



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی انگل شناسی پزشکی

عنوان:

نقش پپتیدهای ضد میکروبی (بتا دیفنسین ها و کتلسیدین) در مقاومت میزبان به عفونت لیشمانیا ماژور و فعالیت ایمونومدولاتوری پروتئین ۲۱ کیلو دالتونی لیشمانیا اینفانتوم تضعیف شده با جنتامایسین در موش های BALB/c

توسط: آرش اسدی

استاد راهنما: دکتر حمید دانشور

استاد مشاور: دکتر ایرج شریفی

سال تحصیلی: ۱۳۹۶ - ۱۳۹۵



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for PhD Degree in Medical
Parasitology

Title:

**The Role of Antimicrobial Peptides (Beta Defensins & Cathelicidin) in Host
Resistance to *Leishmania major* Infection and Immunomodulatory Activity
of Protein 21 KDa of Gentamicin Attenuated *Leishmania Infantum* in
BALB/c Mice**

By: Arash Asadi

Supervisor: Dr. Hamid Daneshvar

Advisor: Dr. Iraj Sharifi

Year: 2017-2018





چکیده:

مقدمه: ایمنی ذاتی نقش مهمی در دفاع میزبان علیه انگل لیشمانیا بر عهده دارد. پپتیدهای ضد میکروبی پروتئین هائی از این سیستم هستند که نقش دفاعی آنها بر علیه بعضی از پاتوژن های مهاجم بررسی شده است. علی رغم وفور موارد لیشمانیای جلدی، مطالعات کمی در این زمینه یافت می شود. هدف اول مطالعه ما بررسی نقش محافظتی پپتیدهای ضد میکروبی در دفاع علیه لیشمانیا ماژور بود. علاوه بر آن، فعالیت ایمونومدولاتوری پروتئین ۲۱ کیلو دالتونی لیشمانیا اینفانتوم تضعیف شده با جنتامایسن در مدل های درون و برون تنی بررسی گردید.

مواد و روش ها: ماکروفاژها و موشهای حساس (BALB/c) و مقاوم (C57BL/6) به عفونت لیشمانیا ماژور با پروماستیگوت های مرحله ثبات انگل لیشمانیا ماژور مواجه شدند. یک، سه و هفت روز پس از آلودگی، نمونه های مورد نیاز برای سنجش میزان mRNA بتا دیفنسین های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۱۴، کتلسیدین، اینترلوکین های ۱۰ و ۱۲ و شدت آلودگی اخذ و با روش های qPCR و رنگ آمیزی گیمسا آزمایش شدند. همچنین میزان تاثیر گذاری پروتئین ۲۱ کیلو دالتونی تخلیص شده از سلوهای ترانسفکت شده بر روی سیستم ایمنی موشهای BALB/c بصورت برون و درون تنی تعیین گردید.

نتایج: ماکروفاژهای مشتق شده از موش های BALB/c یک کاهش معنی دار از شدت عفونت را در مواجهه با انگل لیشمانیا در مقایسه با ماکروفاژهای مشتق شده از C57BL/6 نشان دادند. اگر چه سطوح بیان تمام پپتیدهای ضد میکروبی در موش های BALB/c مواجهه شده با انگل در مقایسه با ماکروفاژهای مشتق شده از موش های C57BL/6 افزایش یافته بودند، با این وجود، سطوح معنی دار فقط برای کتلسیدین و بتا دیفنسین یک ثبت گردید. سطوح بیان تمام ژن های ذکر شده در موش های BALB/c به طور معنی داری در اکثر زمان های انتخاب شده نسبت به گونه دیگر افزایش داشت. پروتئین ۲۱ کیلو دالتونی به طور معنی داری سطوح بیان ژن های کتلسیدین و بتا دیفنسین ۱۴ را در ماکروفاژهای مشتق شده از موش های BALB/c القاء کرد. همچنین این پروتئین به طور معنی داری دار تولید IgG اختصاصی ضد لیشمانیا و بیان اینترفرون گاما را در موش های BALB/c افزایش داد.

نتیجه گیری: علی رغم بالاتر بودن سطح پپتیدهای ضد میکروبی در موش های BALB/c و ماکروفاژهای مشتق شده از موش های BALB/c آلوده شده با لیشمانیا ماژور، آنها شدت الوگی را بیشتر از موش های C57BL/6 و ماکروفاژهای مشتق شده از موش های C57BL/6 نشان دادند. از مطالب بالا نتیجه گیری می شود که پپتیدهای ضد

میکروبی برای دفاع علیه انگل ها به خوبی بیان می شوند ولی منجر به محافظت مطلق نمی شوند. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین ۲۱ کیلودالتونی لیشمانیا اینفانتوم تضعیف شده با جنتامایسین می تواند کاندیدای مناسبی برای ایمنی سازی در سگ ها در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی ، کتلسیدین، بتا دیفنسین موشی، ، لیشمانیا ماژور، پروتئین ۲۱ کیلو دالتونی لیشمانیا اینفانتوم تضعیف شده با جنتامایسین، اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲

Abstract

Introduction: Innate immunity has an important role against *leishmania* parasite. Antimicrobial peptides (AMPs) are proteins of this system that their defense roles have been investigated versus some invasive pathogens. Despite numerous cases of cutaneous leishmaniasis, few studies are found at this background. The first aim of our study was to investigate about AMPs protective role against *L. major*. Additionally, the immunomodulatory activity of protein 21 KDa of Gentamicin attenuated *L. infantum* was investigated in both *in vivo* and *in vitro* models.

Material and Methods: Macrophages, susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mouse strains were exposed with the stationary phase of *L. major* promastigotes. After 1, 3 and 7 days of post infection (PI), the samples needed for detecting of mRNA levels of mouse beta defensin (mBD)-1, mBD2, mBD3, mBD4, mBD6, cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP), interleukin (IL)-10, IL-12 and parasite load were taken and analyzed using qPCR and Giemsa methods. Also, the effectiveness rate of 21 KDa protein purified from transfected cells was determined on BALB/c mice immunity system both *in vivo* and *in vitro* models.

Result: C57BL/6 derived macrophages showed a significant reduction ($p < 0.05$) of infection severity compared to BALB/c derived macrophages. Although the expression level of all AMPs in BALB/c derived macrophages challenged by parasite had been increased compared to C57BL/6 derived macrophages, nevertheless, significant levels ($p < 0.05$) documented only for CRAMP and mBD1. The expression levels of all aforementioned genes in BALB/c mice increased significantly ($p < 0.05$) compared to other strain at mostly selected times. *L. infantum* P21 induced significantly ($p < 0.05$) the expression levels of CRAMP and mBD14 genes in BALB/c derived macrophages. It also promoted significantly ($p < 0.05$) the production of specific anti-leishmania IgG and IFN- γ gene expression BALB/c mice.

Conclusion: Despite of higher expression of AMPs in BALB/c mice and BALB/c derived macrophages infected by *L. major*, they showed infection severity more than C57BL/6 mice and C57BL/6 derived macrophages. It is concluded from the above statement that AMPs genes are well expressed to provide defense against the parasites but cannot create an absolute protection. The present study also showed that P21 KDa Gentamicin attenuated *L. infantum* can be considered as a good candidate in dog's immunization.

Key words: Antimicrobial peptides, Cathelicidin, Defensin, Mouse β -defensin, *leishmania major*, 21 KDa Gentamicin attenuated *leishmania infantum*, IL-10, IL-12,





دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

بسمه تعالی

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

تاریخ

شماره

پیوسته

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای آرش اسدی دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته انگل شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان " بررسی نقش پپتیدهای ضد میکروبی در مقاومت میزبان به عفونت لیشمانیا مازور " در ساعت ۱۰ صبح روز یکشنبه مورخ ۹۶/۱۱/۸ با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استاد راهنما	جناب آقای دکتر حمید دانشور	
ب: استاد مشاور	جناب آقای دکتر ایرج شریفین	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر ناصر ضیاعلی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر شهریار دبیری	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر مهدی گلچین	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	سرکار خانم دکتر بهارک اختر دانش	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	سرکار خانم دکتر زهرا بابایی	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۱۹/۱۰ مورد تأیید قرار گرفت.

