است ولی هنوز یک مارکر کلیدی که معرف روند بهبود زخم و محافظت در انسان باشد، شناسایی نشده است (۱۲-۱۱، ۹-۸). IL-12، IL-23 و IL-27 خانواده‌ای از سیتوکین‌ها هستند که در تحریک سلول‌های Th1 مؤثر می‌باشند (۲۲). در این مطالعه سطح تولید IL-23 و IL-27 مورد بررسی قرار گرفت تا احتمال ارتباط ترشح IL-23 و IL-27 در روند بهبود زخم در بیماران مبتلا به CL ناشی از L.major مشخص شود. نتایج به دست‌آمده نشان داد که ترشح این دو سیتوکین در هر دو گروه بیماران پس از تحریک ماکروفاژها به وسیله‌ی انگل افزایش داشت. همچنین تغییرات سطح تولید آن‌ها قبل و بعد از تحریک در دو گروه بیماران التیامی و غیر التیامی نیز اختلاف معنی‌داری را نشان داد. تغییرات ترشح این دو سیتوکین در گروه شاهد نیز نسبت به گروه غیر التیامی افزایش معنی‌داری داشت ولی تغییرات ترشح IL-23 و IL-27 در گروه التیامی و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. تفاوت در تولید IL-23 و IL-27 در دو گروه بیماران ممکن است به دلیل تفاوت در تقابل بین ساختارهای (Pathogen-associated molecular patterns) PAMs و (Pathogen recognition receptors) PRRs سیستم ایمنی در این دو گروه باشد (۲۳). از طرف دیگر تفاوت در ایجاد سیگنال‌های داخل سلولی و آداپتور های داخلی در این دو گروه نیز محتمل است. این تفاوت ممکن است منجر به تولید فاکتورهای تنظیمی، مولکول‌های فعال‌کننده و مهارکننده‌ی مسیر شود و در نهایت به بیان متفاوت

سیتوکین‌ها منجر گردد (۲۴).

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در ارتباط با سیستم ایمنی میزبان و انگل لیشمانیا و همچنین پروفایل سیتوکینی در مدل موشی و انسانی انجام شده است (۲۵، ۱۱، ۸-۷). مطالعات نشان می‌دهد IL-27 در محیط برون‌تنی قادر به مهار تمایز سلول‌های Th1 است (۲۶). همچنین در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد که درمان روزانه‌ی موش‌های آلوده به L.major به وسیله‌ی IL-27 می‌تواند در کاهش بار انگلی و افزایش پاسخ‌های Th1 مؤثر باشد (۱۸). تحقیقاتی که بر روی توکسوپلاسما، یکی دیگر از انگل‌های داخل سلولی انجام شده است، نشان داد با وجود این که IL-12 نقش اساسی در مقاومت علیه توکسوپلاسموز دارد ولی در صورت عدم حضور IL-12، سیتوکین IL-23 نیز می‌تواند نقش محدودی در ایجاد مکانیسم مقاومتی در برابر این آلودگی ایفا کند (۲۷). از طرف دیگر مشاهده شده است که IL-12 و همراهی سایر اعضای خانواده (IL-23 و IL-27) در القای پاسخ‌های ایمنی و پلاریزه شدن سلول‌های Th1 در ماکروفاژهای آلوده به باکتری‌های گرم مثبت نقش دارند (۲۸). نقش IL-12 در فعال کردن سلول‌های NK (Natural killer) و افزایش تولید IFN-γ، مشخص شده است (۳۰-۲۹). بنابراین امکان وجود مکانیسم مشابه برای سایر اعضای این خانواده هست. با توجه به نتایج به دست‌آمده و تحقیقات انجام‌شده به نظر می‌رسد IL-23 و IL-27 به همراه سایر سیتوکین‌های التهابی نقش احتمالی و کمک‌کننده در حفاظت در برابر پاتوژن‌های داخل سلولی از جمل لیشمانیا داشته باشند. مطالعات بیشتری جهت اثبات نقش آن‌ها به عنوان یک مارکر کلیدی که در روند بهبود زخم‌های CL مؤثر است، لازم می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۱۸۸۰۵۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. در پایان از معاونت تحقیقات و فناوری به دلیل حمایت مالی و همچنین مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) و به ویژه سرکار خانم لیلا شیرانی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. Clin Dermatol 1996; 14(5): 425-31.
2. Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354(9185): 1191-9.
3. Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol 2007; 25(2): 203-11.
4. von SE. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. Exp Dermatol 2007; 16(4): 340-6.
5. Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Rollinghoff M. Experimental murine leishmaniasis and the Th1/Th2 cell concept. Tokai J Exp Clin Med 1998; 23(6): 347-50.
6. Muller I, Fruth U, Louis JA. Immunobiology of experimental leishmaniasis. Med Microbiol Immunol 1992; 181(1): 1-12.
7. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nat Rev Immunol 2002; 2(11): 845-58.
8. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. Infect Immun 2000; 68(4): 1760-4.
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. Mahmoodi M, Rajabalian S, Fekri A, Esfandiarpour I. Evaluation of In Vitro Production of IFN-gamma, IL-10, IL-12 and IL-13 by Blood Cells in Patients with Cutaneous Leishmaniasis Lesions. Iran J Allergy Asthma Immunol 2005; 4(1): 15-21.
11. Habibi GR, Khamesipour A, McMaster WR, Mahboudi F. Cytokine gene expression in healing and non-healing cases of cutaneous leishmaniasis in response to in vitro stimulation with recombinant gp63 using semi-quantitative RT-PCR. Scand J Immunol 2001; 54(4): 414-20.
12. 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.
13. Bogdan C, Gessner A, Rollinghoff M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. Immunobiology 1993; 189(3-4): 356-96.
14. Hunter CA, Villarino A, Artis D, Scott P. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. Immunol Rev 2004; 202: 106-14.
15. Tan ZY, Bealgey KW, Fang Y, Gong YM, Bao S. Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41(4): 733-5.
16. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity 2000; 13(5): 715-25.
17. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. Immunity 2002; 16(6): 779-90.
18. Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. J Immunol 2007; 179(7): 4415-23.
19. Yoshida H, Miyazaki Y. Regulation of immune responses by interleukin-27. Immunol Rev 2008; 226: 234-47.
20. Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. Immunol Rev 2004; 202: 139-56.
21. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14(5): 361-8.
22. Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2006; 54(1): 15-24.
23. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004; 4(7): 499-511.
24. Romagnani S. Regulation of the T cell response. Clin Exp Allergy 2006; 36(11): 1357-66.
25. Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. FEMS Microbiol Lett 2002; 209(1): 1-7.
26. Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, et al. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. Immunity 2001; 15(4): 569-78.
27. Lieberman LA, Cardillo F, Owyang AM, Rennick DM, Cua DJ, Kastelein RA, et al. IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. J Immunol 2004; 173(3): 1887-93.
28. Smits HH, van Beelen AJ, Hessle C, Westland R, de JE, Soeteman E, et al. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. Eur J Immunol 2004; 34(5): 1371-80.
29. Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. J Immunol 1995; 154(10): 5320-30.
30. Wang ZE, Zheng S, Corry DB, Dalton DK, Seder RA, Reiner SL, et al. Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to Leishmania major. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(26): 12932-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 04.05.2013
Vol. 31, No. 252, 2nd Week, November 2013
Accepted: 11.09. 2013

Study of IL-12 Agonists in Macrophages from Patients with Healing and Non-Healing Forms of Cutaneous leishmaniasis

Sepideh Tolouei PhD[1], Seyed Hossein Hejazi PhD[2], Seyed Javad Hasheminia MSc[3], Reza Arjmand MSc[4], Ali Khamesipour PhD[5], Mohamad Ali Nilforoushzadeh MD[6]

Original Article

Abstract

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a self-healing disease; however, due to some reasons, in a few cases the lesion develops to a non-healing form of disease. The initial encounter of Leishmania with its host's innate immune system is important in the outcome of infection. Although, tremendous data is available in murine model of leishmaniasis but immunological surrogate marker(s) of healing and protection in human is not yet well-defined. In this study, the level of IL-23 and IL-27 produced by peripheral blood derived macrophages from patients with healing or non-healing form of cutaneous leishmaniasis lesion were determined to explore whether IL-23 or IL-27 plays a protection role in healing process of cutaneous lesions induced by Leishmania major (L. major).

Methods: 26 six patients resident in Isfahan Province, Iran, with healing or non-healing forms of cutaneous leishmaniasis caused by L. major were selected. In-vitro productions of IL-23 and IL-27 by peripheral blood derived macrophages, before and after stimulation with live L. major (MRHO/IR/75/ER) promastigotes were evaluated in these two groups and control group using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

Findings: The mean difference production of IL-23 and IL-27 from macrophages of patients with healing form of lesion was significantly higher than patients with non-healing form. The levels of IL-23 and IL-27 in culture supernatants before and after stimulation in healing form of disease was significantly higher than non-healing form ($P < 0.001$).

Conclusion: It seems that IL-12 agonists might play a protection role in human leishmaniasis and further studies are needed to understand the role of these cytokine in cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Agonist, IL-23, IL-27, Macrophages, Promastigote, Cutaneous leishmaniasis

Citation: 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.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(252): 1435-42

1- Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Skin Disease and Leishmaniasis Research Center AND Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Professor, Center for Research and Training in Skin Disease and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- Associate Professor, Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.mui.ac.ir