

# Kutanöz Leishmaniasisli Olgularda Serum Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör (MİF) Değerlerinin Araştırılması

Didem L. KOZACI<sup>1</sup>, Sema ERTUĞ<sup>2</sup>, Tülay KAVAK<sup>1</sup>, Pınar OKYAY<sup>3</sup>,  
Ian C. CHIKANZA<sup>4</sup>, Hatice ERTABAKLAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın; <sup>3</sup>Bone&Joint Research Unit, Barts and the London, Queen Mary School of Medicine & Dentistry, University of London, UK; <sup>4</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Aydın

**ÖZET** Bu çalışmada kutanöz leishmaniasis infeksiyonunda immünolojik bir marker olarak MİF'in olası rolü araştırılmıştır. 20 akut kutanöz leishmaniasisli (KL) olgu ve 20 sağlıklı kişinin serum örneklerinde sandviç ELISA yöntemi ile MİF düzeyi ölçülmüştür. Kontrol grubunda MİF değerleri  $3,50 \pm 7,07$  ng/ml, CL hasta grubunda ise  $69,05 \pm 149,48$  ng/ml bulunmuştur. Kontrol ve olgu grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). MİF değerlerindeki bu artış *Leishmania* varlığına bağlı olarak T hücreleri üzerinden hücrel immün yanıtın uyarılmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar sözcükler:** Makrofaj migrasyon inhibitör faktör, *Leishmania*

## Investigation of Serum Macrophage Migration Inhibitor Factor (MIF) Levels in Patients with Cutaneous Leishmaniasis

**SUMMARY** In this study, the possible role of MIF as an immunologic marker in cutaneous leishmaniasis was evaluated. Twenty patients with acute cutaneous leishmaniasis (CL) and 20 healthy subjects were included in the study. MIF serum levels were measured using a sandwich ELISA method. The MIF levels were  $3.50 \pm 7.07$  ng/ml in the control group and  $69.05 \pm 149.48$  ng/ml in the CL group ( $p < 0,001$ ). The increase in MIF levels in CL patients may be due to the stimulation of a T cell-mediated cellular immune response by *Leishmania*.

**Key words:** Macrophage migration inhibitor factor (MIF), *Leishmania*

## GİRİŞ

Vektör *Phlebotomus*ların ısırığı ile deriden bulaşan değişik *Leishmania* türlerinin farklı klinik tablolara yol açtığı ve oluşan hastalığın şiddetinin parazitin ve konağın özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterdiği ifade edilmektedir. Parazite karşı gelişen immün yanıtı bağli olarak kutanöz leishmaniasis (KL) olgularında oluşan lezyonun deride sınırlı kalarak kendiliğinden iyileştiği bildirilmektedir. Konakta parazit hücre içine yerleşmek üzere özellikle makrofajları seçmektedir. Makrofajların *Leishmania* infeksiyonunda antijen sunumunda ve özgül hücrel immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir(1,2).

T hücreleri tarafından salgılanan IFN $\gamma$  gibi lenfokinlerin parazit içeren makrofajları uyardığı ve makrofajlardan iNOS salgılatarak hücre içindeki parazitin ölümüne nede olduğu bildirilmiştir (3). Tümör nekrozis faktör alfa (TNF $\alpha$ ), interlekin (IL)-4, IL-3, IL-7 gibi sitokinlerin de makrofajların antimikrobisidal etkilerini arttırdığı bildirilmiştir (4). Sitokinlerden IL-4'ün, Th2 hücrelerden salınan IL-10 ile birlikte makrofajların fonksiyonlarını azaltan etkileri de bildirilmiştir. Uyarılmış T hücrelerinin ayrıca yüksek miktarlarda makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MİF) mRNA'sı ve proteini eksprese ettikleri de bildirilmiştir (3).

İlk kez T hücresi ürünü olarak saptanan MİF, makrofajların rastgele göçünü önleyen bir faktör olarak tanımlanmıştır (5). Dolaşımdaki MİF düzeyinin fizyolojik strese veya endotoksemi gibi sistemik inflamasyona yanıt olarak arttığı bildirilmiştir (6). Aynı zamanda anti-MİF antikolların gecik-

Geliş tarihi/Submission date: 04 Mart/04 March 2005  
Düzeltilme tarihi/Revision date: 26 Nisan/26 April 2005  
Kabul tarihi/Accepted date: 20 Mayıs/20 May 2005

Yazışma /Corresponding Author: Didem L. Kozacı  
Tel: (+90) (256) 225 31 66 Fax: -  
E-mail: dkozaci@adu.edu.tr

miş tip hipersensivite reaksiyonunu engellediği gösterilmiştir (7). MİF ayrıca T hücrelerinin, özellikle mitojenik veya antijenik bir stimülasyona bağlı olarak aktivasyonunda önemli düzenleyici role sahiptir. Hem Th1 hem de Th2 hücreleri MİF salgılasalar da özellikle Th2 hücrelerinin mitojenle uyarılmasıyla MİF salınımında artış izlenmiştir (3). Bacher ve ark. bir çalışmada endojen MİF ekspresyonunun T hücre aktivasyonu, IL-2 salınımı ve mitogeneze giden yolda gerekliliğini vurgulamışlardır (3). Son yıllarda MİF'in T hücrelerinin dışında çeşitli hücrelerce immünregülatör bir protein olarak üretildiği gösterilmiş ve sitokinin birçok yeni immünolojik ve hormonal fonksiyonları tanımlanmıştır (8). In vitro şartlarda, lipopolisakkarit (LPS), TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  makrofajlarda MİF salınımını arttırdığı gösterilmiştir (9). Pro-inflamatuvar bir sitokin olarak sınıflandırılan MİF ise buna karşılık, makrofajlardan TNF $\alpha$  ve IL-8 sekresyonunu arttırmaktadır (10,11). MİF etkileri makrofajları deaktive eden IL-10, IL-13 ve TGF- $\beta$  gibi sitokinlerce önlenmektedir. Makrofajlardan salınan MİF potent otokrin ve parakrin etkileriyle inflamasyon alanında hücre aktivasyonunu, proinflamatuvar sitokin salınımını ve glukokortikoidlerin etkilerini geriye çevirici etki göstermektedir (12).

MİF'in *Plasmodium chabaudi*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* gibi hücre içi patojenler ve *Taenia crassiceps* tarafından oluşturulan infeksiyonlarda kritik bir role sahip olduğu bildirilmiştir (4, 13-15).

Bu çalışmada *L. tropica*'nın etken olduğu KL infeksiyonunda immünolojik bir marker olarak MİF'in olası rolü araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

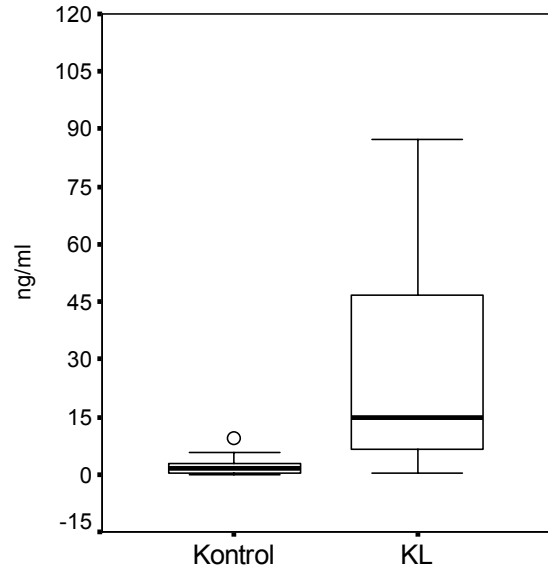
**Olgular:** Çalışmaya Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji polikliniğine başvuran, yaşları 3 ile 70 yaş arasında 12'si kadın 8'i erkek olmak üzere toplam 20 akut kutanöz leishmaniasis'li (KL) olgu dahil edilmiştir. KL'li olgulardan dokuzunda 1, üçünde 2, ikisinde 3, ikisinde 4, ikisinde 7 ve ikisinde 13 olmak üzere, yüz ve/veya kol ve bacak gibi vücudun açıkta kalan yerlerinde lezyon saptanmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen hastalardaki *Leishmania* türü araştırılmamasına karşılık Türkiye'de görülen KL olgularında etkenin *Leishmania tropica* olduğu bildirilmektedir (16). Akut olguların KL tanısı lezyondan alınan örneğin direkt bakısında amastigotların görülmesi ve/veya NNN besi yerinde promastigotların üretilmesi ile konulmuştur. Kontrol grubu olarak yaşları 20 ile 45 yaş arasında değişen 20 (9'u kadın, 11'i erkek) sağlıklı kişi seçilmiştir. Kan örnekleri alınarak 2000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildikten sonra serum örnekleri ayrılmış ve serumlar çalışılana kadar -70°C'de saklanmıştır.

**MİF değerlendirilmesi:** Olguların serum örneklerinde MİF (Cat No: DY289, R&D Systems, İngiltere) değerleri sandviç ELISA yöntemi ile firmanın önerileri doğrultusunda ölçülmüştür. Sonuçta standart ve örnekler 450 nm'de okutulup, lineer regresyon analizi ile hesaplanmıştır.

**İstatistiksel değerlendirme:** Bulguların istatistiki analiz sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma ( $X \pm SD$ ) olarak verilmiştir. Gruplar arası MİF değerlerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir. MİF düzeyleri, ve lezyon sayıları arasında korelasyon varlığı Spearman'ın (rho) korelasyon katsayısı (SPSS) ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Kontrol grubunda MİF değerleri  $3,50 \pm 7,07$  ng/ml, KL hasta grubunda ise  $69,05 \pm 149,48$  ng/ml bulunmuştur (Şekil 1). Kontrol ve olgu grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,000$ ). Hastalarda lezyon sayısı ile serum MİF değerleri arasında anlamlı bir korelasyon izlenmemiştir ( $R^2=0,08$ ,  $p=0,745$ ).



Şekil 1. KL'li olgularda ve kontrol grubunda serum MIF değerleri

## TARTIŞMA

Leishmaniasis'in parazit-konak etkileşiminin incelenmesinde uygun bir model olduğu kabul edilmektedir (17). Jüttner ve ark. rekombinant olarak üretilen MİF'in (rMİF) makrofajları aktive ederek *L. major*'ü öldürdüğünü göstermişlerdir. Ayrıca antijenik uyarı takiben henüz hücre immünitede önemli rolü olan diğer sitokinler ortama salınmadan önce hücre içinde depolanmış MİF'in ortama salınarak erken immün yanıtın oluşmasında rol oynadığı vurgulanmıştır. Bu ortama salınan MİF'in, *L. major*'un replikasyonunu inhibe ettiği ve inflamasyon alanına gelen monositlerin göçünü engelleyerek infeksiyonunun sınırlı kalmasını sağladığını ileri sürmüşlerdir (4). Benzer bir çalışmada Weiser ve ark. rMİF'in monosit kaynaklı makrofajları aktive ederek hücre içindeki parazitlerin

büyümesini baskıladığını ve parazitleri öldürdüğünü göstermişlerdir. Bu çalışma parazite karşı konağın hücresel immün yanıtında MİF'in makrofaj aktivasyonunu artırıcı etkisini göstermektedir (18).

Damo ve ark. BALB/c farelerde plazmid veya oral yolla verilen IFN $\gamma$ , MİF, TNF $\alpha$  veya IL-2 gibi interlökinlerin *L. major* enfeksiyonun gelişimini baskılandığını bildirmişlerdir (19).

Bizim çalışmamızda KL olgularında serum MİF değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Her ne kadar *L. tropica*'nın etken olduğu KL enfeksiyonunda lezyonlar deride sınırlı olsa da çalışmamızda serum MİF değerlerindeki anlamlı farklılık sistemik hücresel immün yanıtta artışa işaret etmektedir. Kontrol grubunun değerleri normal sınırlar aralığında (2-6 ng/ml) ölçülmüştür (6). Serum MİF değerleri ile olgulardaki lezyon sayıları arasında beklenen negatif korelasyonun izlenmemesi çalışmaya dahil edilen olgu sayısının az olmasına ya da olguların serum MİF seviyelerinin lezyon gelişimini baskılayacak düzeylere erişmemiş olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Jüttner ve ark. rekombinant MİF'in mürin makrofajlarını aktive ederek *L. major*'ü öldürdüğü maksimum etkinin bir mg/ml'nin üzerindeki MİF dozlarında görüldüğünü bildirmişlerdir (4). Damo ve arkadaşlarının çalışmasında ise lezyonlarda azalmaya yol açan, oral yoldan verilen sitokin dozu ~0.2-0.3mg/ml olarak verilmiştir (19).

Satoskar ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada MİF'in superoksit ve NO yapımını uyararak makrofajların "leishmaniasis" aktivitelerini arttırmak suretiyle *L. major*'un etken olduğu KL enfeksiyonuna karşı koruyucu immünitenin oluşumunda ve kontrolünde rol oynadığı bildirilmiştir (14). Bernhagen ve ark. ise spesifik bir indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibitörü olan L-N6-(1-iminoetil) lizin dihidrokloridinin MİF'in bu etkisini inhibe ettiğini göstermişlerdir. iNOS-defektli farelerde MİF etkisinin görülmemesi de MİF'in anti-paraziter etkisinde iNOS'un önemli olduğu görüşünü desteklemektedir (9).

Serum MİF düzeylerinin birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta arttığı bilinmektedir (6). Bu nedenle MİF değerlerinin yalnızca serumda ölçülmesi çalışmamızın kısıtlayıcı bir özelliği olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızdaki hasta grubundaki olguların KL dışında bilinen herhangi bir sistemik inflamatuvar ve/veya otoimmün hastalığının olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca olgu ve kontrol grubu arasındaki MİF değerlerinde saptanan belirgin farklılık bize MİF düzeylerinde saptanan artışın KL enfeksiyonundan kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu çalışmamızda olguların tedavi sonrası MİF düzeyleri ölçülemedi. Tedavi sonrasında olguların MİF düzeylerinde olası değişimin gözlenmesi çalışmamızda saptadığımız MİF düzeylerindeki artışın KL'den kaynaklandığı görüşünü destekleyebilir.

Bu çalışmanın MİF'in kutanöz leishmaniasisteki rolünün ve immünmodülatör mekanizmalarının araştırılmasında gelecekte yapmayı planladığımız çalışmalarımıza temel olabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Ak M, Özbel Y, Özensoy S, Turgay N, 1995. Visseral Leishmaniasis. Özcel M, ed. *İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, p.69-119.
2. Garcia L, Bruckner D, 1993. Leishmaniasis. Garcia L, Bruckner D, eds. *Diagnostic Medical Parasitology*. Washington: American Society for Microbiology, p.139-159.
3. Bacher M, Metz C, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnely T, Bucala R, 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7849-7854.
4. Jüttner S, Bernhagen J, Metz C, Rollinghoff M, Bucala R, Gessner A, 1998. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- $\alpha$ . *J Immunol*, 161: 2383-2390.
5. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell R, Martin S, Tracey K, Voelter W, Manogue K, Cerami A, Bucala R, 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365: 756-759.
6. Fingerle-Rowson G, Bucala R, 2001. Neuroendocrine properties of macrophage inhibitory factor (MIF). *Immunol Cell Biol*, 79: 368-375.
7. Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand E, 2001. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*, 123: 309-314.
8. Bucala R, 1994. Identification of MIF as a new pituitary hormone and macrophage cytokine and its role in endotoxic shock. *Immunol Letters*, 43: 23-26.
9. Bernhagen J, Calandra T, Bucala R, 1994. The emerging role of MIF in septic shock and infection. *Biotherapy*, 8: 123.
10. Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz C, Doty S, Donnely T, Bucala R, 1996. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med*, 183: 277-282.
11. Donnely S, Haslett C, Reid P, Grant I, Wallace W, Metz C, Bruce L, Bucala R, 1997. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Med*, 3: 320-323.
12. Baugh J, Bucala R, 2002. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med*, 30: 27-34.
13. Martiney JA, Sherry B, Metz C, Espinoza M, Ferrer A, Calandra T, Broxmeyer H, Bucala R, 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun*, 68: 2259-2267.

14. **Satoskar A, Bozza M, Sosa M, Lin G, David J**, 2001. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun*, 69: 906-911.
15. **Sosa M, Rosas L, David J, Bojalil R, Satosar A, Terrazasi L**, 2003. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun*, 71: 1247-1254.
16. **Ok U, Balcioglu I, Ozkan T, Özensoy S, Özbek Y**, 2002. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop*, 84: 43-49.
17. **Melby P**, 2002. Recent developments in leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 15: 485-490.
18. **Weiser W, Pozzi L, David J**, 1991. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. *J Immunol*, 147: 2006-2011.
19. **Damo X, McSorley S, Tetley L, Chatfield S, Dougan G, Chan W, Satoskar A, David J, Liew F**, 1998. Protective effect on *Leishmania major* infection of migration inhibitory factor, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  administered orally via attenuated *Salmonella typhimurium*. *J Immunol*, 160: 1285-1289.