



**Kerman University of Medical Sciences
Leishmaniasis Research Center**

**In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy in Leishmaniasis**

Title:

**Risk factors for anthroponotic cutaneous leishmaniasis in unresponsive
and responsive patients in a major focus, southeast of Iran**

By: Mehdi Bamorovat

Supervisor:

Prof. Iraj Sharifi

Advisors:

Dr. Mohammad Reza Aflatoonian

Dr. Hamid Sharifi

Dr. Balal Sadeghi

Year: 2019



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مرکز تحقیقات لیشمانیوز

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی (Ph.D.) رشته لیشمانیوز

عنوان:

ارزیابی عوامل خطر مرتبط با فرم های عدم پاسخ به درمان و پاسخ به
درمان لیشمانیوز پوستی نوع شهری در کانون های اصلی جنوب شرقی
ایران

توسط:

مهدی بامروت

استاد راهنما:

دکتر ایرج شریفی

اساتید مشاور:

دکتر محمد رضا افلاطونیان

دکتر حمید شریفی

دکتر بلال صادقی

سال تحصیلی: ۹۸-۱۳۹۷

چکیده فارسی:

مقدمه و اهداف: لیشمانیوزیس جلدی یک مشکل جدی سلامت در سطح جهانی به دلیل *Leishmania tropica* است. این مطالعه با هدف ارزیابی عوامل خطر (فاکتورهای محیطی، تفاوت‌های نوکلئوتیدی و پاسخهای ایمنی میزبان) در بیماران عدم پاسخ به درمان و پاسخ به درمان لیشمانیوز پستی نوع شهری (ACL) در کانونهای اصلی جنوب شرقی ایران انجام شد. همچنین هدف دیگری از مطالعه حاضر تعیین اثربخشی و ایمونومادولاتوری لوامیزول در ترکیب با گلوکانتیم در بیماران end-stage مبتلا به ACL است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از آوریل ۲۰۱۵ تا اکتبر سال ۲۰۱۷ در جنوب شرقی ایران انجام شد. در ارزیابی عوامل خطر، بیماران برای عوامل محیطی، بالینی و فاکتورهای دموگرافیک مقایسه شدند و با استفاده از مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره و آزمون backward elimination stepwise تجزیه و تحلیل شدند. $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. بررسی تغییرات نوکلئوتید لیشمانیا تروپیکا در جنوب ایران انجام شد. ضایعات پوستی انتخاب شده بیماران (۲۰ بیمار عدم پاسخ به درمان و ۲۰ بیمار پاسخ به درمان) مورد بررسی قرار گرفت و ارگانیزم‌ها در یک محیط کشت، کشت داده شدند. پروماستیگوتها توسط سانتریفیوژ جمع آوری و برای بررسی‌های مولکولی بیشتر نگهداری شدند. DNA استخراج شده تقویت و توالی یابی شد. در مطالعه پاسخ ایمنی میزبان، نمونه‌های خون محیطی از بیماران گرفته شد و PBMCs جدا گردیدند. برای هر جدایه ای از بیماران عدم پاسخ و پاسخ به درمان، دو چاهک در نظر گرفته شد. یکی از آنها در معرض *Leishmania tropica* و دیگری غیر تحریک شده در نظر گرفته شد. RNA از PBMC های بیماران عدم پاسخ به درمان و پاسخ به درمان استخراج شد. Real time qPCR برای تایید تفاوت در بیان سطح IL-12 P40، IL-1 β ، IFN- γ ، IL-4 و IL-10 در میان بیماران عدم پاسخ به درمان و پاسخ به درمان PBMCs انجام شد. داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. در نهایت در درمان ترکیبی، ۲۰ بیمار عدم پاسخ به درمان مبتلا به ACL برای شرکت در این مطالعه single-group trial انتخاب شدند. همزمان، ترکیب لوامیزول همراه با گلوکانتیم مورد استفاده قرار گرفت. چندین آزمایش تکمیل شده درون آزمایشگاهی برای ارزیابی نحوه عملکرد لوامیزول و گلوکانتیم به تنهایی و ترکیب شده انجام شد.

یافته‌ها: از میان ۲۵ متغیر، ۴ عامل خطر از جمله شرایط نامساعد درونی ساختمان، تاریخچه بیماری مزمن، مدت ضایعه در بیماران مراجعه کننده ≥ 13 ماه و ۵-۱۲ ماه نسبت به ضایعات با طول مدت ≤ 4 ماه و سن ≥ 51 سال نسبت به کسانی که ≤ 7 سال بودند، به طور قابل توجهی با فرم‌های عدم پاسخ به درمان ارتباط داشتند. در بررسی مولکولی، نتایج ما نشان داد که تمام جدایه‌ها به مجموعه کمپلکس لیشمانیا تروپیکا تعلق داشتند و ترکیب ژنتیکی آنها در منطقه ITS1 در بیماران عدم پاسخ به درمان و بهبود یافته متفاوت بود. مناطق 7SL RNA و Hsp70 بین هر دو گروه ژنتیکی یکسان بودند. همچنین در مطالعه ما، سطح بیان IL-12 P40، IL-1 β و IFN γ در گروه تحریک شده و غیر تحریک عدم پاسخ به درمان ACL نسبت به گروه پاسخ به درمان تحریک شده و غیر تحریک شده کاهش معنی داری داشت. در حالی که سطح بیان IL-10 و IL-4 به صورت قابل انتظار افزایش معنی داری داشت. در نهایت در درمان ترکیبی، ۷۵٪ از بیماران عدم پاسخ به درمان کاملاً بهبود یافتند، ۱۰٪ بهبودی نسبی یافتند و ۱۵٪ که درای چندین بیماری مزمن همزمان بودند، هیچ واکنشی به رژیم درمان نشان ندادند.

بحث و نتیجه گیری: بهبود ساخت و ساز نمای درونی خانه، محافظت افراد با خطر بالا و کسانی که بیماری‌های زمینه‌ای دارند از نیش پشه خاکی، تشخیص زودهنگام و درمان موثر گروه‌های سنی بالاتر با سابقه بیماری مزمن، اقدامات بسیار مهمی برای جلوگیری از فرم‌های عدم پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به ACL در جنوب شرقی ایران می‌باشد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که تغییرات در الگوهای نوکلئوتیدی بین دو گروه عدم پاسخ به درمان و پاسخ به درمان در منطقه ITS1 ممکن است به تشویق پژوهش‌های بعدی بر روی این پلی مورفیسم‌ها کمک کند و می‌تواند درک ما را از نقش انگل در نتیجه پاسخ بیمار به درمان لیشمانیا را بهبود بخشد. نتایج بر روی پاسخ‌های ایمنی میزبان نشان داد که احتمالاً پاسخ ایمنی متفاوت به علت عوامل مختلف نقش مهمی در پاتوژنز بیماری و ایجاد فرم عدم پاسخ به درمان در بیماران ACL دارد. مشخصات و زمان بیان و تولید سایتوکاین با نتایج بالینی عفونت لیشمانیا ارتباط دارد. در نهایت یافته‌ها به وضوح نشان می‌دهند که ترکیب لوامیزول و گلوکانتیم می‌تواند در درمان بیماران end-stage لیشمانیوز پستی نوع شهری که به درمان اصلی پاسخ ندهد، در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: لیشمانیا تروپیکا، عامل خطر، لیشمانیوزیس جلدی نوع شهری، بیماران عدم پاسخ به درمان، تفاوت‌های نوکلوتیدی، پاسخ ایمنی، لوامیزول، گلوکانتیم

ABSTRACT

Background and Objective: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a serious health challenge at the global level due to *Leishmania tropica*. This study was conducted to evaluate the risk factors associated (environmental, nucleotide variations and the host's immune response factors) with anthroponotic CL (ACL) in unresponsive and responsive patients in a major focus in southeastern Iran. Also, the other objective of the present study was to determine the effect of immunomodulator-Levamisole in combination with Glucantime on end-stage patients with ACL.

Methods: This study was conducted from April 2015 to October 2017 in the southeast of Iran. In risk factor evaluation, patients were compared for environmental, clinical, and demographic characteristic factors and were analyzed using multivariate logistic regression and backward elimination stepwise models. $P < 0.05$ was defined to be statistically significant. Nucleotide variations survey was carried out in southeastern Iran. Randomly selected skin-scraping lesions of patients (20 non-healed and 20 healed) were examined and the organisms were grown in a culture medium. Promastigotes were collected by centrifugation and kept for further molecular examinations. The extracted DNA was amplified and sequenced. In the host's immune response study, blood samples were taken from patients and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated. Two wells were considered for each isolate of unresponsive and responsive patients; one was exposed to *L. tropica* (*Lt*-stimulated) and the other remained non-exposed (non-stimulated). Whole RNA was extracted from each sample. Quantitative real-time PCR was carried out to confirm the differences in expression levels of IL-12 P40, IFN- γ , IL-1 β , IL-4 and IL-10 among all isolates. Data were analyzed and $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Finally in combination therapy, twenty end-stage patients with ACL were selected for participation in this single-group trial study. Simultaneously, a combination of Levamisole along with Glucantime was used. Several *in vitro* complementary experiments were performed to evaluate the mode of action of Levamisole and Glucantime alone or in combination.

Results: Among the 25 variables, 4 major risk factors including poor interior housing conditions, history of chronic diseases, duration of lesion in the patients referred ≥ 13 months and 5-12 months than lesions with ≤ 4 months of age and age groups ≥ 51 years than those ≤ 7 years, were significantly associated with unresponsive forms. In molecular study, our results showed that all isolates belonged to the *Leishmania tropica* complex, with their genetic composition in the ITS1 region being different among non-healed and healed patients. 7SL RNA and Hsp70 regions were genetically identical between both groups. Also, in our study, *Lt*-stimulated and non-stimulated unresponsive groups demonstrated significantly lower expression levels of IL-1 β , IL-12 P40 and IFN- γ genes and higher expression levels of IL-4 and IL-10 genes, compared to *Lt*-stimulated and non-stimulated responsive groups. Finally in combination therapy, 75% of the patients showed complete clinical cure, 10% partially improved and the remaining (15%) had underlying chronic diseases demonstrated no response to the treatment regimen.

Conclusion: Improving interior house construction protecting high risk individuals and those with debilitating diseases from being bitten by sand flies, together with the early detection and effective treatment of older age groups with history of chronic diseases are highly important measures for preventing unresponsive forms in patients with ACL in southeastern Iran. Also this study showed that variability in nucleotide patterns observed between both groups in the ITS1 region may serve to encourage future research on the function of these polymorphisms and may improve our understanding of the role of parasite genome properties on patients' response to *Leishmania* treatment. Results on the host's immune response showed that probably, different immune responses caused by various factors play a major role in the pathogenesis and development of unresponsiveness in patients with ACL. The profile and timing of cytokine production correlate with the clinical outcome of *Leishmania* infection. Finally the findings clearly indicate that the combination of Levamisole and Glucantime should be considered in end-stage patients with ACL who have not responded to basic treatment.

Keywords: *Leishmania tropica*, risk factor, anthroponotic cutaneous leishmaniasis, unresponsive patients, Nucleotide variations, immune response, Levamisole, Glucantime.



دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

بسمه تعالی
صورتجلسه دفاع از پایان نامه

تاریخ: ۹۷/۱۰/۲۴
شماره:
پیوست:

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی خانم / آقای مهدی بامروت دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته دکتری پژوهشی بیماریهای پوست و لیشمانیوز دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان ارزیابی عوامل خطر مرتبط با فرم های عدم پاسخ به درمان و پاسخ به درمان لیشمانیوز پوستی نوع شهری در کانون های اصلی جنوب شرقی ایران در ساعت ۹/۳۰ صبح روز دوشنبه مورخ ۹۷/۱۰/۲۴ با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

امضا	نام و نام خانوادگی	سمت
	۱- دکتر ایرج شریفی ۲-	الف: استاد(ان) راهنما
	۱- دکتر محمدرضا افلاطونیان ۲- دکتر حمید شریفی ۳- دکتر بلال صادقی	ب: استاد(ان) مشاور
	دکتر زهرا بابایی	ج: عضو هیات داوران (داخلی)
	دکتر شهریار دبیری	ج: عضو هیات داوران (داخلی)
	دکتر محمد حسین رادفر	د: عضو هیات داوران (خارجی)
	دکتر رضا خیراندیش	د: عضو هیات داوران (خارجی)
	دکتر پویا قاسمی نژاد آلمانی	ه: نماینده تحصیلات تکمیلی

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه علامت و نمره مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی