Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

ORIGINAL ARTICLE

The Impacts of Cytokine IL22 on the Ulcer Originated from L- Major in BALB/c Mice

Hajar Ziaei Hezarjaribi[1],
Fatemeh Ghaffarifar[2],
Abdolhossein Dalimi Asl[2],
Zohreh Sharifi[3]

[1] PhD Student in Parasitology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2] Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

(Received Junuary 17, 2011 ; Accepted February 28, 2012)

Abstract

Background and purpose: IL22 is the family member of IL10 created by Th17, Th22, NK cells and its role has been recently demonstrated in protection and innate defense mechanisms, control of bacterial and viral infection, homeostasis and tissue repair. This research investigated the impacts of Il22 treatment on lesion originated from L-major in BALB/c mice.

Materials and methods: Twenty four Iranian female BALB/c mice, 8 weeks old were challenged by $2x10^{6}$ Promastigotes of L-Major MRHO/IR/75/ER by the dose of 100 microliters in stationary phase. They were infected percutaneously and then were divided into three groups each with eight recombinant mice IL-22 that received two different doses of 5ng/mg and 10ng/mg IM. Immune evaluation of cellular and humoral immunity was done by assessing IL-4 Cytokine, IFN-ɤ and culturing of spleen lymphocyte cells. Also, investigation of IgG2a, IgG total was carried out by Elisa method and MTT colorimetric assay. Furthermore, clinical investigations including measuring wound healing, life span of mice and recording of mortality rate was done.

Results: The results indicates that the growth of wound reduced in the group treated with IL22 and the most impact was seen in the group under treatment with IL22 (5ng). IL22 (5ng) increased the production of IFN-ɤ but deceased the production of IL4. Findings from LSD test showed that the rate of IFN-ɤ and IGg total in the group treated with IL22-5ng was significantly different from other groups. There was no significant difference between Il22-5ng and IL22-10ng regarding the rate of IL4 and the rate of IgGg2a. Furthermore, MTT in the group treated with IL22-5ng was significantly different from other groups.

Conclusion: IL22-5ng leads to Cytokine Th1 response through increasing the production of IFN-ɤ and decreasing the production of IL4, which result in protective response against L-major. Hence, it may have effective impacts in treatment if used with a combined anti leishmania drug.

Key words: *Leishmania major*, IL22, BALB/c mice

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(Supple 1): 283-292 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۰ (۲۹۲-۲۸۳)

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

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

چکیده

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

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

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان می‌دهد که رشد زخم به‌صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL۲۲ کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با (۵ng) IL۲۲ بوده است. IL۲۲-۵ 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 IL۲۲-۵ ng با p<۰/۰۵ نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL۴ گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ ng با p<۰/۰۵ نسبت به IL۲۲-۱۰ ng معنی‌دار نیست ولی با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IGg2a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ ng با p<۰/۰۵ نسبت به IL۲۲-۱۰ ng معنی‌دار نیست ولی باسایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار است. MTT در گروه دریافت‌کننده IL۲۲-۵ ng با p<۰/۰۵ نسبت به سایر گروه‌های تحت درمان معنی‌دار است.

استنتاج: نتایج نشان می‌دهد که چون IL ۲۲-۵ ng با افزایش تولید گاما اینترفرون وکاهش تولید اینترلوکین ۴ سبب ایجاد پاسخ‌های سایتوکین Th1 شده، سبب ایجاد پاسخ حفاظتی در مقابل انگل لیشمانیا می‌شود لذا اگر با داروهای ضدلیشمانیا تواماً تجویز شود شاید اثرات بهتری را در درمان بر علیه لیشمانیا فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین۲۲، لیشمانیا ماژور، موش BALB/c

مقدمه

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

مولف مسئول: فاطمه غفاری فر- تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی E-mail: ghafarif@modares.ac.ir
۱. دانشجوی دکترای 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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

دومین عامل مرگ و میر و چهارمین عامل شیوع بیماری‌های عفونی در مناطق گرمسیری است(۲،۱). لیشمانیوز جلدی عمده‌ترین شکل بیماری لیشمانیازیس است که توسط حداقل ۱۲ گونه آن ایجاد می‌شود.

بیماری لیشمانیازیس در ۸۸ کشور اندمیک می‌باشد حدود ۱۵ میلیون نفر به آن مبتلا بوده 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 نفر 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(۴،۲).

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(۶،۵). 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 می‌باشد و نیز در روش استفاده تزریقی از آن به‌دلیل دردناک بودن و طولانی بودن مدت استفاده، که موجب تزریقات مکرر دارو می‌شود سبب شده تا از روش‌های درمانی جایگزین استفاده شود(۸،۷).

IL۲۲ یک سایتوکین عضو خانواده IL۱۰ است و اعضای این خانواده سایتوکینی شامل IL۱۰، IL۱۹، IL۲۰، MDA ۷ (IL۲۴)، IL(TIF) و IL۲۲ و IL۲۶ می‌باشد چنان‌که می‌دانیم IL۱۰ به‌عنوان سردسته این خانواده سایتوکین، یک مهارکننده مؤثر ایمنی سلولی و تقویت‌کننده قوی ایمنی هومورال است(۹). گرچه اعضای این خانواده مشترکات ساختمانی بسیار زیادی دارند ولی از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمونولوژیک تفاوت‌های فاحشی بین آن‌ها وجود دارد. لوکوس ژنی رسپتورهای این خانواده سایتوکینی نیز بر روی کروموزوم‌های مختلفی واقع شده‌اند و مشخص شده که پدیده پلئوتروپیسم (تأثیر چند سایتوکین برروی یک رسپتور) و هم پوشانی Redundancy (تأثیر یک سایتوکین روی چند رسپتور) در مورد رسپتورهای این خانواده وجود دارد. این سایتوکین دارای خاصیت پلئوتروبیک هم در داخل سیستم ایمنی و هم در خارج آن می‌باشد. رسپتور هترودیمر IL۲۲ شامل گیرنده (CRF ۲-۴) IL۱۰ و زنجیره IL۲۲ -R، IL۱۰ R۲ و IL۱۰ R۳ (CRF ۲-۹) است که علی رغم داشتن این رسپتور مشترک پاسخ IL۲۲ مستقل از IL۱۰ است(۱۲-۹). IL۲۲ که به آن IL-TIF، [IL۱۰ related Tcell-derived inducible factor] نیز گفته می‌شود توسط Th۱۷ خصوصاً NK Cells، Th۲۲، (CCR۰+) و TCells (Th۱) به محض فعال شدن به IL۴ و همچنین به وسیله ماست سل‌های تیموس و مغز پس از فعال شدن با ConA ترشح می‌شود و از معدود سایتوکین‌هایی است که وجودش حتی در غیر از پستانداران نظیر ماهی‌ها به اثبات رسیده است(۱۳،۱۱). CRF ۲-۴ بین IL۲۲ و IL۱۰ مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است؛ در حالی که CRF۲-۹ مختص IL۲۲ است و دارای هومولوژی با دومین زنجیره گیرنده IL۱۰ است. وجود CRF ۲-۹ و CRF ۲-۴ یعنی دو زنجیره گیرنده این سایتوکین در سیگنالینگ مؤثر است و در مسیر سیگنالینگ این سایتوکاین STAT شامل STAT۱ و STAT۳ و STAT۵ فعال شده متعاقب آن تولید پروتئین‌های فاز حاد از کبد افزایش می‌یابد و نقش این سایتوکین را به‌عنوان یک سایتوکین التهابی تثبیت می‌کند.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

IL۲۲ باعث فعال‌سازی JAK۱ ، TYK۲ ، STAT۱ ، STAT۳ و STAT ۵ و مسیر MAP کیناز می‌شود.

امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سایتوکین هستند(۱۶-۱۱). IL۲۲ هم نقش مضر و هم نقش محافظتی دارد و اثر زیان‌آور آن در القاء هیپرپلازی اپی‌تلیال پوست در بیماری پسوریازیس انسانی است و یا IL۲۲ همراه با IL۱۷ سیتوکین‌های پیش‌التهابی را در سلول‌های برونشیال اپی‌تلیال و میوفیبروبلاست‌های کولون تحریک می‌کند و سبب ایجاد آلرژی و کولیت می‌شود(۱۸،۱۷). از طرفی اثر محافظتی IL۲۲ در باکتری گرم منفی عامل بیماری پنومونی که IL۲۲ ترشح عامل ضد میکروبی را در سلول‌های اپی‌تلیال ریوی افزایش می‌دهد(۱۸). IL۲۲ به تنهایی و بدون IL۱۷ در کبد مبتلا به هپاتیت با پیشگیری از آپتوزیس، هپاتوسیت‌ها را محافظت می‌کند(۱۹). در پوست IL۲۲ سبب القای پپتیدهای ضدمیکروبی می‌شود و تکثیر کراتینوسیت‌ها را افزایش و تمایز آن‌ها را مهار می‌کند و نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد(۱۶). نقش IL۲۲ در اختلالات پوستی نظیر AE (Atopic eczema) درماتیت Allergic contact dermatitis (ACD) حساسیتی تماسی ناشناخته است(۱۶). IL۲۲ تولید شده به‌وسیله سلول‌های NK رشد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را با فعال کردن ماکروفاژها و افزایش فعالیت فاگولیزوم مهار می‌کند(۲۰). IL۲۲ یک اثر حفاظتی در بیماری کالازار انسانی دارد و لیشمانیا دونوانی تمایز سلول‌های Th۱۷ ، IL۲۲ و گاما اینترفرون را تحریک می‌کند(۲۱).

با توجه به این‌که هنوز عواملی که صد در صد در جهت بهبودی و در روند مشکلات ریشه‌کنی انگل و مشکلات مربوط به کنترل ناقلین بند پا باشد تعریف نشده است و اخیراً نیز نقش IL۲۲ در ایجاد حفاظت و مکانیسم دفاعی ذاتی خصوصاً اجرام داخل سلولی ثابت شده لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر درمانی IL۲۲ بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c می‌باشد.

مواد و روش ها

آماده سازی و تزریق سایتوکین IL ۲۲

IL۲۲ موشی ازشرکت R&D با Cat.number 582-L براساس دستور برنامه در PBS استریل به‌صورت ۰/۱ درصد در BSA آماده شد.

آماده سازی موش‌ها به تعداد ۲۴ سر موش سفید کوچک ماده خالص BALB/c inbred به دلیل حساس بودن به پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در سن ۸ هفتگی از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج به‌عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی در این تحقیق انتخاب و خریداری و تحت شرایط استاندارد از لحاظ آب و غذا نگهداری شدند. گروه‌بندی موش‌ها بر اساس نوع ماده تزریقی انجام شد. روش آلوده‌سازی موش‌های BALB/c با انگل لیشمانیا ماژور صورت گرفت که کل موش‌ها با تعداد حداقل ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور L.major سویه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا (stationary) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ازطریق تلقیح زیرجلدی در قاعده دم چالش شده که بعد از۴-۳ هفته بعد از تزریق در لمس ناحیه تزریق برجستگی و ندول احساس می‌شد و سپس زخم حاصل از رشد انگل در قاعده دم موش تشکیل شد. قبل از شروع درمان از تمامی زخم‌ها نمونه‌برداری شد و بعد از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۲۴ موش به سه گروه ۸ تایی، یک گروه ۸ تایی دریافت‌کننده PBS به‌عنوان گروه کنترل (۱۰۰ میکرو لیتر و ۱۶ موش دیگر در دو گروه ۸ تایی IL۲۲ را در دو دوز مختلف ۵ng/ml و ۱۰ng/ml به‌صورت داخل عضلانی و تک‌دوز در عضله چهار سر ران quadriceps در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سورنگ انسولین با سرسوزن ۳۰gauge دریافت نمودند. تعداد ۴ موش در هر گروه برای بررسی ایمنی هومورال و سلولار و تعداد ۴ موش دیگر در هرگروه برای بررسی طول عمر و بررسی قطر زخم و وضعیت مرگ ومیر آن‌ها چالش می‌شوند(۲۲).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

بررسی ایمنی سلولار و هومورال

بررسی ایمنی سلولار و هومورال با سنجش سایتوکین‌های IL۴ و گامااینترفرون و بررسی TgG Total ، IgG۲a و MTT و بررسی‌های بالینی با اندازه‌گیری قطر زخم و ثبت مرگ و میر به‌طور هفتگی بررسی شدند. برای بررسی ایمنی هومورال ۷ هفته بعد از چالش با انگل به کمک لوله‌های موئینه از گوشه، چشم موش‌ها خونگیری انجام شد. سرم جدا شد. سپس سرم خون موش‌ها برای بررسی ایمنی هومورال جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سرم‌های گرفته شده از موش‌های کنترل و موش‌های دریافت‌کننده IL۲۲ با آزمایش الایزا طی مراحل مختلف زیر به انجام پذیرفت. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از آنتی‌ژن با غلظت‌های ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر کربنات– بی‌کربنات ۰/۱ مولار به همه چاهک‌ها بجز چاهک‌های کنترل بلانک در پلیت‌های الایزا ریخته شد. 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، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده (۱/۱۰) در بافر رقیق‌کننده (PBS) به حفرات اضافه شده 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 و در حفرات ریخته شده، 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 با ۳۷ درجه انکوبه شدند، برای توقف واکنش ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ مولار به همه چاهک‌های پلیت‌ها اضافه نموده بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای اندازه‌گیری میزان جذب نوری قرائت انجام شد. برای بررسی ایمنی سلولار ۷ هفته پس از چالش با انگل اندازه‌گیری سایتوکین‌های گاما اینترفرون و IL۴ ایمنی سلولی مورد بررسی قرار گرفت. ۷ هفته پس ازچالش با انگل استخراج لنفوسیت از طحال موش‌های مورد و شاهد به صورت زیر انجام گرفت.

ابتدا موش‌ها کشته شده، از سلول‌های طحال موش در شرایط استریل در محلول PBS سوسپانسیون سلولی تهیه شد. رسوب سلول ها پس از شستشو و سانتریفیوژ با محیط RPMI 1640 که حاوی FCS ۱۰ درصد است، به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد و کشت سلول‌های لنفوسیت طحال موش جهت بررسی وجود سایتوکین‌های IFN-γ و IL۴ در پلیت ۲۴ خانه‌ای به تعداد $۲/۵\times۱۰^{۶}$ کشت داده شد. از سوپ سلولی، لنفوسیت‌های طحالی موش‌های چالش شده و درمان شده پس از در ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت جمع‌آوری شد و در ویال اپندورف جمع شده در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی در مقادیر ۳۰۰ میکرولیتر در ویال‌ها تقسیم شد و تا زمان سنجش سایتوکین 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°C- نگهداری شده استفاده گردید و با روش الایزا و با استفاده ازکیت شرکت U-cytech-biosciences استفاده شد.

روش MTT برای سنجش تکثیر لنفوسیت ها

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

به دو چاهک از هر گروه، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی ژن انگل لیشمانیا ماژور افزوده شد و به یک چاهک دیگر همان گروه هیچ آنتی‌ژنی اضافه نگردید. حجم نهایی هر چاهک با

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

FBS ۱۰ درصد+ RPMI به ۲۰۰ میکرولیتر رسید.

سپس از چاهک‌های هر گروه، ۲ چاهک به عنوان کنترل کشت داده شد که یکی از این چاهک‌ها با فیتوهماگلوتینین PHA به عنوان میتوژن تحریک و دیگری تحریک نمی‌شود. پلیت‌های کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C دارای ۵ درصد CO2 قرار می‌گیرد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک حاوی 200λ لنفوسیت مقدار(۲۰λ) از محلول MTT (غلظت ۵ mg/ml) اضافه گردید. پلیت مذکور مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO2 انکوبه شد(تا بلورهای فورمازان نمایان شوند). سوپ سلولی به آرامی بدون هم زدن محتویات چاهک‌ها سانتریفوژ شده و محتویات رویی به‌طور کامل خارج شد. به هر چاهک به مقدار ۱۰۰ λ از DMSO اضافه گردید. میزان جذب حاصل در طول موج ۴۵۰ nm توسط دستگاه Reader Elisa قرائت 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، یک، سه و چهار هفته بعد از درمان نمونه‌گیری و تهیه اسمیر از زخم و شمارش تعداد انگل (آماستیگوت) در ۱۰ شان انجام شد. اندازه‌گیری قطر زخم، پس از چالش و ظاهر شدن زخم در قاعده دم موش با استفاده از کولیس دیجیتال به‌طور هفتگی اندازه‌گیری شد. بدین‌نحو که حاصل جمع طول و عرض قطر زخم بر عدد ۲ تقسیم و به عنوان عدد مربوط به قطر زخم در نظر گرفته می شد. وزن موش‌ها طی درمان به‌صورت هفتگی با ترازو کشیده و یادداشت گردید.

آنالیز آماری

نتایج به‌دست آمده از ندازه‌گیری گامااینترفرون و IL۴ و توتالIgG و MTT و IGg ۲ a و بررسی قطر زخم و بقاء موش‌ها در گروه‌های کنترل و مورد اطلاعات وارد نرم‌افزار SPSS شد و از آزمون One way ANOVA و برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون‌های تعقیبی LSD و TUKEY استفاده شد.

یافته ها

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

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

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

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، IL۲۲-۱۰ng و IL۲۲-۵ng نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح p=۰/۰۰۰۱ 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 IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ با دو گروه دیگر در روزهای ۳۰ و ۳۷

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ولی در سایر روزها فقط با گروه PBS اختلاف آماری معنی‌دار دیده شد (p<۰/۰۵). جهت بررسی روند آلودگی پس از گذشت ۵۱ روز در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng ندول بسیار کوچکی مشاهده شد و میانگین تعداد اماستیگوت این گروه در ۱۰ فیلد(۴،۵) در مقایسه با میانگین تعداد اماستیگوت‌ها درگروه IL۲۲-۱۰ng (۵۰،۱۱) و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است. با این‌که در پایان دوره درمان تعداد اماستیگوت‌های گروه‌های دریافت‌کننده IL۲۲ کاهش داشت ولی بیشترین کاهش تعداد اماستیگوت را در گروه IL۲۲-۵ng داشتیم. در مقایسه میزان مرگ ومیر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ‌گونه مرگ ومیر در گروه‌های تحت درمان با IL۲۲ نداشتیم در صورتی‌که در گروه PBS (۱) مرگ در هفته چهارم اتفاق افتاد. قبل از شروع درمان از لحاظ میانگین اندازه و وزن اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. ولی بررسی میانگین وزن با انجام آزمون LSD در هفته‌های مختلف نشان می‌دهد که گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng از نظر افزایش وزن با p <۰/۰۵ با دو گروه دیگر در روزهای ۱۱۴ و ۱۰۷ اختلاف معنی‌داری ندارد ولی در سایر روزها با گروه PBS اختلاف آماری معنی‌دار آماری دیده شد. نتایج بررسی‌های IFN-γ ، IGg۲a ، IGg total و IL۴ نشان می‌دهد که IL۲۲-۱۰ng به‌طور مشخص سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL۴ می‌شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، IL۲۲-۱۰ng و IL۲۲-۵ng نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که میزان گاما اینترفرون و IGg total گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL۴ گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IGg2a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۴ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار است(جدول شماره۲). میانگین MTT در چهار گروه به‌صورت زیر است که گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد. میانگین MTT (OD) درگروه دریافت‌کننده IL۲۲-۵ng، IL۲۲-۱۰ng و pbs به ترتیب ۰/۷۹۴، ۰، ۰/۴۱ و ۵۵۵ می‌باشد.

جدول شماره ۲: میانگین و انحراف معیار IFNγ، IL۴، IgG total و IgG۲a، در هفته هفتم بعد از درمان عفونت لیشمانیاماژور در موش BALB/c

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

بحث

از آن‌جایی که درمان بیماری لیشمانیوز جلدی در بهترین شرایط تنها ۸۰ درصد موفقیت داشته است 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 IL۲۲۵ng کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL۲۲۵ng بوده است و شروع بروز زخم در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng ۵۱ روز پس از درمان بوده در صورتی‌که در سایر گروه‌ها ۳۰ روز پس از درمان بوده است. از آن جایی‌که نتایج روی موش‌های BALB/c ماده نشان داد که در هفته های پس از عفونت با لیشمانیا ماژور، روند افزایش قطر زخم در گروه‌هایی که IL۲۲-۵ ng در یافت کردند کندتر از گروه دریافت‌کننده IL۲۲-۱۰ng و PBS است ولی روند افزایش قطر و اندازه زخم در گروه دریافت کننده IL۲۲-۱۰ng و PBS مشاهده شده است. امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجدگیرنده برای این سایتوکین هستند(۲۵). در پوست IL۲۲ سبب القای

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

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

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان باPBS، IL۲۲-۱۰ng و IL۲۲-۵ng نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح p=۰/۰۰۰ در ۳ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی‌دار اماری در اندازه زخم وجود دارد.که با استفاده از آزمون LSD نشان می‌دهد که گروه IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ با دو گروه دیگردر روزهای ۳۰ و ۳۷ اختلاف معنی‌دار آماری در اندازه زخم دارد ولی در روزهای ۸۶، ۹۳، ۱۰۷، ۱۱۴، ۱۲۱، ۴۴ و ۵۱ فقط با IL۲۲-۱۰ng اختلاف معنی‌دار نیست ولی در روزهای ۵۸، ۷۲، ۶۵ و ۷۹ با p<۰/۰۵ 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 IL۲۲-۵ng دریافت کردند کندتر از گروه دریافت‌کننده PBS است ودر مجموع نتایج اندازه زخم درگروهی که IL۲۲-۵ng را دریافت کرده، به مقدار گروه IL۲۲-۵ng نزدیک است ولی روند افزایش قطر و اندازه زخم در گروه دریافت‌کننده PBS مشاهده شده است که شاید نمایانگر اثر بهتر سایتوکین IL۲۲ باشد. امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سایتوکین هستند. در پوست IL۲۲ سبب القای پپتیدهای ضد میکروبی می‌شود و تکثیر کراتینوسیت‌ها را افزایش و تمایز آن‌ها را مهار می‌کند و یک نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد(۱۶،۲۵). در موش‌هایی که گروه کنترل را تشکیل می دادند و فقط PBS را دریافت کرده بودند روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه‌ها نیزمعنی دار بود. جهت بررسی روند آلودگی پس از گذشت ۵۱ روز در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng ندول بسیار کوچکی مشاهده شد و میانگین تعداد اماستیگوت این گروه در ۱۰ فیلد ۴/۵ در مقایسه با میانگین تعداد اماستیگوت‌ها درگروه IL۲۲-۱۰ng ۱۱/۵ و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است. با این‌که در پایان دوره درمان تعداد اماستیگوت‌های گروه‌های دریافت‌کننده IL۲۲ کاهش داشت ولی بیشترین کاهش تعداد اماستیگوت را در گروه IL۲۲-۵ng داشتیم. که شاید بتوان توجیه نمود که چون عفونت لیشمانیایی در موش بستگی به فعال شدن یکی از دو زیر گروه‌های سلولی CD+4 یعنی Th۱ و Th۲ دارد و پاسخ Th۱ با بهبودی و پاسخ Th۲ با عفونت منتشر ارتباط دارد و سلول‌های Th۱ با ترشح سایتوکین‌هایی مانند: TNF-ß، IL۲ و IFN-γ واسطه بهبودی می‌باشند و IFN-γ حاصل از این سلول‌ها به‌عنوان قوی‌ترین سایتوکین فعال کننده ماکروفاژهاست و فعال شدن ماکروفاژها منجر به تولید نیتریک اکسید NO و سرانجام منجر به مرگ انگل می‌شود(۲۸-۲۶).

نتایج سایر تحقیقات زیر شاید تأیید یافته فوق باشد. IL۲۲ با آن‌که یک سیتوکین عضو خانواده IL۱۰ است و IL۱۰ به عنوان سردسته خانواده سایتوکین، 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 CRF۲-۴ بین IL۲۲ و IL۱۰ مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است در حالی‌که CRF۲-۹ مختص IL۲۲ است و دارای هومولوژی بادومین زنجیره گیرنده IL۱۰ است.

وجود CRF۲-۹ و CRF۲-۴ یعنی دو زنجیره گیرنده این سایتوکاین در سیگنالینگ مؤثر هستند و در مسیر سیگنالینگ این سایتوکاین STAT شامل STAT۱، STAT۳ و STAT۵ فعال شده متعاقب آن تولید پروتئین‌های فاز حاد از کبد افزایش می‌یابد و نقش این سایتوکین را به‌عنوان یک سایتوکین التهابی تثبیت می‌کند. IL۲۲ باعث فعال‌سازی JAK۱، TYK۲، STAT۱، STAT۳، STAT۵ و مسیر MAP کیناز می‌شود(۱۶-۱۱).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

مطالعات زیادی در لیشمانیوز تجربی ناشی از لیشمانیا ماژور انجام گرفته است که نشان از ارتباط قوی بین تولید اینترفرون گاما و توانایی محدود کردن عفونت و از سویی ارتباط بین اینترلوکین ۴ و عدم توانایی کنترل عفونت است به طوری که تجویز anti-IFN-γ به موش‌های مقاوم سبب بزرگ شدن زخم و تأثیر در بهبودی می‌شود و بر عکس تجویز IFN-γ به موش‌های حساس سبب کوچک شدن زخم‌ها شده است. افزایش مقدار اینترفرون گاما نسبت به اینترلوکین ۴ در گروه‌های دریافت‌کننده IL۲۲ نشان‌دهنده این است که بیماری به سمت بهبودی می‌رود. زیرا ثابت شده که در مدل‌های موش‌های آزمایشگاهی که پاسخ‌های ایمنی به‌سمت TH۱ و اینترفرون گاما می‌رود؛ بیماری به‌سوی خودبه‌خود بهبود شونده می‌رود. در زمانی که پاسخ ایمنی به‌سمت Th۲ و اینترلوکین ۴ می‌رود بیماری شدت می‌یابد و وخیم می‌شود(۲۷،۲۸).

IL۲۲ یک اثر حفاظتی در برابر بیماری کالاآزار انسانی دارد و لیشمانیا دونووانی تمایز سلول‌های Th۱۷ را برای تولید IL۱۷ و IL۲۲ و گاما اینترفرون تحریک می‌کنند(۲۱). در مقایسه میزان مرگ ومیر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ‌گونه مرگ و میر در گروه‌های تحت درمان با IL۲۲ نداشتیم در صورتی‌که در گروه PBS (۱) مرگ در هفته چهارم اتفاق افتاد. قبل از شروع درمان از لحاظ میانگین اندازه وزن موش‌ها اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. از آن‌جایی‌که عامل زمان تأثیر قاطع بر روند بیماری، وزن و اندازه قطر زخم دارد بدیهی است که با گذشت زمان عفونت در حیوان تثبیت شده، بیماری بروز می‌کند. این مسأله منجر به بروز علایم در حیوان، کم خوراکی و از سویی تحلیل رفتن آن و در مجموع سبب کاهش وزن حیوان می‌شود. در موش‌هایی که گروه کنترل را تشکیل می‌دادند و فقط PBS را دریافت کرده بودند، روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بود. نتایج بررسی‌های IFN-γ، IGg۲a، IGg total و IL۴ نشان می‌دهد که IL۲۲-۵ng، به‌طور مشخص سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL۴ می‌شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان IL۲۲-۵ng IL۲۲-۱۰ng و PBS نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح p=۰/۰۰۱ در ۳ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. که برای آشکار سازی این اختلاف‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که میزان گاما اینترفرون و IGg total گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL۴ گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IGg۲a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با p<۰/۰۵ نسبت به IL۲۲-۱۰ng 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 p<۰/۰۵ 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، حلقهٔ تترازولیوم آن را بشکند و آن را به فورمازان نامحلول و آبی رنگ تبدیل کند. در حالی که سلول‌های مرده از این عمل ناتوان هستند. که در این آزمایش حداکثر پرولیفراسیون و حداکثر تکثیر و تحریک لنفوسیت‌ها در مربوط به گروه دریافت‌کننده IL۲۲-۵ng 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 IL۴ شده است و نمایانگر آن است که موش‌های تحت درمان با IL۲۲ سبب ایجاد پاسخ‌های سایتوکین Th۱ می‌شود از طرفی درصد بقاء بالا و کاهش مرگ و میر، افزایش چشمگیر وزن، کاهش قطر زخم، افزایش IgG۲a، اینترفرون گاما و کاهش میزان IL۴ نمایانگر کارایی

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

این سایتوکین در درمان لیشمانیوز جلدی می‌باشد که باید در آینده همراه با واکسن‌های لیشمانیا مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دکترای انگل شناسی خانم هاجر ضیایی هزارجریبی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

References

1. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLOS Negl Trop Dis 2008; 2(10): e313.
2. Handman E. Leishmaniasis; current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev 2001; 14(2): 229-300.
3. Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. Clin Dermat 1996; 14: 425-431.
4. Atlashewski MG. Leishmania infection and virulence. Med Microbiol Immunol 2001; 190(1-2): 37-42.
5. Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, et al. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterization of the causative organisms. Int J Parasitol 2004; 34(6): 655-664.
6. Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A, Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol 1999; 17(3): 257-260.
7. Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol 2003; 97(Suppl 1): 3-15.
8. Chang KP, Fong D, Bray RS. Biology of *leishmania* and leishmaniasis. In: Chang KP, Bray RS, eds. *Leishmaniasis: Human Parasitic Diseases*. Vol 1. Philadelphia: Elsevier; 1985. p. 1-30.
9. Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. J Immunol 2001; 167(7): 3545-2549.
10. Conti P, Kempuraj D, Frydas S, Kandere K, Boucher W, Letourneau R, et al. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. Immunol Lett 2003; 88(3): 171-174.
11. Igwa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL) 22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. Mol Immunol 2006; 43(7): 999-1009.
12. Dumoutier L, Van RE, Ameye G, Michaux L, Renauld JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse gene. Genes Immun 2000; 1(8): 488-494.
13. Pinto Nagem RA, Colau D, Dumoutier L, Renauld J-Ch, Ogata C, Polikarpov I. Structure of recombinant human interleukin-22. Structure 2002; 10(8): 1051-1062.
14. Gurney AL. IL-22, a Th1 cytokine that target the pancreas and select other peripheral tissue. Int Immunopharmacol 2004; 4(5): 669-677.
15. Jones SA, Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology the agonistic prosperities of the s IL-6R/IL-6 complex. Biochim Biophys Acta 2002; 1592(3): 251-263.
16. Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:19 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol 2005; 174: 3695-3702.

17. Andoh A, Zhang Zh, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. Gastroenterology 2005; 129(3): 969-984.
18. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. Nat Med 2008; 14(3): 275-281.
19. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection on hepatocytes during acute liver inflammation. Immunity 2007; 27(4): 647-659.
20. Dhiman R, Indramohan M, Barnes PF, Nayak RC, Paidipally P, Rao LV, et al. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion. J Immunol 2009; 183(10): 6639-6645.
21. Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with Protection against human Kala azar caused by Leishmania donovani. J Clin Invest 2009; 119(8): 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. 2nd ed. Portland: CRF Press LNC; 2001.
24. Verma A, Prasad KN, Singh AK, Nyati KK, Gupta RK, Paliwal VK. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosisof neurocysticercosis. Journal of Microbiological Methods 2010; 81(2): 175-178.
25. Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, Gurney AL, Lecron J-C, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol 2005; 174(6): 3695-3702.
26. McSorley S, Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Immunology of murine Leishmanhasis. Clin Dermatol 1996; 14: 451-464.
27. Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous Leishmaniasis. Exp Parasitol 1989; 68: 369-372.
28. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Humman and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. Infect Immun 1998; 66(7): 3279-3289.