مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۸، مرداد ۱۳۹۵، صفحه ۶۶-۶۱

# تاثیر شیستوزوما بویس (Schistosoma bovis) در بیان فاکتورهای آنژیوژنزیس بر سلول های ماکروفاژ رت

فریبرز شریعتی شریفی (PhD)[1*]، آنتونیو مورو آلوارز (PhD)[2]

۱-گروه پاتوبیولوژی، آزمایشگاه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل
۲-آزمایشگاه ایمونولوژی و انگل شناسی مولکولی، دانشکده داروسازی، دانشگاه سالامانکا اسپانیا

دریافت: ۹۴/۸/۲۲، اصلاح: ۹۴/۱۰/۱۶، پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

## خلاصه

**سابقه و هدف:** شیستوزومیازیس یک بیماری خطرناک در انسان و حیوانات می باشد که توسط انواع شیستوزوما در مناطق گرمسیری ایجاد می شود. هدف از این مطالعه بررسی نقش آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس در بیان فاکتورهای آنژیوژنزیس مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و فاکتور رشد فیبروبلاست درماکروفاژهای آلوئولار رت می باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق, از کشت سلولی ماکروفاژهای آلوئولار رت برای بررسی آثار آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس* در بیان ژن های کد کننده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و فاکتور رشد فیبروبلاست استفاده شده است. سلول های ماکروفاژ آلوئولار رت از طریق شستشوی برونکوآلوئولار بدست آمد که با غلظت های مختلف (۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم) آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس* تیمار شد. علاوه بر این ارتباط بین تولید اکسید نیتریک و بیان ژن های کد کننده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و فاکتور رشد فیبروبلاست در سلول های ماکروفاژهای آلوئولار رت بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث افزایش بیان ژن های کد کننده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (به ترتیب ۱۲ و ۱۷ برابر نسبت به کنترل منفی) و فاکتور رشد فیبروبلاست در سلول های ماکروفاژ رت (به ترتیب ۶ و ۱۲ برابر نسبت به کنترل منفی) شده است. علاوه بر آن، رابطه بین تولید اکسید نیتریک و میزان بیان ژن های فوق وجود داشت.

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که ارتباط بین افزایش بیان ژن کد کننده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و فاکتور رشد فیبروبلاست و شیستوزومیازیس وجود دارد که احتمالا می توان در آینده از آن برای پیشگیری و کنترل بیماری استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی: شیستوزوما بویس، فاکتورهای آنژیوژنزیس، ماکروفاژهای آلوئولار رت.**

## مقدمه

شیستوزومیازیس یکی از بیماری های فراموش شده نواحی گرمسیری است که بوسیله انگلی از جنس شیستوزوما بوجود می آید. ۲۰۷ میلیون نفر را در ۷۶ کشور جهان و عمدتا در کشورهای در حال توسعه در آسیا، آفریقا، آمریکای جنوبی و مرکزی و خاورمیانه مبتلا کرده است. علاوه بر این ۸۰۰ میلیون نفر نیز در معرض خطر ابتلا به این بیماری هستند و حداقل ۲۸۰۰۰۰ نفر هر سال می میرند (۱). انگل شیستوزوما عامل اساسی شیستوزومیازیس در انسان در آفریقا، خاورمیانه، آمریکای جنوبی و جزایر کارائیب می باشد. در میزبانهای پستاندار، کرم های ماده در عروق مزانتریک تخم گذاری می کنند. سپس تخم ها از مجرای روده عبور می‌کنند و از طریق مدفوع دفع می شوند. مطالعات قبلی که بیشتر در مورد شیستوزوما مانسونی انجام شده، نشان داده است که در شرایط آزمایشگاهی، تخم های این انگل به سلول های اندوتلیال می چسبند و مهاجرت سلولی را القاء می کنند(۲). بیش از ۵۰ درصد تخم های گذاشته شده شیستوزوما در عروق مزانتریک از طریق جریان باب حمل می شوند و در کبد ذخیره می شوند. در داخل بافتها، تخم های شیستوزوما انواع محصولات محلول را ترشح می کنند، که به عنوان آنتی ژنهای محلول در تخم (Soluble Egg Antigens=SEA) نامیده می شوند، اتصال تخم به سلول های اندو تلیال را افزایش می دهند (۳) و تشکیل گرانولوما با واسطه سلول T را القاء می کنند(۴). تولید گرانولوما به عنوان یک واکنش ایمونولوژیک، یک نقش محافظتی دارد. چرا که از اثرات سمی آنتی ژنهای محلول در تخم روی پارانشیم کبدی جلوگیری می نمایند; در موش های با سلولهای تحلیل رفته و موش های فاقد تیموس، هر دوی اینها حداقل پاسخ های گرانولوماتوز به تخم های شیستوزوما دارند و نکروز کبدی رخ می دهد (۵). با این حال، با تشکیل گرانولوما و فیبروز، متعاقب آن جریان باب کبدی مسدود می شود، افزایش فشار پورتال، واریس سیاهرگ ها، و خونریزی از علل عمده مرگ و میر در این بیماری است (۶). فرآیند تشکیل عروق خونی جدید نقش مهمی در رشد و نمو جنین ، بهبود زخم، رشد تومور و التهاب ایفا می کند. القاء کننده های آنژیوژنزیس متعدد هستند و از آن جمله می‌توان عامل فاکتور رشد اندوتلیال عروقی

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره SA۱۱۶A۰۸ کشور اسپانیا می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر فریبرز شرعتی شریفی
آدرس: زابل، دانشگاه زابل، دانشکده دامپزشکی، پردیس جدید دانشگاه زابل، گروه انگل شناسی دامپزشکی. تلفن: ۰۵۴-۳۱۲۳۲۲۵۰
E-mail:fariborzshariati@yahoo.co.uk

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.8.8.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.8.61 ]

(Vascular Endothelial Growth Factor=VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست (Fibroblast Growth Factor=FGF2) را نام برد. در شیستوزومیازیس، آنژیوژنزیس نقش مهمی ایفا می کند. مطالعات نشان داده است که آنتی ژن تخم شیستوزوما مانسونی با تحریک VEGF در سلولهای اندوتلیال انسانی فرایندهای مرتبط با آنزیوژنزیس را القاء می کند (۷). ارتباط انگل-میزبان در حیوانات آلوده باعث فعال شدن سیستم ایمنی میزبان به طروقمختلف شده که می‌توان به آزاد شدن برخی از میانجی‌های سلولی مثل اکسید نیتریک ( Nitric Oxide=NO) اشاره کرد.

هدف از این تحقیق ارزیابی بیان ژن های کدکننده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و فاکتور رشد فیبروبلاست در سلول های ماکروفاژ آلوئولار رت تحریک شده با آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس* و تعیین ارتباط تولید اکسید نیتریک با بیان این فاکتورها در سلول های ماکروفاژ رت می باشد.

## مواد و روش‌ها

**تهیه آنتی ژن:** انگل شیستوزوما بوویس از آزمایشگاه بخش انگل شناسی دانشگاه سالامانکا در اسپانیا تهیه شد. برای تهیه آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس، ابتدا کرم‌های تازه (هدیه داده شده توسط پروفسور آنتونیو مورو استاد انگل شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه سالامانکا) پس از شستشو در هاون چینی خرد شده و سپس با محلول های PBS ۱٪ و متیل سولفونیل فلوراید یک مول (PMSF) تعداد ۲۰ کرم در میلی لیتر به صورت هموژنیزه در آورده شد. سپس سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۱ دقیقه در سه مرحله در شرایط سرد سونیکه شد. سوسپانسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. مایع رویی (حاوی آنتی ژن) پس از اندازه گیری میزان آنتی ژن توسط کیت MicroBCA (Rockford،Pierce ، Illinois) تا زمان استفاده در برودت 20 °c -نگهداری شد.

**جدا سازی سلول های ماکروفاژ آلوئولار:** جمع آوری سلول های ماکروفاژ از رت نژاد Wistar با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم و با استفاده از روش Andrade و همکاران انجام شد (۸). ابتدا کاتتر (VYCON Code 123.06) در نای رت بیهوش شده با اتر به آرامی وارد شد. سپس ۳ میلی لیتر از محلول PBS ۱٪ به وسیله سرنگ ۵ سی سی (۳ تا ۵ مرتبه) از طریق کاتتر به داخل نای به آرامی وارد شده و بلافاصله مایع تزریق شده (که حاوی ماکروفاژ می باشد) بیرون کشیده شد. محلول حاوی ماکروفاژها پس از گذراندن از گاز استریل با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. ماکروفاژهای رسوب داده شده پس از دو بار شستشو با PBS ۱٪ تا زمان استفاده در برودت ۸۰- نگهداری شد.

**کشت سلول های ماکروفاژ آلوئولار:** ابتدا (جهت چسباندن ماکروفاژها در ته چاهک) مقدار $۱۰^۶$ سلول ماکروفاژ در چاهک های پلیت (Costar، MA،Cambridge ) حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت مورد استفاده شامل محیط کشت DMEM ( Dulbecco's Modified Eagle's Medium) غنی شده با سرم جنینی گاو FCS (Fetal Calf Serum) ۱۰ درصد، ال - گلوتامین ۲ میلی مول و پنی سیلین 100 U/ml، استرپتوماسین 100 µg/ml در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با ۵٪ $CO_2$ به مدت ۲ ساعت گرما گذاری شد. سپس محیط کشت هر چاهک توسط پیپت پاستور استریل تخلیه و یکبار با ۱ میلی لیتر محیط کشت شستشو داده شد. به منظور بررسی تاثیر آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس بر بیان ژن های کد کننده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و فاکتور رشد فیبروبلاست، ماکروفاژها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت با $CO_2$ ۵ درصد به صورت گروه های زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

-**کنترل منفی:** ماکروفاژهای تیمار نشده که تنها در مجاورت محیط کشت قرار داده شدند.

-**کنترل مثبت:** ماکروفاژهایی که با محیط حاوی لیپوپلی ساکارید یا LPS (*Escherichia coli* serotype B4:0111) محصول شرکت سیگما)، با غلظت ۱۰میکروگرم در میلی لیتر تیمار شدند.

-ماکروفاژهایی که با غلظت های متفاوت از آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس* (۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم آنتی ژن در میلی لیتر) تیمار شدند.

-ماکروفاژهایی که با مهار کننده‌های اختصاصی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) و ایزوفرم القایی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) محصول شرکت سیگما با غلظت ۱۰میکروگرم در میلی لیتر بطور جداگانه تیمار شدند.

بعد از سپری شدن زمان گرماگذاری، مایع رویی در چاهک ها توسط پیپت پاستور به لوله های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی به لوله های ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل و تا زمان استفاده در ۸۰- نگهداری شد. برای بررسی درصد زنده بودن سلول ها موجود در ته چاهک‌های پلیت از روش ام.تی.تی (4)-[3-MTT، 5 (dimethylthiazol- 2-yl)-2، 5 diphenyl tetrazolium bomide] Assay) استفاده شد (۸). بدین صورت که مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول ام تی تی به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفاید به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از آن میزان ۲۵۰ میکرو لیتر به پلیت ۹۶ خانه منتقل و میزان جذب نور در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ($Hiperion\ MPR4^+$) اندازه_گیری شد. از دی متیل سولفواکساید (DMSO) بعنوان شاهد استفاده شد. درصد زنده بودن سلول ها از فرمول ۱۰۰× (OD کنترل/ OD تیمار) محاسبه شد. سپس سلول های ماکروفاژ از چاهک ها جمع آوری و به لوله های ۲ میلی لیتری منتقل و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- نگهداری شد.

**تعیین میزان بیان ژنهای *GAPDH*،*VEGF* و *FGF2* در سلولهای ماکروفاژ از روش RT-PCR:** برای استخراج RNA کل از سلولهای ماکروفاژ از کیت RNeasy Mini Kit شرکت کیاژن و بر اساس دستورالعمل استفاده گردید. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از روش نانودراپ سنجش شد. سپس برای سنتز cDNA از کیت(First cDNA synthesis kit Strand) خریداری شده از شرکت Roche براساس دستورالعمل استفاده گردید. جهت انجام RT-PCR، ۲ میکروگرم از cDNA تولید شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای VEGF و GAPDH (جدول ۱) PCR انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت است از یک سیکل ۹۴ سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه cDNA، ۳۵ سیکل تکراری شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.8.8.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.8.61 ]

گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود. برای انجام RT-PCR، ژن*FGF2* ۲ میکروگرم از cDNA تولید شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن های *FGF2* (جدول ۱) PCR انجام شد.

**جدول ۱. توالی پرایمرهای اختصاصی ژن های *VEGF*، *FGF2* و *GAPDH***

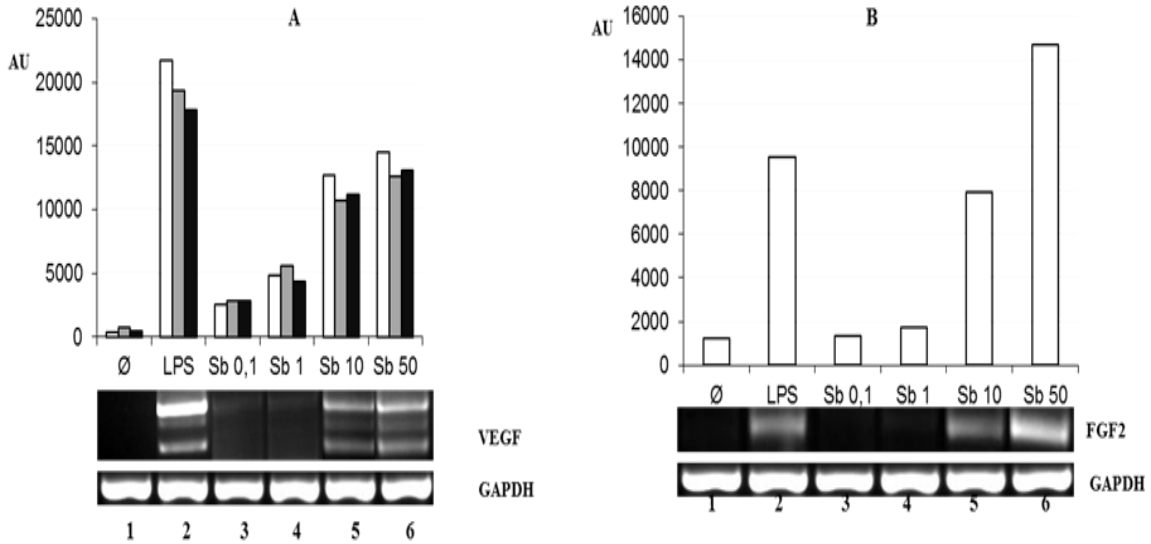
| نام پرایمر | توالی |
|---|---|
| F-VEGF | 5'-CTGCTCTCTTGGGTGCACTGG-3' |
| R-VEGF | 5'-CACCGCCTTGGCTTGTCACAT-3' |
| F-GAPDH | 5'-GGTCGGTGTGAACGGATTTG-3' |
| R-GAPDH | 5'-GTGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3' |
| F-FGF2 | 5'-GCCGGCAGCATCACTTCGCT-3' |
| R-FGF2 | 5'-CTGTCCAGGCCCCGTTTTGG-3' |

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت است از یک سیکل۹۴ سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه جهت واسرشت اولیه cDNA، ۵۰ سیکل تکراری شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه،۶۰درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش، ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش، در ژل آگارز ۲٪ به مدت ۴۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۷۵، الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده، با استفاده از نشانگر ۱۰۰ ارزیابی شد (شکل A۱). قطعات تکثیر شده توسط تعیین توالی تایید گردید.

**مهار کننده های تولید اکسید نیتریک:** سلول های ماکروفاژ تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس را با ۱۰ میکروگرم ماده L-NAME (Nw-nitro-L-arginine methyl ester) بعنوان یک مهار کننده اختصاصی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و ماده L-canavanine (Sigma) بعنوان مهار کننده اختصاصی ایزوفرم القایی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) بطور جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری شد. بعد از سپری شدن زمان گرماگذاری، مایع رویی در چاهک ها توسط پیپت پاستور خارج شد. سپس سلول های ماکروفاژ از چاهکها جمع آوری و به لوله های ۲ میلی لیتری منتقل شد. استخراج RNA و سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل فوق سنتز شد. تاثیر مهار کننده های فوق روی میزان بیان ژن های VEGF و FGF2 با استفاده از روش RT-PCR و برنامه دمایی فوق انجام شد.

## یافته ها

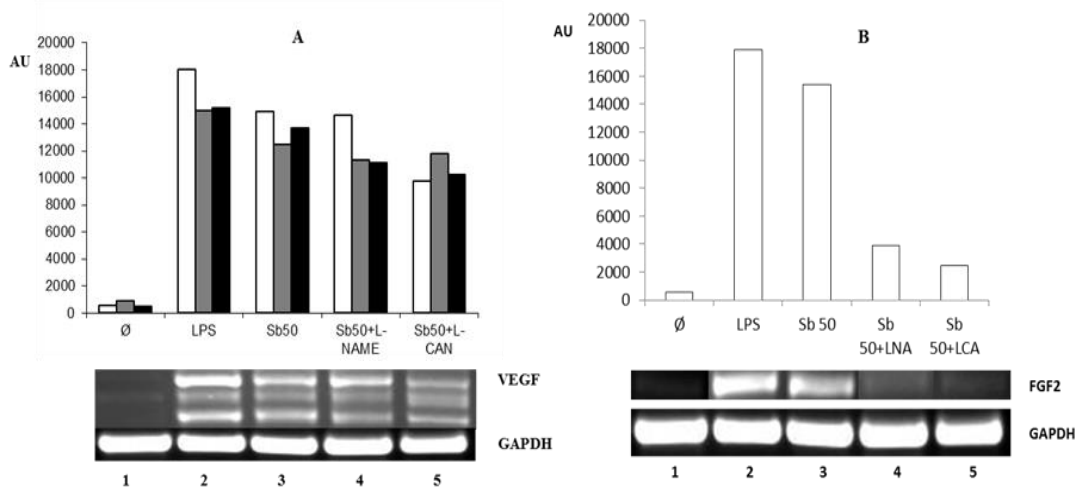
تاثیر آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس روی بیان ژنهای VEGF و FGF2 وابسته به غلظت آنتی ژن است. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن VEGF در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب ۱۲ و ۱۷ برابر نسبت به کنترل منفی(سلولهای ماکروفاژ بدون تیمار با آنتی ژن) افزایش داشته است (شکل A۱). علاوه بر آن میزان بیان ژن FGF2 در غلظتهای ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب ۶ و ۱۲ برابر نسبت به کنترل منفی زیاد شده است شکل B۱. تاثیر مهار کننده های اکسید نیتریک (L-NAME و L-canavanine) روی بیان ژن‌های VEGF و FGF2 متفاوت بوده است, بصورتیکه L-NAME میزان بیان ژن های FGF2 را ۴ برابر و L-canavanine بیان این ژن را تا ۱۰ برابر نسبت به کنترل مثبت (سلول‌های ماکروفاژ تیمار شده با LPS) کاهش داده است اما تاثیر محسوسی در کاهش بیان ژن VEGF نداشته است. (شکل۲)




**شکل ۱. بیان ژن *VEGF* و *FGF2* در سلول های ماکروفاژ آلوئولار رت توسط آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس***

A,B: ۱- کنترل منفی، ۲- کنترل مثبت(سلول های تحریک شده با لیپو ساکارید)، ۳-۶- سلول های ماکروفاژ تحریک شده با رقتهای متفاوت آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس* (به ترتیب: ۰/۱، ۱، ۱۰و ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر). AU: واحد سنجش توسط دانسیتومتری قطعه تکثیر شده از طریق PCR. باند ۶۰۱ باز آلی *VEGF* (میله های سفید)، باند ۵۴۰ باز آلی *VEGF* (میله های خاکستری)، باند ۴۰۸ باز آلی *VEGF* (میله های مشکی).GAPDH کنترل داخلی و باند ۴۲۳ باز آلی *FGF2* (میله های سفید).

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.8.8.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.8.61 ]




**شکل ۲ .A,B. آثار مهار کننده های اکسید نیتریک در بیان ژن VEGF و FGF2 در سلول های ماکروفاژ تحریک شده توسط آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس.**

درجات بیان GAPDH در ماکروفاژهای آلوئولار رت بعنوان کنترل داخلی استفاده شده است. ۱- کنترل منفی، ۲- کنترل مثبت (سلول های ماکروفاژ تحریک شده با لیپو ساکارید باکتریایی)،۳- سلول های ماکروفاژ تحریک شده با رقت ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس*. ۴- سلول های ماکروفاژ تحریک شده با رقت ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس* با L-NAME .۵- سلولهای ماکروفاژ تحریک شده با رقت ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر آنتی ژن کرم بالغ *شیستوزوما بوویس* با L-canavanine

## بحث و نتیجه گیری

نتایج یافته های این تحقیق، نشان داد که آنتی ژن کرم بالغ شیستوزوما بوویس در محیط آزمایشگاهی بر روی سلول های ماکروفاژ آلوئولار رت باعث افزایش بیان ژن VEGF در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر شده است. این نتایج با نتایج Shariati و همکاران که بروی گونه های انگل تریشینلا و استرونژیلوئیدس انجام گرفت همخوانی دارد(۱۰و۹). آنها بیان داشتند که آنتی ژن لارو مرحله اول تریشینلا اسپیرالیس و استرونژیلوئیدس ونزولنسیس باعث افزایش بیان ژن های VEGF و FGF2 شده است. Loeffler و همکاران نشان دادند که آنتی ژن محلول تخم شیستوزوما مانسونی موجب افزایش میزان فاکتور رشد و پرولیفراسیون و تشکیل لوله در سلول های اندوتلیال سیاهرگ های نافی انسان شده است (۷). همچنین Van de Vijver وهمکاران بیان داشتند که آنتی ژن محلول تخم شیستوزوما مانسونی از طریق افزایش بیان ژن کد کننده فاکتور رشد باعث تشکیل عروق خونی جدید در واکنش های گرانولوماتوزی و التهابی می شود (۱۱).

علاوه بر آن Martin و همکاران طی مطالعه ای نشان دادند که بیان بیش از حد *VEGF* اثرات آنژیوژنیک قدرتمندی را در بافت های مختلف ایجاد می کند و همچنین سبب افزایش نفوذ پذیری و گشاد شدن عروق می گردد(۱۲). نتایج این مطالعه نشان داد که بروز علایم درمانگاهی شیستوزومیازیس مثل تشکیل عروق خونی جدید در گرانولومای ناشی از تخم شیستوزوما، گشادشدگی عروق و ایجاد التهاب ممکن،است ناشی از افزایش بیان ژن VEGF باشد. از آنجاییکه علاوه بر VEGF مهمترین عامل پروآنژیوژنیک می تواند فاکتور رشد فیبروبلاستی FGF2 نیز باشد، در بر اساس نتایج مطالعه میزان بیان ژن FGF2 افزایش یافته است که با مطالعات انجام شده توسط Shariati و همکاران در سال های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ همخوانی دارد(۱۰و۹).از آنجاییکه VEGF در مهاجرت، تکثیر، تجزیه ماتر یکس سلولهای اندوتلیال، تشکیل شبکه های عروقی و همچنین تولید اکسید نیتریک و آزاد سازی آن در سلولهای اندوتلیال نقش دارد. در این مطالعه سعی شد با استفاده از مهار کننده های اکسید نیتریک ارتباط آنرا با تغییرات بیانی ژن‌های مورد مطالعه سنجیده شود. بر اساس نتایج این مطالعه، مهار کننده های اکسید نیتریک در سلول های ماکروفاژ تحریک شده با آنتی ژن شیستوزوما بوویس باعث کاهش چشمگیری در بیان ژن FGF2 شده است در صورتیکه در بیان ژن VEGF تاثیر قابل ملاحظه ای نداشته است که می توان پیشنهاد کرد که مسیرهای تاثیر آنتی ژن شیستوزوما بوویس در افزایش بیان ژن های VEGF و FGF2 متفاوت می باشد که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کارکنان آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی زابل و دانشکده داروسازی دانشگاه سالامانکا کشور اسپانیا که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تقدیر و تشکر می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.8.8.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.8.61 ]

# Effects of Schistosoma Bovis on Angiogenesis Factor Expression in Macrophage Cells of Rats

**F. Shariati Sharifi (PhD)*[1], A. Muro (PhD)[2]**

1.Departament of Pathobiology, Laboratory of Parasitology, Faculty of Veterinary, Zabol University, Zabol, I.R.Iran
2.Laboratory of Immunology and Molecular Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain

**J Babol Univ Med Sci; 18(5); May 2016; PP: 61-6**
**Received: Nov 13th 2015, Revised: Jan 6th 2016, Accepted: Mar 2th 2016.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** *Schistosomiasis* is a severe disease in humans and animals caused by various *Schistosoma* in tropical areas. This study aimed to evaluate the effect of *Schistosoma bovis* adult worm antigens on the expression of angiogenesis factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF2), in rat alveolar macrophages.

**METHODS:** In this study, rat alveolar macrophage cell cultures were used to determine the effect of *Schistosoma bovis* adult worm antigens on the expression of genes encoding VEGF and FGF2. Rat alveolar macrophage cells were obtained through bronchoalveolar lavage and treated with different concentrations of *Schistosoma bovis* adult worm antigen (0.1, 1, 10 and 50 µg). Moreover, we determined the association between nitric oxide (NO) production and expression of the genes encoding VEGF and FGF2 in rat alveolar macrophage cells.

**FINDINGS:** *Schistosoma bovis* adult worm antigen at concentrations of 10 and 50 micrograms per milliliter increased the expression of the genes encoding VEGF (12 and 17 times greater than the negative control, respectively) and FGF2 in rat macrophage cells (6 and 12 times greater than the negative control, respectively). In addition, an association was observed between NO production and expression level of the aforementioned genes.

**CONCLUSION:** According to the results of this study, increased expression of the encoding genes of VEGF and FGF was correlated with *Schistosomiasis*, which could contribute to future studies regarding the control and prevention of this disease.

**KEY WORDS:** *Schistosoma bovis, Angiogenesis factors, Rat alveolar macrophages.*

**Please cite this article as follows:**
Shariati Sharifi F, Muro A. Effects of Schistosoma Bovis on Angiogenesis Factor Expression in Macrophage Cells of Rats. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(5):61-6.

***Corresponding author: F. Shariati Sharifi (PhD)**
**Address:** Department of Veterinary Parasitology, New Campus of Zabol University, Bonjar, Faculty of Veterinary Medicine, Zabol University, Zabol, Sistan and Baluchestan Province, I.R.Iran
**Tel:** +98 54 31232250
**E-mail:** fariborzshariati@yahoo.co.uk

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.8.8.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.8.61 ]

## References

1.Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J.. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect 2006; 6(7):411–25.

2.Mebius MM, Genderen PJ.van, Urbanus RT, Tielens Al, de Groot PG, Hellemond J. Interference with the host haemostatic system by schistosomes. PLoS Pathog. 2013;9(12): 1-8.

3.Ngaiza JR, Doenhoff MJ, Jaffe EA. Schistosoma mansoni egg attachment to cultured human umbilical vein endothelial cells: an in vitro model of an early step of parasite egg excretion. J Infect Dis.1993;168:1576–80.

4.Boros DL, Warren KS. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from Schistosoma mansoni eggs. J Exp Med. 1970;132:488–507.

5.Mathew RC, Boros DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in Schistosoma mansoni infection. Infect Immun. 1986; 54(3): 820–6.

6.Doenhoff M, Musallam R, Bain J, McGregor A. Schistosoma mansoni infections in T-cell deprived mice, and the ameliorating effect of administering homologous chronic infection serum. I. Pathogenesis. Am J Trop Med Hyg. 1979; 28(2):260–73.

7.Loeffler DA,Lundy SK,Singh KP,Gerard HC,Hudson AP,Boros DL. Soluble egg antigens from Schistosoma mansoni induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Infect Dis. 2002;185(11):1650–6.

8.Andrade MA, Siles-Lucas M, Espinoza E, Pérez Arellano JL, Gottstein B, Muro A. Echinococcus multilocularis laminated layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. Nitric Oxide-Biol.2004; 10(3):150–5.

9.Shariati F, Pérez-Arellano JL, López-Abán J, Arefi M, Martínez-Fernández AR, Muro A. Trichinella: differential expression of angiogenic factors in macrophages stimulated with antigens from encapsulated and nonencapsulated species. Exp Parasitol. 2010;32(6):430-9.

10.Shariati F, Pérez-Arellano JL, López-Abán J, El Behairy AM, Muro A. Role of angiogenic factors in acute experimental Strongyloides venezuelensis infection. Parasite Immunol.2010 32(6), 430–9.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.8.8.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.8.61 ]