دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته انگل شناسی پزشکی

شماره طرح: ۳۹۴۲۴۹

عنوان:

بررسی اثر استرادیول بر سلول های کراتینوسیت و فیبروبلاست تیمار شده با سوپرناتانت سلول های تک هسته ای خون محیطی آلوده به *Leishmania major* در محیط کشت

استاد راهنما:

دکتر سید حسین حجازی

اساتید مشاور:

مهرآفرین فشارکی

دکتر شروین غفاری حسینی

نگارش:

محسن قماشلویان

بهمن ماه ۱۳۹۵

چکیده:

عنوان: بررسی اثر استرادیول بر سلول های کراتینوسیت و فیبروبلاست تیمار شده با سوپرناتانت سلول های خون محیطی آلوده به *لیشمانیا ماژور*

مقدمه:لیشمانیوز جلدی که با تلقیح انگل *لیشمانیا ماژور* به وسیله ی پشه خاکی به انسان ایجاد می شود، به علت زخم های مزمن جلدی و جوشگاهی که از خود به جا می گذارد، در مناطق اندمیک از جمله کشور ما، یک معضل بهداشتی به شمار می رود .تحقیقاتی که تاکنون در مورد این بیماری صورت گرفته است بیشتر بر تولید واکسن و داروهای ضدانگلی متمرکز بوده است و با وجود صرف هزینه های زیاد موفقیت چندانی حاصل نشده است. از آنجا که فرایند ایجاد و ترمیم زخم از بر هم کنش سلول های التهابی حاضر در موضع با سلول های اپی درم و درم ناشی می شود، اولین قدم برای مطالعه ی مکانیسم ایجاد زخم می تواند بررسی اثر سلول های التهابی بر سلول های اصلی اپی درم و درم یعنی کراتینوسیت و فیبروبلاست باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تاثیرات سوپرناتانت ماکروفاژ سالم و ماکروفاژ های آلوده به *لیشمانیا ماژور* و تاثیرات احتمالی بازدارندگی استرادیول روی سلول های طبیعی پوست انسان ، یعنی فیبروبلاست و کراتینوسیت به دو روش MTT assay و فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج MTT نشان داد با وجود تاثیرات مخرب سوپرناتانت ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور ، استرادیول با غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ نانومولار تاثیر بازدارنده معنی داری روی بقاء سلول ها نداشت. بررسی های نتایج فلوسیتومتری نیز نشان داد که سوپرناتانت ماکروفاژ آلوده می تواند منجر به القاء فرایند آپوپتوز در سلولهای فیبروبلاست شود.

بحث: آنچه مشهود است تخریب سلول های فیبروبلاست انسانی در محیط کشت به واسطه هم ماکروفاژ سالم و هم ماکروفاژ آلوده است. با توجه به این که ماکروفاژها در حالت طبیعی در بدن چنین اثرات مخربی روی سلول های پوستی ندارند و از سوی دیگر ماکروفاژهای آلوده غیرفعال و قادر به تولید اینترلوکین ۱۲ و رادیکال های آزاد مثل نیتریت اکساید نیستند، به نظر می رسد آنچه منجر به تخریب بافت اصلی پوست به واسطه آلودگی با انگل *لیشمانیا ماژور* می شود ، واکنش ماکروفاژ به حضور انگل است.

کلید واژه ها: *لیشمانیا ماژور* – کراتینوسیت – فیبروبلاست – آپوپتوز –استرادی

فهرست مطالب

فصل اول/ معرفی پژوهش

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۱-۱. تاریخچه بیماری لیشمانیازیس و کشف عامل لیشمانیا ۲

۱ -۱-۲. اشکال مختلف انگل لیشمانیا ۳

۱-۱-۳. چرخه زندگی انگل لیشمانیا ۴

۱-۱-۴. لیشمانیازیس جلدی و آسیب شناسی ۶

۱-۱-۵. ایمنی در برابر انگل لیشمانیا ۷

۱-۲.بیان مساله و ضرورت اجرای پژوهش ۹

۱-۳. اهداف پژوهش ۱۲

۱-۳-۱. هدف کلی ۱۲

۱-۳-۲. اهداف اختصاصی ۱۲

۱-۴. سوالات پژوهشی ۱۳

۱-۵. فرضیه های پژوهشی ۱۳

۱-۶. کلید واژه ها ۱۴

فصل دوم/ مبانی نظری و پیشینه پژوهش

۲-۱- مقدمه ۱۶

فصل سوم /مواد و روش ها

۳-۱. نوع مطالعه و جمعیت مورد مطالعه ۱۸

۳-۲. جمعیت مورد مطالعه ۱۸

۳-۳. معیارهای قابل قبول ۱۸

۳-۴.معیار ورود ۱۸

۳-۵.معیار خروج ۱۸

۳-۶.روش نمونه گیری ۱۸

۳-۷.تعیین حجم نمونه ۱۹

۳-۸ کشت انگل لیشمانیا ماژور ۱۹

۳-۹. جداسازی PBMC ۱۹

۳-۱۰. آلوده کردن PBMC به انگل لیشمانیا ماژور و جمع آوری سوپرناتانت ۱۹

۳-۱۱. جداسازی کراتینوسیت ها از نمونه ی پوست و کشت کراتینوسیت ها ۲۰

۳-۱۲.کشت فیبروبلاست ۲۱

۳-۱۳. تیمار سلول های کشت شده کراتینوسیت و فیبروبلاست با سوپرناتانت با PBMC آلوده به لیشـمانیا مـاژور و استرادیول ۲۲
۳-۱۴. سنجش براساس رنگ (MTT-assay) ۲۲
۳-۱۵. فلوسایتومتری ۲۳
۳-۱۶. آنالیز آماری ۲۴
۳-۱۷. ملاحظات اخلاقی ۲۴
۳-۱۸. متغیرهای پژوهش ۲۶
فصل چهارم/ یافته های پژوهش
۴-۱.نتایج آزمون MTT ۲۸
۴-۲. نتایج بررسی ها به روش فلوسیتومتری ۲۹
۴-۳.بررسی میزان اثر استرادیول بر افزایش رشد سلول های فیبروبلاست انکوبه شده با ماکروفاژ و انگل لیشمانیا ۳۱
فصل پنجم/ بحث و نتیجه گیری و پیشنهادهای پژوهش
۵-۱. مقدمه ۳۴
۵-۲. بحث ۳۴
۵-۳. نتیجه گیری ۳۷
۵-۴. پیشنهادات ۳۷
منابع ۳۸
چکیده انگلیسی ۴۳

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: اماستیگوت ۴
شکل ۱-۲: پروماستیگوت ۴
شکل ۱-۳: سیکل زندگی انگل لیشمانیا ۶
شکل ۳-۱.ماکروفاژ ها پس از آلوده شدن به انگل لیشمانیا ماژور ۲۰
شکل ۳-۲. جداسازی کراتینوسیت ها از بافت زنده در هفته اول ۲۰
شکل ۳-۳. جداسازی کراتینوسیت ها پس از یک ماه ۲۰
شکل ۳-۴. انتقال کراتینوسیت ها به محیط حاوی کلاژن ۲۱
شکل ۳-۵. کشت سلول های فیبروبلاست انسانی ۲۱
شکل۳-۶ . ساختار Formazan و تشکیل بلورهای MTT ۲۲
شکل ۴-۱: میزان بقای سلول های فیبروبلاست در معرض ماکروفاژ و ماکروفاژ آلوده به انگل ۲۸

فهرست نمودارها

نمودار۴-۱: کنترل ۲۹
نمودار ۴-۲: ماکروفاژ سالم ۲۹
نمودار ۴-۳: ماکروفاژفرد مبتلا به سالک ۲۹
نمودار ۴-۴: ماکروفاژ فرد سالم انکوبه شده به انگل ۳۰
نمودار ۴-۵: ماکروفاژفرد مبتلا به سالک انکوبه شده به انگل ۳۰
نمودار ۴-۶. تاثیر استرادیول با غلظت ۱۰ نانومولار بر میزان بقاء سلول های فیبروبلاست ۳۱
نمودار ۴-۷. تاثیر استرادیول با غلظت ۱۰۰ نانومولار بر سلول های فیبروبلاست ۳۲

منابع

.۱ Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. Clinics in dermatology. 1996;14(5):425-31.

.۲ Pearson RD, de Queiroz Sousa A. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases. 1996:1-11.

.۳ Khan SJ, Muneeb S. Cutaneous leishmaniasis in Pakistan. Dermatology Online Journal. 2005;11(1.(

.۴ Cardo LJ, Salata J, Harman R, Mendez J, Weina PJ. Leukodepletion Filters for Prevention of Transfusion Transmission Of Leishmania. DTIC Document, 2006.

.۵ Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. Infection and immunity. 2001;69(6):4103-8.

.۶ Muñoz G, Davies CR. Leishmania panamensis transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. Biomédica. 2006;26:131-44.

.۷ Muniz J, Medina H. Leishmaniose tegumentar do cobaio: Leishmania enriettii n. sp: publisher not identified.۱۹۴۸ ;

.۸ Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of Leishmania in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Veterinary parasitology. 2005;129(3):219.۲۷-

.۹ Marini JC, Levene SD, Crothers DM, Englund PT. Bent helical structure in kinetoplast DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1982;79(24):7664-8.

.۱۰ Bradley D, Kirkley J. Regulation of Leishmania populations within the host. I. the variable course of Leishmania donovani infections in mice. Clinical and experimental immunology. 1977;30(1):119.

.۱۱ Smoller BR, Kruskall MS. Phlebotomy for diagnostic laboratory tests in adults. New England Journal of Medicine. 1986;314(19):1233-5.

.۱۲ Berman JD. In vitro susceptibility of antimony-resistant Leishmania to alternative drugs. Journal of Infectious Diseases. 1982;145(2):279.-

.۱۳ Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the

Leishmania genome is constitutively expressed. Molecular and biochemical parasitology. 2007;152(1):35-46.

.۱۴ Naderer T, Heng J, Saunders EC, Kloehn J, Rupasinghe TW, Brown TJ, et al. Intracellular survival of Leishmania major depends on uptake and degradation of extracellular matrix glycosaminoglycans by macrophages. PLoS Pathog. 2015;11(9):e1005136.

.۱۵ Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. Indian Journal of Medical Research.۲۳۸:(۶)۱۱۹;۲۰۰۴ .

.۱۶ Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. J Cell Sci. 1999;112(18):2993-3002.

.۱۷ Rogers ME, Hajmová M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, et al. Leishmania chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cellular microbiology. 2008;10(6):1363-72.

.۱۸ Belding DL. Textbook of parasitology. Textbook of Parasitology. 1965(3rd Edition.(

.۱۹ Macdonald MH, Morrison CJ, McMaster WR. Analysis of the active site and activation mechanism of the Leishmania surface metalloproteinase GP63. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology. 1995;1253(2):199-207.

.۲۰ David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatologic therapy. 2009;22(6):491-502.

.۲۱ Rabhi I, Rabhi S, Ben-Othman R, Rasche A, Daskalaki A, Trentin B, et al. Transcriptomic signature of Leishmania infected mice macrophages: a metabolic point of view. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(8):e1763.

.۲۲ Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. European journal of dermatology. 2007;17(2):115-22.

.۲۳ Daboul M. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. 2010.

.۲۴ Heyneman D. Immunology of leishmaniasis. Bulletin of the World Health Organization. 1971;44(4):499.

.۲۵ Roberts M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. British Medical Bulletin.۳۰-۱۱۵:(۱)۷۵;۲۰۰۵ .

.۲۶ Ohkusu K, Yoshimoto T, Takeda K, Ogura T, Kashiwamura S-i, Iwakura Y, et al. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of Leishmania major infection. Infection and immunity. 2000;68(5):2449-56.

.۲۷ Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one. 2012;7(5):e35671.

.۲۸ Terabe M, Kuramochi T, Hatabu T, Ito M, Ueyama Y, Katakura K, et al. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with Leishmania amazonensis infection. Parasitology international. 1999;48(1):47-53.

.۲۹ Osorio y Fortéa J, Prina E, de La Llave E, Lecoeur H, Lang T, Milon G. Unveiling pathways used by Leishmania amazonensis amastigotes to subvert macrophage function. Immunological reviews. 2007;219(1):66-74.

.۳۰ Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, Altznauer F, Simon H-U, Graeve T, et al. T cell–mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. The Journal of clinical investigation. 2000;106(1):25-35.

.۳۱ Abe R, Shimizu T, Shibaki A, Nakamura H, Watanabe H, Shimizu H. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. The American journal of pathology. 2003;162(5):1515-20.

.۳۲ Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. Journal of cell science. 2005;118(2):265-7.

.۳۳ Guan D-W, Ohshima T, Kondo T. Immunohistochemical study on Fas and Fas ligand in skin wound healing. The Histochemical Journal. 2000;32(2):85-91.

.۳۴ Eidsmo L, Wolday D, Berhe N, Sabri F, Satti I, El Hassan A, et al. Alteration of Fas and Fas ligand expression during human visceral leishmaniasis. Clinical & Experimental Immunology. 2002;130(2):307-13.

.۳۵ Kumar V, Abbas AK ,Aster JC. Robbins basic pathology: Elsevier Health Sciences; 2013.

.۳۶ Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. Journal of Investigative Dermatology. 2001;116(5):633-40.

.۳۷ El Ghalbzouri A, Hensbergen P, Gibbs S, Kempenaar J, van der Schors R, Ponec M. Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. Laboratory investigation. 2004;84(1):102-12.

.۳۸ Elso C, Kumar B, Smyth G, Foote S, Handman E. Dissociation of disease susceptibility, inflammation and cytokine profile in lmr1/2 congenic mice infected with Leishmania major. Genes and immunity. 2004;5(3):188-96.

۳۹. Hughes D, Mehmet H. Cell proliferation and apoptosis: Taylor & Francis; 2003.

۴۰. Von Stebut E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. Experimental dermatology. 2007;16(4):340-6.

۴۱. Sakthianandeswaren A, Elso CM, Simpson K, Curtis JM, Kumar B, Speed TP, et al. The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. Proceedings of the National Academy of sciences. 2005;102(43):15551-6.

۴۲. Habibi GR, Khamesipour A, McMaster W, 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. Scandinavian journal of immunology. 2001;54(4):414-20.

۴۳. Baldwin T, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Kumar B, Smyth GK, Foote SJ, et al. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. Parasite immunology. 2007;29(10):501-13.

۴۴. Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbiéri CL, Uliana SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of Leishmania braziliensis and Leishmania chagasi infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009;63(2):365-8.

۴۵. Reimao JQ, Miguel DC, Taniwaki NN, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Antileishmanial activity of the estrogen receptor modulator raloxifene. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5):e2842.

۴۶. Guler ML, Gorham JD, Hsieh C-S, Mackey AJ. Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. Science. 1996;271(5251):984.

۴۷. Akbari M ,Honma K, Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Matsuyama T, et al. IRF4 in dendritic cells inhibits IL-12 production and controls Th1 immune responses against Leishmania major. The Journal of Immunology. 2014;192(5):2271-9.

۴۸. Martínez-López M, Iborra S, Conde-Garrosa R, Sancho D. Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against Leishmania major infection in mice. European journal of immunology. 2015;45(1):119-29.

۴۹. Dillon LA, Suresh R, Okrah K, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Simultaneous transcriptional profiling of Leishmania major and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions. BMC genomics. 2015;16(1):1108.

۵۰. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. Future microbiology. 2015;10(1):111-29.

۵۱. Villegas-Mendez A, de Souza JB, Lavelle S-W, Findlay EG, Shaw TN, van Rooijen N, et al. IL-27 receptor signalling restricts the formation of pathogenic, terminally differentiated Th1 cells during malaria infection by repressing IL-12 dependent signals. PLoS Pathog. 2013;9(4):e1003293.

۵۲. Mohapatra P, Sarangi A, Sarangi AK, Dalai R, Sahoo D. Sequential serum cytokine levels of TNF-alpha, IL-4 and IL-12 are associated with prognosis in Plasmodium falciparum malaria. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2014;29(3):321-6.

The effect of supernatant of peripheral blood mononuclear cells infected with *Leishmania major* on human fibroblast cells

Abstract:

Introduction: Cutaneous Leishmaniasis which caused chronic ulcers of skin and scar by inoculation of Leishmania major by the sandflies to humans is considered as a main health problem in endemic areas of our country. Research about the disease was more focused on vaccine and antiparasitic drugs So far and despite the high cost they have little success yet. Since the process of healing caused by local interaction of inflammatory cells in the epidermis and dermis cells. The first step to study the mechanism of ulcer could be investigating effect of inflammatory cells on epidermis and dermis cells, i.e. keratinocytes and fibroblasts.

Material and Method: In this experimental study, effects of healthy macrophages Supernatant and macrophages infected with Leishmania major and the possible effects of estradiol inhibition on normal human cells, the fibroblasts and keratinocytes in two ways MTT assay and Flowcytometry was examined.

Results: MTT results showed that the destructive effects of supernatant macrophages infected with Leishmania major, estradiol concentrations of 10 and 100 nM did not significant inhibitory effect on cell survival. Evaluation of the results of Flowcytometry showed that the supernatant of the infected macrophages could be induced apoptosis in fibroblasts.

Discussion: the obtained data revealed that destruction of human fibroblast cells in vitro were occurred by both healthy and infected macrophage**.** According to the macrophages in normal body such devastating effects on skin cells do not and the infected macrophages disabled and unable to produce IL-12 and free radicals such as nitrite oxide not seem to be what leads to tissue destruction the main skin due to infection with Leishmania major, the macrophage response to the presence of parasites.

Key Words: *Fibroblast cell, keratinocyte, Leishmania major, Apoptosis, Esteradiol*

Faculty of Medicine

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment

For the Degree of M.A in Parasitology

Title:

Effect of estradiol on keratinocytes and fibroblasts treated with supernatant of peripheral blood mononuclear cell culture infected with *Leishmania major*

Supervisor:

Dr.Seyed Hossein Hejazi

Advisor:

Dr. Mehrafarin Fesharaki

And

Dr. Shervin ghaffari Hosseini

By:

Mohsen Ghomashlooyan

February 2017