

بیان ملکول‌های القاکننده آپوپتوزیس Fas-L, TRAIL 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 انکل شناسی پزشکی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ^۲ گروه انکل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران ^۳ آزمایشگاه ایمنوبیوشیمی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
*نویسنده مسئول. تلفن/فاکس: ۰۲۱۲۲۴۳۹۹۶۲ آدرس پست الکترونیک: adelespotin@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: هیداتیدوزیس بیماری کرمی ژئونوز می‌باشد که توسط مرحله لاروی کرم اکینو کوکوس 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 Fas-L, TRAIL 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 ۸ نمونه کیست جراحی شده از بیماران مبتلا به هیداتیدوزیس در بیمارستان قائم (عج) شهر مشهد که توسط روش‌های پرتو نگاری و انکل 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 هم‌نویزه 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 Fas-L, TRAIL 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 در سطح نسبتاً بالایی قرار دارد.

نتیجه گیری: در افراد مبتلا به هیداتیدوزیس، احتمالاً 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؛ Fas-L؛ TRAIL

پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۰

دریافت: ۹۰/۴/۱۱

مقدمه

علف‌خوار و انسان و نیز بیماری گرانولوزوس در میزبان نهائی (سگ سانان) می‌شود. هیداتیدوزیس یک عفونت مشترک بین انسان و حیوان که در اوراسیا، آفریقا و استرالیا شایع است [۱].

کیست هیداتیک مرحله لاروی کرم نواری اکینو کوکوس گرانولوزوس است و سبب بیماری هیداتیدوزیس در میزبان‌های واسط بالاحص حیوانات

*این مقاله از رساله دوره کارشناسی ارشد نویسنده اول مقاله، با شماره پایان نامه ۲۴۷- آ طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۵ با کمک معاونت مالی و پشتیبانی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام پذیرفت.

لطفاً 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)

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].

متأسفانه 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 و گوارش استان همدان از هر ۱۰۰ هزار نفر ۱/۳۳ نفر و در شهر کاشان از هر ۱۰۰ هزار نفر ۳ نفر گزارش شده است [۴،۵].

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 تولیدکننده 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 لایه‌های 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 جزء پنجم مسیر آلترناتیو کمپلمان می‌باشند [۹].

از مسیرهای جدید ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتیک می‌توان به مسیرهای اینفلامزوم، تول لایک رسپتورها^۱ و آپوپتوزیس اشاره کرد [۱۰،۱۱]. اخیراً 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 فشردن 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^۲ انجام شده است [۱۳]. آپوپتوزیس عمدتاً از دو مسیر خارج سلولی متعلق به رسپتور مرگ و مسیر داخل سلولی میتوکندریایی انجام می‌گیرد [۱۴].

گیرنده‌های مرگ، اعضای ابرخانواده گیرنده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)^۳ 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^۴، Fas لیگاند^۵ هستند. مولکول Fas لیگاند در بین مسیرهای مختلف که باعث القاء 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

بیماران مبتلا به کیست هیداتیک، ابتدا توسط روش‌های پرتونگاری و انگل‌شناسی در بیمارستان قائم (عج) شهر مشهد تشخیص داده شدند. برای تأیید 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 کاملاً استریل مایع داخل کیست را آسپیره کرده و توسط رنگ حیاتی اتوزین^۲ 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 کاملاً استریل برای بررسی اثرات آپوتوتیک در دمای منهای ۸۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد (شکل ۱).



شکل ۱. نحوه برداشت لایه های ژرمینال و بافت سالم از کیست هیداتیک.

جهت بررسی بیان ملکول‌های آپوتوتیک در سطح لایه ژرمینال و بافت سالم ابتدا mRNA توسط روش تریزول^۳ استخراج شد. بدین منظور جهت تسهیل استخراج، لایه ژرمینال و بافت سالم توسط دستگاه هموژنایزر کاملاً یکنواخت (همگن) شدند. جهت

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 ۴۸ کیلودالتون بوده و از نوع I پروتئین‌های ترانس ممبران است. مولکول Fas لیگاند جزء ابر خانواده گیرنده TNF و فاکتور رشد عصبی^۱ می‌باشد و به همراه سایر اعضا این ابر خانواده گیرنده و رساننده پیام‌های مرگ به درون سلول است. فاکتور تومور نکروز مرتبط با لیگاند القاکننده آپوتوزیس نظیر مولکول Fas لیگاند جزء رسپتورهای پذیرنده سطح سلول است که بوسیله عوامل خارجی تحریک شده سلول را دچار آپوتوزیس می‌کنند. مشخصه پروتئین‌های این خانواده داشتن دومن‌های غنی از سیستئین در بخش خارج سلولی آنهاست. تعداد این دومن‌ها در پروتئین‌های مختلف این خانواده 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 القاکننده آپوتوزیس TNF مرتبط با لیگاند القاکننده آپوتوزیس 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 ۴ کیست هیداتیک ریوی (بارور)، طحالی (بارور)، کبدی (غیر بارور) و لگنی (غیر بارور) استفاده شد.

² Eozin

³ Trizol Protocol

¹ Neuron Growth Factor

(ساینس لایف-لیتوانی) به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز-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 پلیمرز 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، ۰/۱ واحد از آنزیم Taq پلیمرز و ۱۲/۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. نحوه اجرای چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود.

طراحی پرایمرها توسط نرم افزارهای جین رانر و پرایمر پریمر انجام شدند (جدول ۱) و قطعه ژنی قابل تکثیر توسط پرایمرهای اختصاصی مشخص شد.

بررسی کیفیت RNA استخراج شده از لایه و بافت از ژن گلیسرآلدئید^۳ فسفات دهیدروژناز^۱ به عنوان کنترل داخلی^۲ استفاده شد. انجام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسیکلر کوربت^۳ (استرالیا، سیدنی) جهت تکثیر اختصاصی قطعه ۵۰۰ جفت باز از ژن گلیسرآلدئید^۳ فسفات دهیدروژناز ارائه شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز برای حجم نهایی ژن گلیسرآلدئید^۳ فسفات دهیدروژناز ۱۰ میکرولیتر و برای ملکولهای Fas-L, TRAIL, ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. واکنش گلیسرآلدئید^۳ 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، ۰/۱ واحد از آنزیم Taq پلیمرز و ۴/۷ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. نحوه اجرای چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً

جدول ۱. توالی پرایمرها، شماره دسترسی و قطعات ژنی مورد انتظار

	شماره دسترسی	قطعه ژنی
GAPDH-F	5'GGCCAAGATCATCCATGACAACCT3'	001001303
GAPDH-R	5'ACCAGGACATGAGCTTGACAAAGT3'	001001303
FasL-F	5'TCTTCCCTGTCCAACCTCTGTG3'	000639
FasL-R	5'ATCTGGCTGGTAAGACTCTCGGA3'	000639
TRAIL-F	5'TGCTGATCGTGATCTTACAGTG3'	003810
TRAIL-R	5'TTGGAGTTTGAGAAGACAATGTG3'	003810

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

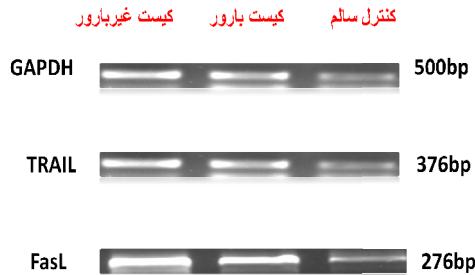
تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه. در مرحله بعدی mRNA توسط کیت فرمنتاز^۴

¹ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

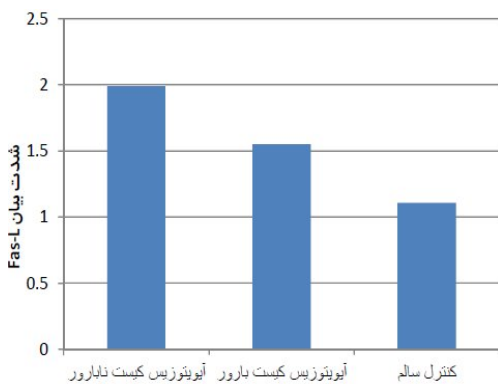
² Human House Keeping Primer

³ Corbet Thermocycler

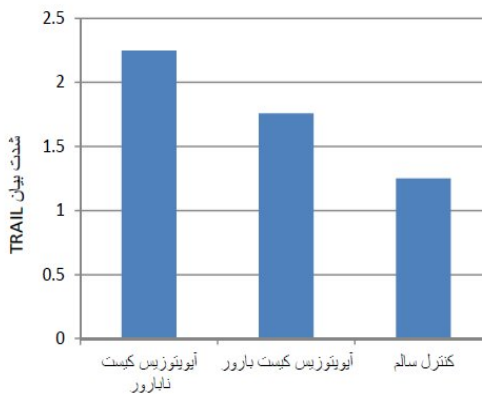
⁴ Fermentas Kit



شکل ۲. بیان شدت باند های ملکول های القا کننده آپوپتوتیک (Fas-L) در قطعه ۲۷۶ جفت باز، TRAIL در قطعه ۳۷۶ جفت باز) در لایه های ژرمینال کیست غیربارور ، کیست بارور و کنترل سالم.



نمودار ۱. مقایسه میانگین شدت باندهای حاصل از ملکول Fas-L در کیست های نابارور، بارور و کنترل سالم.



نمودار ۲. مقایسه میانگین شدت باندهای حاصل از ملکول TRAIL در کیست های نابارور، بارور و کنترل سالم.

سازی PCR از لحاظ دمای اتصال^۱ و تعداد چرخه جهت تکثیر اختصاصی قطعه ژن بصورت آزمایشی واکنش زنجیره ای پلیمرز گرادیانت انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با دستگاه عکسبرداری ژل (سیناژن-انگلستان) از ژل تصویربرداری به عمل آمد. جهت آنالیز اطلاعات از آزمون آماری ویلکوکسون^۲ 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^۳ در ۶۰ درجه سانتیگراد در قطعه ۵۰۰ جفت باز، ژن Fas-L در 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 آپوتوزیس در لایه ژرمینال و با بافت نرمال و مقایسه شدت آپوتوزیس از نرم افزار نیمه کمی ساز کوداک^۴ استفاده شد. جهت نرمالیزه کردن باندها دانسیته باند حاصله برای هر ژن بر دانسیته باند ژن گلیسر آلدهید 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 مشخص شد که شدت بیان ملکول های TRAIL، Fas-L در کیست های نابارور در مقایسه با کیست های بارور و بافت سالم در سطح نسبتا بالایی قرار دارد.

^۱ Annealing Temperature

^۲ Wilcoxon signed rank test

^۳ Glyceraldehyde -3-Phosphat Dehydrogenase

^۴ Kodak 1.D

بحث

کیست هیداتیک بیماری مشترک بین انسان و دام است که با جایگزین شدن در اعضای مختلف بدن باعث نابودی بافت می‌شود. احتمالاً 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 آپوتوزیس احتمالاً در کرم‌های پهن مثل اکینووکوس گرانولوزوس در از بین بردن سلول‌های 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، آپوتوزیس و نقش تول لایک رسپتورها را نام برد. آپوتوزیس در روابط متقابل بین میزبان و کیست هیداتیک نقش دو گانه‌ای بازی می‌کند. اخیراً مطالعاتی از نتایج بررسی مسیرهای آپوتوزیس علیه لایه‌های مختلف (لایه‌های فیروز 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 آپوتوزیس 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 آپوتوتیک انسان بر علیه انگل صورت گرفته است که بر اساس ساختار کیست هیداتیک، اجزای آپوتوزیس و سیستم ایمنی ذاتی (عمدتاً ماکروفاژها) در لایه فیروز جای می‌گیرند و با رها سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن و تحریک سایتوکاین‌ها به سمت Th1 سبب نابارور شدن کیست‌ها 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 آپوتوزیس 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 دگزمتازون 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 ۲۱ و ۲۲ نشان داد که شدت بیان ملکول‌های القاکننده آپوتوزیس Fas-L, TRAIL در لایه ژرمینال کیست هیداتیک نابارور در مقایسه با کیست بارور و بافت کنترل سالم اطراف کیست در سطح نسبتاً بالایی قرار دارد که احتمالاً 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 آپوتوزیس در

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، احتمالاً 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 ایمنی‌شناسی 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.

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]. در مطالعه دیگری مشخص شده است که تخم کرم شیستوزوما هماتویوم با فعال کردن مارکرهای Fas, Fas-L و آپوپتوزیس سلول های CD4⁺ از ایجاد گرانولوما در مئانه جلوگیری می‌کند [۲۰]. در روابط متقابل بین انگل و میزبان همانطور که اشاره شد اثرات آپوپتوتیک انگل ها بر روی سیستم ایمنی میزبان می‌تواند به پاتوژنیسیته و بقای انگل در بدن میزبان منجر شود. مطالعات نشان می‌دهد که سلول های دندریتیک آلوده شده با توکسوپلازما گوندیی در محیط کشت سلولی سبب القا آپوپتوزیس سلول های T و بروز مارکرهای Fas-L, TRAIL شده در نتیجه باعث سرکوب پاسخ های ایمنی از طریق Th1,2 می‌شود [۲۱]. ثابت شده است که در پیشرفت زخم لیشمانیای ماژور مارکرهای آپوپتوتیک Fas, Fas-L با آپوپتوزیس نفوسیت 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 بهتر است با حجم بالای نمونه‌های سالم و دست نخورده انجام پذیرد. برای بررسی میزان دقیق بیان ملکول‌های القاکننده آپوپتوتیک در لایه

References

- 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, Ecça 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.

- 7- Siracusano A, Rigano R, 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, Grecnis 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, Stepień H, Stepień 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*. 2011 May; 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.

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

Spotin A*¹, Mokhtari Amirmajdi M², Sankian M³, Varasteh A³, Vahedi F³
Shamsian AA²

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: Hydatidosis is a zoonotic helminthic disease of human and other intermediated hosts in which larval stages of the tapeworm *Echinococcus granulosu* infect 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-quantitative 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 hydatidosis

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