Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

مجلـه دانشگـاه علـوم پــزشکـی اردبیـل

دوره دوازدهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۷ الی ۱۵

بیان ملکول‌های القاکننده آپوپتوزیس TRAIL , Fas-L در لایه ژرمینال کیست هیداتیک و بافت سالم

عادل اسپوتین*[۱]، منیره مختاری امیر مجدی[۲]، مجتبی سنکیان[۳]، عبدالرضا وارسته[۳]، علی اکبر شمسیان[۲]، فاطمه واحدی[۳]

[۱]گروه انگل شناسی پزشکی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران [۲]گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران [۳] آزمایشگاه ایمونوبیوشیمی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن/فاکس: ۰۲۱۲۲۴۳۹۹۶۲ آدرس پست الکترونیک: adelespotin@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: هیداتیدوزیس بیماری کرمی زئونوز می‌باشد که توسط مرحله لاروی کرم اکینوکوکوس گرانولوزوس در انسان و سایر میزبانان واسط ایجاد می‌گردد. کیست هیداتیک عمدتاً در کبد و ریه جایگزین شده و سبب تخریب بافت‌ها می‌شود. مسیرهای مهمی در نابارور شدن و سرکوب کیست بارور وجود دارد که تا حدی ناشناخته مانده است. در این مطالعه بیان ملکول‌های القاکننده آپوپتوزیس TRAIL, Fas-L در لایه ژرمینال کیست هیداتیک و بافت سالم اطراف کیست که یکی از مسیرهای ناشناخته ایمنی ذاتی میزبان بر علیه کیست هیداتیک انسانی است، بررسی می‌گردد.

روش کار: در این مطالعه از ٤ نمونه کیست جراحی شده از بیماران مبتلا به هیداتیدوزیس در بیمارستان قائم (عج) شهر مشهد که توسط روش‌های پرتونگاری و انگل شناسی تشخیص داده شده بودند، استفاده شد. ابتدا لایه ژرمینال کیست‌های بارور، غیر بارور و بافت سالم اطراف کیست توسط اسکالپل در شرایط استریل جدا شدند. بدین منظور پس از هموژنیزه کردن لایه ژرمینال و بافت سالم اطراف کیست، ابتدا mRNA به روش تریزول استخراج و توسط روش RT-PCR به cDNA تبدیل شد. در ادامه بیان ملکول‌های TRAIL , Fas-L در سطح mRNA به روش RT- PCR ارزیابی شدند.

یافته‌ها: بیان ملکول‌های القاکننده آپوپتوزیس Fas-L, TRAIL در سطح لایه ژرمینال کیست هیداتیک نابارور در مقایسه با کیست بارور و بافت سالم درسطح نسبتا بالایی قرار دارد.

نتیجه گیری: در افراد مبتلا به هیداتیدوزیس، احتمالا آپوپتوزیس میزبان بر علیه لایه ژرمینال کیست هیداتیک بارور بعنوان یکی از مسیرهای مهم در نابارور شدن کیست‌ها محسوب می‌شود.

کلمات کلیدی: کیست هیداتیک؛ آپوپتوزیس؛ TRAIL؛ Fas-L

دریافت: ۹۰/٤/۱۱ **پذیرش:** ۹۰/۱۱/۱۰

مقدمه

کیست هیداتیک مرحله لاروی کرم نواری اکینوکوکوس گرانولوزوس است و سبب بیماری هیداتیدوزیس در میزبان‌های واسط بالاخص حیوانات علف‌خوار و انسان و نیز بیماری گرانولوزیس در میزبان نهائی (سگ سانان) می‌شود. هیداتیدوزیس یک عفونت مشترک بین انسان و حیوان که در اوراسیا، آفریقا و استرالیا شایع است [۱].

*این مقاله از رساله دوره کارشناسی ارشد نویسنده اول مقاله، با شماره پایان نامه ۲٤۷- آ طی سال های۱۳۸۷-۱۳۸۵و با کمک معاونت مالی و پشتیبانی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام پذیرفت.

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Spotin A, Mokhtari Amirmajdi M, Sankian M, Varasteh A, Vahedi F, Shamsian AA. Expression of Apoptosis Inducing-Ligands, TRAIL and Fas-L in Hydatid Cyst Germinal Layer and Normal Tissue. J Ardabil Univ Med Sci. 2012; 12(1): 7-15. (Full Text in Persain)

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

ایران بویژه استان خراسان یکی از مناطق فرا بومی (هیپراندمیک) به این بیماری خطرناک است. کمترین موارد گزارش شده بیماری از کشور، متعلق به استان سیستان و بلوچستان است [۲].

این بیماری از یکسو خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی را به جامعه تحمیل نموده و از سوی دیگر سبب ضررهای مادی بر بیماران مبتلا و کاهش نیروی انسانی می‌گردد [۳،۱].

متاسفانه در طی سال‌های اخیر غیر از چند مطالعه، از بروز سالانه مبتلایان به کیست هیداتیک در دست نیست. بروز سالانه این بیماری در بخش جراحی قفسه سینه وگوارش استان همدان از هر ۱۰۰ هزار نفر ۱/۳۳ نفر و در شهر کاشان از هر۱۰۰ هزار نفر ۳ نفر گزارش شده است [٤،٥].

بر اساس مطالعات انجام شده در مراکز جراحی بیمارستان‌های ایران بطور میانگین از هر ۱۰۰ هزار نفر حدود ۱/۲-۰/۶ نفر مبتلا به هیداتیدوزیس هستند [۶].

کیست هیداتیک بارور به دلیل حضور پروتواسکولکس و آنتی‌ژن‌های ۵، B، سیکلوفیلین و فاکتور طویل‌کننده ۱-بتا/دلتا نقش مهمی در ایجاد واکنش‌های آنافیلاکتیک کیست هیداتیک در حین جراحی دارد. بنابراین مکانیسم‌هایی که بتواند بطور درون تنی سبب نابارور کردن کیست‌ها شود ضروری بنظر می‌رسد. کیست هیداتیک از نظر طبقات ساختمانی از خارج به داخل از لایه‌های فیبروز، لامینال، ژرمینال و کپسول زایا تشکیل شده است. لایه ژرمینال به علت تجمع آنتی‌ژن‌های مهم، نقش مهمی در تحریک پاسخ‌های ایمنی متقابل بین انگل و میزبان دارد [۷].

ایمنی ذاتی انسان بر علیه مایع کیست هیداتیک و لایه-های کیست هیداتیک بالاخص لایه ژرمینال بعنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی در سرکوب کیست هیداتیک و نابارور کردن کیست‌های بارور بشمار می‌رود [۸].

اجزای مهم سلولی ایمنی ذاتی شامل ارتشاح نوتروفیل، ماکروفاژ، ائوزینوفیل، فیبروبلاست و جزءِ پنجم مسیر آلترناتیو کمپلمان می‌باشند [۹].

از مسیرهای جدید ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتیک می‌توان به مسیرهای اینفلامزوم، تول لایک رسپتورها[1] و آپوپتوزیس اشاره کرد [۱۰،۱۱]. اخیرا آپوپتوزیس بعنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل‌ها به اثبات رسیده است [۱۲].

آپوپتوزیس مرگ برنامه‌ریزی شده‌ای است که توسط یکسری وقایع بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی از قبیل فشرده شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA، تولید اجسام آپوپتوتیکی و بیان ملکول‌های آپوپتوتیک داخل سلولی و خارج سلولی انجام می‌پذیرد. بطور کلی آپوپتوزیس در کرم‌های پهن در دوران دگردیسی نقش بسزایی دارد و قادر به کنترل تعداد سلول و حذف سلول‌های غیر ضروری است. اولین مطالعات آپوپتوزیس بر روی کرم سینورابدیتیس الگانس[2] انجام شده است [۱۳].

آپوپتوزیس عمدتاً از دو مسیر خارج سلولی متعلق به رسپتور مرگ و مسیر داخل سلولی میتوکندریایی انجام می‌گیرد [١٤].

گیرنده‌های مرگ، اعضای ابرخانواده گیرنده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)[3] می‌باشند. زمانی که این گیرنده‌ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القای آپوپتوزیس می‌گردند. از ملکول‌های مهم القاکننده آپوپتوزیس در مسیر خارج سلولی TNF مرتبط با لیگاند القاکننده آپوپتوزیس[4]، Fas لیگاند[5] هستند. مولکول Fas لیگاند در بین مسیرهای مختلف که باعث القاءِ آپوپتوزیس می‌گردد، یک مسیر مهم کنترل شده است [۱۵].

---

[1] Toll Like Receptors
[2] *Caenorhabditis elegans*
[3] Tumor Necrosis Factor
[4] TNF-Related Induce Apoptotic Ligand
[5] Fas-L

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

این مولکول بر روی انواع مختلفی از سلول‌های طبیعی انسان و رده نارس بروز می‌یابد و به رده خاصی اختصاص ندارد.

از مولکول Fas لیگاند با نام CD95 نیز یاد می‌شود. این مولکول دارای وزن مولکولی ٤٨ کیلودالتون بوده و از نوع I پروتئین‌های ترانس مامبران است. مولکول Fas لیگاند جزءِ ابر خانواده گیرنده TNF و فاکتور رشد عصبی[1] می‌باشد و به همراه سایر اعضاءِ این ابر خانواده گیرنده و رساننده پیام‌های مرگ به درون سلول است. فاکتور تومور نکروز مرتبط با لیگاند القاکننده آپوپتوزیس نظیر مولکول Fas لیگاند جزءِ رسپتورهای پذیرنده سطح سلول است که بوسیله عوامل خارجی تحریک شده سلول را دچار آپوپتوزیس می‌کنند. مشخصه پروتئین‌های این خانواده داشتن دومن‌های غنی از سیستئین در بخش خارج سلولی آنهاست. تعداد این دومن‌ها در پروتئین‌های مختلف این خانوده از ۱ تا ۶ متغیر است. تاکنون حدود ۲۰ پروتئین از این خانواده شناسائی شده‌اند که همگی بجز دو مورد در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارند [۱۵].

در این مطالعه بیان ملکول‌های القا کننده آپوپتوزیس TNF مرتبط با لیگاند القاکننده آپوپتوزیس و مولکول Fas لیگاند در لایه ژرمینال کیست هیداتیک و بافت سالم اطراف کیست که یکی از مسیرهای ناشناخته ایمنی ذاتی میزبان بر علیه انگل است، بررسی می‌گردد.

روش کار

این تحقیق از نوع توصیفی و تکنیک آن مشاهده‌ای است. در این مطالعه از ٤ کیست هیداتیک ریوی (بارور)، طحالی (بارور)، کبدی (غیر بارور) و لگنی (غیر بارور) استفاده شد.

بیماران مبتلا به کیست هیداتیک، ابتدا توسط روش‌های پرتونگاری و انگل‌شناسی در بیمارستان قائم (عج) شهر مشهد تشخیص داده شدند. برای تائید نهایی، کیست‌ها از لحاظ وجود پروتواسکولکس‌ها در مایع هیداتیک و همچنین لایه‌های مختلف کیست (لایه فیبروزی و ژرمینال) بررسی شدند. برای انجام این کار با استفاده از سر سوزن شماره ۱۹ در شرایط کاملا استریل مایع داخل کیست را آسپیره کرده و توسط رنگ حیاتی ائوزین[2] زنده یا مرده بودن پروتواسکولکس‌ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

پروتواسکولکس‌های زنده توانایی جذب رنگ را بر خلاف پروتواسکولکس‌های مرده نداشتند. در ادامه با استفاده از اسکالپل استریل لایه‌های ژرمینال و بافت سالم اطراف کیست بریده شده و در ظروف پلاستیکی کاملا استریل برای بررسی اثرات آپوپتوتیک در دمای منهای ۸۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد (شکل۱).

شکل۱. نحوه برداشت لایه های ژرمینال و بافت سالم از کیست هیداتیک.

جهت بررسی بیان ملکول‌های آپوپتوتیک در سطح لایه ژرمینال و بافت سالم ابتدا mRNA توسط روش تریزول[3] استخراج شد. بدین منظور جهت تسهیل استخراج، لایه ژرمینال و بافت سالم توسط دستگاه هموژنایزر کاملا یکنواخت (همگن) شدند. جهت

[1] Neuron Growth Factor

[2] Eozin

[3] Trizol Protocol

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

بررسی کیفیت RNA استخراج شده از لایه و بافت از ژن گلیسرآلدئید۳ فسفات دهیدروژناز[1] به عنوان کنترل داخلی[2] استفاده شد. انجام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسیکلر کوربت[3] (استرالیا، سیدنی) جهت تکثیر اختصاصی قطعه ۵۰۰ جفت باز از ژن گلیسرآلدئید۳ فسفات دهیدروژناز ارائه شد .

واکنش زنجیره ای پلیمراز برای حجم نهایی ژن گلیسرآلدئید۳ فسفات دهیدروژناز۱۰ میکرولیتر و برای ملکولهای TRAIL , Fas-L ۲۰میکرولیتر انجام گرفت. واکنش گلیسرآلدئید۳ فسفات دهیدروژناز شامل ۱ میکرولیتر از بافر 10x، ۱ میکرولیتر از نمونه cDNA، نیم پیکومول از هر کدام از پرایمرهای فرادست و فرودست، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۱۲۵ میلی‌مول dNTP، ۰/۱واحد از آنزیم Taq پلیمراز و ٤/۷ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. نحوه اجرای چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بود از: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه و نهایتا تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳دقیقه.

در مرحله بعدی mRNA توسط کیت فرمنتاز[4] (ساینس لایف-لیتوانی) به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-ترانس کریپتاز معکوس به cDNA سنتز شد. جهت بیان فاکتور تومور نکروز مرتبط با لیگاند القاکننده آپوپتوزیس و مولکول Fas لیگاند حجم نهایی مواد واکنش دهنده در دستگاه ترموسیکلر ۲۰ میکرولیتر انتخاب شد، بطوریکه واکنش زنجیره ای پلیمراز شامل ۱ میکرولیتر از بافر 10x، ۱ میکرولیتر از نمونه cDNA، ۱ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای فرادست و فرودست، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۱۲۵ میلی‌مول dNTP، ۰/۱واحد از آنزیم Taq پلیمراز و ۱۲/۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. نحوه اجرای چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ثانیه، اتصال در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه و نهایتا تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود.

طراحی پرایمرها توسط نرم افزارهای جین رانر و پرایمر پریمر انجام شدند (جدول۱) و قطعه ژنی قابل تکثیر توسط پرایمرهای اختصاصی مشخص شد.

جدول۱. توالی پرایمرها، شماره دسترسی و قطعات ژنی مورد انتظار

قطعه ژنی	شماره دسترسی		
۵۰۰ جفت باز	001001303	5'GGCCAAGATCATCCATGACAACT3'	GAPDH-F
	001001303	5'ACCAGGACATGAGCTTGACAAAGT3'	GAPDH-R
۲۷۶ جفت باز	000639	5'TCTTCCCTGTCCAACCTCTGTG3'	FasL-F
	000639	5'ATCTGGCTGGTAAGACTCTCGGA3'	FasL-R
۳۷۶ جفت باز	003810	5'TGCTGATCGTGATCTTCACAGTG3'	TRAIL-F
	003810	5'TTGGAGTTTGGAGAAGACAATGTG3'	TRAIL-R

در ادامه برای اطمینان از عدم چسبندگی پرایمر طراحی شده به سکانس‌های همولوگ، با استفاده از نرم افزار بلاست، عمل بلاستینگ انجام گرفت تا از طراحی درست پرایمرها اطمینان حاصل شود. بهینه

[1] Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
[2] Human House Keeping Primer
[3] Corbet Thermocycler
[4] Fermentas Kit

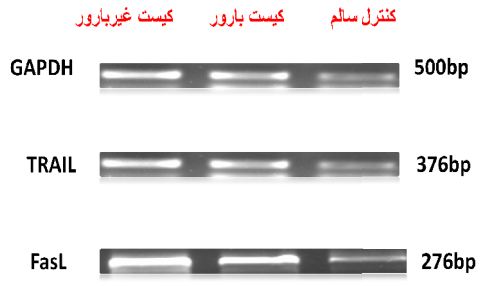
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

سازی PCR از لحاظ دمای اتصال[1] و تعدادچرخه جهت تکثیر اختصاصی قطعه ژن بصورت آزمایشی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گرادیانت انجام گرفت. محصولPCR روی ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورزشد و با دستگاه عکسبرداری ژل (سیناژن-انگلستان) از ژل تصویربرداری به عمل آمد. جهت آنالیز اطلاعات از آزمون آماری ویلکوکسون[2] و برای رسم نمودار از برنامه اکسل استفاده شد.

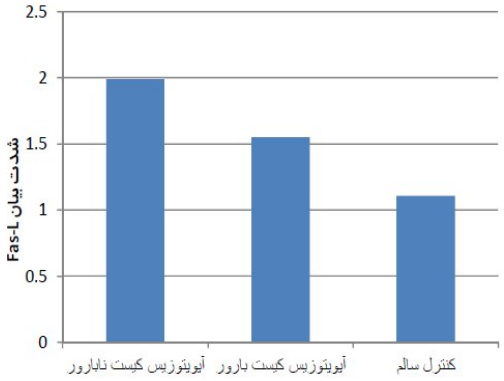
یافته ها

نتایج حاصل از این مطالعه پس از ۶ بار تکرارپذیری در جهت صحت و دقت نتایج آزمایش انجام پذیرفت. در این مطالعه ۳ ژن بهینه شد. دمای اتصال ژن GAPDH[3]در ۶۰ درجه سانتیگراد در قطعه ۵۰۰ جفت باز، ژن Fas-Lدر ۶۱ درجه سانتیگراد در قطعه ۲۷۶ جفت باز و ژن TRAIL در ۶۱ درجه سانتیگراد در قطعه ۳۷۶ جفت باز بهینه شدند.

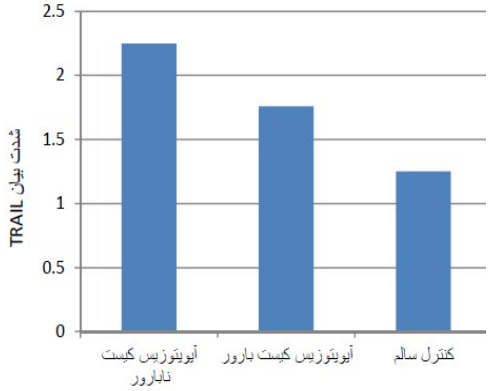
برای ارزیابی نتایج حاصل از بیان مولکول Fas لیگاند و فاکتور تومور نکروز مرتبط با لیگاند القاکننده آپوپتوزیس در لایه ژرمینال و با بافت نرمال و مقایسه شدت آپوپتوزیس از نرم افزار نیمه کمی ساز کوداک[4] استفاده شد. جهت نرمالیزه کردن باندها دانسیته باند حاصله برای هر ژن بر دانسیته باند ژن گلیسر آلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز تقسیم شد و با توجه به شکل ۲ و نمودارهای شماره ۱ و ۲ مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به نمودارهای ۱ و ۲ مـــشخص شد که شدت بیان ملکول‌های TRAIL, Fas -L درکیست‌های نابارور در مقایسه با کیست-های بارور و بافت سالم در سطح نسبتا بالایی قراردارد.



شکل۲. بیان شدت باند های ملکول های القا کننده آپوپتوتیک (Fas-L در قطعه ۲۷۶جفت باز, TRAIL در قطعه ۳۷۶جفت باز) در لایه های ژرمینال کیست غیربارور ، کیست بارور و کنترل سالم.



نمودار۱. مقایسه میانگین شدت باندهای حاصل از ملکول Fas-L در کیست های نابارور، بارور و کنترل سالم.



نمودار۲. مقایسه میانگین شدت باندهای حاصل از ملکول TRAILدر کیست های نابارور، بارور و کنترل سالم.

---

[1] Annealing Temperature
[2] Wilcoxon signed rank test
[3] Glyceraldehyde -3-Phosphat Dehydrogenase
[4] Kodak 1.D

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

بحث

کیست هیداتیک بیماری مشترک بین انسان و دام است که با جایگزین شدن در اعضای مختلف بدن باعث نابودی بافت می‌شود. احتمالا حضور اجزای ایمنی در لایه‌های مختلف کیست و مایع هیداتیک می‌تواند نقش مهمی در کاهش شکل‌گیری کیست هیداتیک در بدن میزبان داشته باشد [۱۷]. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که علیرغم اینکه ۲۰٪ از مبتلایان به هیداتیدوزیس، تست سرولوژی مثبت داشتند تنها ۳ درصدشان توانایی تشکیل کیست را دارند [۱۶].

پیشنهاد شده است که مکانیسم آپوپتوزیس احتمالا در کرم‌های پهن مثل اکینوکوکوس گرانولوزوس در از بین بردن سلول های غیرضروری یا بافت‌های غیر ضروری و در بازسازی بافت‌های فرسوده کرم اتفاق می‌افتد [۸].

با توجه به مطالعات گذشته و آشکار شدن مسیرهای ایمنی سلولی و ایمنی هومورال میزبان علیه کیست هیداتیک تا بحال به غیر از چند مطالعه، مطالعات جامعی از بررسی ایمنی ذاتی میزبان علیه کیست هیداتیک انجام نگرفته است [۸،۱۷،۱۸].

از مسیرهای مهم ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتیک می‌توان مسیرهای اینفلامزوم، آپوپتوزیس و نقش تول لایک رسپتورها را نام برد. آپوپتوزیس در روابط متقابل بین میزبان و کیست هیداتیک نقش دو گانه‌ای بازی می‌کند. اخیرا مطالعاتی از نتایج بررسی مسیرهای آپوپتوزیس علیه لایه‌های مختلف (لایه‌های فیبروز و ژرمینال) و مایع کیست هیداتیک ارائه شده که موید نابارور شدن کیست‌های بارور (پروتواسکولکس دار) هستند [۸،۱۹] از طرف دیگر مطالعه دیگری نشان می‌دهد که آپوپتوزیس لنفوسیت‌های انسانی توسط ایمونوژن‌های مایع هیداتیک می‌تواند به عنوان یک مکانیسم بقای کیست هیداتیک در مبتلایان در نظر گرفته شود [۱۸].

در روابط متقابل بین انگل و میزبان مطالعاتی در رابطه با اثرات آپوپتوتیک انسان بر علیه انگل صورت گرفته است که بر اساس ساختار کیست هیداتیک، اجزای آپوپتوزیس و سیستم ایمنی ذاتی (عمدتا ماکروفاژها) در لایه فیبروز جای می‌گیرند و با رها سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن و تحریک سایتوکاین‌ها به سمت Th1 سبب نابارور شدن کیست ها می‌شوند [۸،۱۷].

تا بحال سیستم تخریب DNA اکسیداتیو و مکانیسم‌های ترمیم DNA در مورد کیست هیداتیک ناشناخته است. اما با این وجود مطالعات انجام شده نشان داده است که در کیست‌های نابارور که دچار آپوپتوزیس می‌شود ملکول RAD9 یک ژن محافظت کننده فسفوریله است که در سطح پروتئین و mRNA بیان می‌شود. این ژن در ترمیم DNA قطعه قطعه شده و تنظیم سیکل سلولی نقش دارد [۱۷].

مطالعات انجام گرفته نشان داده است که در پروتواسکولکس درمان شده با دگزامتازون و پراکسید هیدروژن کمپلکس تخریب DNA اکسیداتیو در سطح بالایی قرار دارد که منجر به ناباروری کیست‌های هیداتیک می‌شود. کیست‌های بارور سبب تغییراتی در الگوی سایتوکاین‌ها با تحریک Th2 و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن می‌شوند [۱۹].

نتایج مطالعه حاضر در شکل ۲ و نمودارهای ۱و۲ نشان داد که شدت بیان ملکول‌های القاکننده آپوپتوزیس TRAIL , Fas-L در لایه ژرمینال کیست هیداتیک نابارور در مقایسه با کیست بارور و بافت کنترل سالم اطراف کیست در سطح نسبتا بالایی قرار دارد که احتمالا نقش مهمی در نابارور کردن کیست‌های بارور دارد بطوریکه با مطالعه مشابه مطابقت دارد [۸].

در این مطالعه مشابه با استفاده از شواهد مورفولوژی و بیوشیمیایی، وجود آپوپتوزیس در

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

کیست هیداتیک با قطعه قطعه شدن هسته، ایجاد اجسام آپوپتوتیک در لایه ژرمینال و اندازه‌گیری کاسپاز ۳ در لایه ژرمینال و پروتواسکولکس ثابت می‌شود بطوریکه میزان کاسپاز ۳ در لایه ژرمینال کیست‌های غیر بارور ۱۰ برابر کیست‌های بارور است [۸]. درمطالعه دیگری مشخص شده است که تخم کرم شیستوزوما هماتوبیوم با فعال کردن مارکرهای Fas, Fas-L و آپوپتوزیس سلول های $CD4^+$ از ایجاد گرانولوما در مثانه جلوگیری می کند[۲۰]. در روابط متقابل بین انگل ومیزبان همانطور که اشاره شد اثرات آپوپتوتیک انگل ها برروی سیستم ایمنی میزبان می تواند به پاتوژنیسیته و بقای انگل در بدن میزبان منجر شود. مطالعات نشان می دهد که سلول های دندریتیک آلوده شده با توکسوپلاسما گوندیی در محیط کشت سلولی سبب القا آپوپتوزیس سلول های T و بروز مارکرهای TRAIL, Fas-L شده در نتیجه باعث سرکوب پاسخ های ایمنی ازطریق Th1,2می شود [۲۱]. ثابت شده است که در پیشرفت زخم لیشمانیای ماژور مارکرهای آپوپتوتیک Fas, Fas-L با آپوپتوزیس لنفوسیت ها در محیط کشت عامل تشکیل زخم های پوستی هستند[۲۲].

از محدودیت‌های پژوهشی مطالعه حاضر، می‌توان به حجم کم نمونه‌های کیست هیداتیک انسانی اشاره کرد که بهتراست با حجم بالای نمونه‌های سالم و دست نخورده انجام پذیرد. برای بررسی میزان دقیق بیان ملکول‌های القاکننده آپوپتوتیک در لایه ژرمینال کیست هیداتیک پیشنهاد می‌شود بجای روش RT-PCR نیمه کمی از روش Real –Time PCR استفاده شود. در نهایت پیش بینی می‌شود با آشکار شدن نقشه کاملی از ایمنی ذاتی میزبان علیه کیست هیداتیک می‌توان اطلاعات کاربردی از ساخت واکسن، درمان های جدید و نیز فعال شدن مسیرهای آپوپتوتیکی توسط داروها یا آنتاگونیست‌ها بر علیه کیست هیداتیک بارور کسب نمود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گیری کرد که در افراد مبتلا به هیداتیدوزیس، احتمالا مسیر ایمنی آپوپتوزیس میزبان بر علیه لایه ژرمینال کیست هیداتیک بارور بعنوان یکی از مسیرهای مهم در سرکوب و غیر بارور کردن کیست هیداتیک محسوب می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از اساتید گروه انگل‌شناسی و ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به جهت همکاری در انجام این مطالعه و از کارکنان بیمارستان قائم (عج) و پژوهشکده بوعلی برای راهنمایی‌های ارزشمندشان نهایت تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

Refrences

1- Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. Parasitol Int. 2006 Aug; 55 Suppl: S197-202.
2- Rokni MB. The present status of human helminthic diseases in Iran. Ann Trop Med Parasitol.2008 May;102(4):283 - 95.
3- Conchedda M, Bortoletti G, Ecca AR, Gabriele F, Palmas C. Study on immunobiology in endoparasites of public health interest: echinococcosis-hydatidosis. Parassitologia 2001 Dec;43 Suppl 1:11-9.
4- Ahmadi NA, Hamidi M. A retrospective analysis of human cystic echinococcosis in Hamadan province, an endemic region of Iran. Ann Trop Med Parasitol. 2008 Oct; 102(7):603-609.
5- Arbabi M, Hooshyar H. Survey of echinococcosis and hydatidosis in Kashan region, central Iran. Iranian J Publ Health. 2006 Nov;35(1):75-81.
6- Rokni MB. Echinococcosis /hydatidosis in Iran. Iranian J Parasitol. 2009 May; 4(2):1-16.

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

7- Siracusano A, RiganoR, Ortona E,Profumo E, Margutti P, Buttari B, et al. Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. Exp Parasitol. 2008 Apr; 119(4): 483-9.
8- Paredes R, Jimenez V, Cabrera G, Iraguen D, Galanti N. Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. J Cell Biochem. 2007 Apr;100(5):1200-9.
9- Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N,Nakaya K, Ishikawa Y, et al. Recent advances in characterization of Echinococcus antigen B. Parasitol Int. 2006 May; 55 Suppl: S57-62.
10- Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. Immunology. 2006 Jun; 118(2):271-8.
11- Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. Minerva Med 2004 Apr; 95(2):159-64.
12- Verbrugge I, de VE, Tait SW, Wissink EH, Walczak H, Verheij M, et al. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. Oncogene. 2008 Jan 24;27(5):574-84.
13- Kerr LJ, Potten CS, Booth CE, Grencis RK. An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. Infect Immun. 2007 Apr; 75(4): 1556-64.
14- Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. IUBMB Life 2008 Jun; 60(6):390-7.
15- Kolomecki K, Maciaszczyk P, Stepien H, Stepien T, Kuzdak K, Ulanska J. P53 concentration and soluble FasL (sFasL) serum level as indicators of apoptosis in patients with benign and malignant thyroid tumors. Bratisl Lek Listy. 2005 Mar; 106(10): 297-300.
16- Kharebov A, Nahmias J, El-On J. Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients to *Echinococcus granulosus* purified antigens. Am J Trop Med Hyg 1997 Nov; 57(5):619-25.
17- Cabrera G, Cabrejos ME, Morassutti AL, Cabezon C, Orellana J, Hellman U, et al. DNA damage, RAD9 and fertility/infertility of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. J Cell Physiol. 2008 Aug; 216(2): 498-506.
18- Mokhtari AM, Sankian M, Eftekharzadeh I, Varasteh A, Vahedi F, Sadrizadeh, et al. Apoptosis of human lymphocytes after exposure to hydatid fluid. Iranian J Parasitol. 2011May; 6(2):9-16.
19- Hanhua Hu, Jinfeng Kang, Rong Chen, Wulamu Mamuti, Guizhen WU, Wumei Yuan .Drug-induced apoptosis of *Echinococcus granulosus* protoscoleces. Parasitol Res. 2011 March; 11(2): 2276-9.
20- Rutitzky LI, Mirkin GA, Stadecker MJ. Apoptosis by neglect of CD4+ Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. J Immunol. 2003 Aug; 171(4):1859-67.
21- Wei S, Marches F, Borvak J, Zou W, Channon J, White M, et al. Toxoplasma gondii-infected human myeloid dendritic cells induce T-lymphocyte dysfunction and contact-dependent apoptosis. Infect Immun. 2002 Apr;70(4):1750-60.
22- Eidsmo L, Nylen S, Khamesipour A, Hedblad MA, Chiodi F, Akuffo H. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during Leishmania major-induced cutaneous Leishmaniasis. Am J Pathol. 2005 Apr; 166(4):1099-108.

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:24 IRST on Wednesday October 16th 2019

Expression of Apoptosis Inducing-Ligands, TRAIL and Fas-L in Hydatid Cyst Germinal Layer and Normal Tissue

Spotin A*[1], Mokhtari Amirmajdi M[2], Sankian M [3], Varasteh A [3], Vahedi F[3] Shamsian AA [2]

[1] Department of Parasitology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran,Iran.
[2] Department of Mycoparasitology. School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.
[3] Immunobiochemistry Laboratory, Bu-Ali Research Institute, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

* Corresponding Author. Tel/Fax: 02122439962 E-mail: adelespotin@gmail.com

Received: 2 July 2011 Accepted: 30 January 2012

ABSTRACT

Background & objectives: Hydaticosis is a zoonotic helminthic disease of human and other intermediated hosts in which larval stages of the tapeworm *Echinococcus granulosu* transfect human. The liver and lung are the host tissues for the hydatid cyst. It is unknown which mechanisms are involved in infertility of the cyst and suppression of the fertile cyst. This study was aimed to evaluate the expression of the apoptosis inducing-ligands such as TRAIL and Fas-L in germinal layer of the cyst and human normal tissue surrounding the cyst that is one of the unknown host innate immunity mechanisms against the hydatid cyst.

Methods: In this study, four isolated hydatid cysts were used which had been diagnosed in patients by radiography and parasitological examination in Mashhad Ghaem hospital. Furthermore, the germinal layer of the cyst and accompanied normal peripheral tissues were separated by scalpel in sterile conditions. After homogenization, expression of TRAIL and Fas-L genes were studied by semi-quantitive RT-PCR method.

Results: The TRAIL and Fas-L showed significant higher level expression in germinal layer of infertile cyst than the fertile cyst and host normal tissues.

Conclusion: The host tissue-induced apoptosis of germinal layer of the fertile cysts is probably one of the infertility mechanism in patients with hydaticosis

Key words: Hydatid Cyst; Apoptosis; TRAIL; Fas-L