Decreased expression of genes involved in keratin synthesis in patients with cutaneous leishmaniasis

Kavoos Momeni[1], Saeid Ghorbian[1*], Ehsan Ahmadpour[2], Rasoul Sharifi[3]

1. Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2. Department of Parasitology, Tabriz University of Medical Science, Tabriz ,Iran
3. Department of Biology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Abstract

Aim and Background: In many countries, including Iran, cutaneous leishmaniasis is a common and increasing disease. Proper and quick treatment of many of these patients is very difficult due to insufficient familiarity with the factors that play a role in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. By using high-performance RNA sequencing methods and investigating the expression of different genes in different tissues, a new horizon has been opened on the identification of disease pathogenesis factors and obtaining new treatment methods.

Material and Methods: This investigation was divided into two phases. Data from the NCBI website, "GSE127831" were used for the bioinformatics analysis. We conducted investigations of Gene Ontology and Differential Gene Expression. In the clinical investigation, we used qPCR to assess the expression of the genes identified in the previous stage in 27 skin samples taken from wounds caused by cutaneous leishmaniasis and 12 healthy skin samples.

Results: According to our bioinformatics investigations, the first 100 genes with the highest drop in expression in leishmaniasis wounds are mostly involved in the production of different keratin proteins. They are mostly involved in "Intermediate Filaments Organization". The qPCR test showed that the expression of *KRTAP11-1, KRT33B, KRT85, KRT35, KRT86, and KRT81* genes was greatly reduced. It shows the coordination of the results of bioinformatics and laboratory stages.

Conclusion: The downregulation of a specific set of genes involved in keratin formation is one of the key factors contributing to the poor healing of wounds in cutaneous leishmaniasis. keratin is a crucial chemical in developing and maintaining epithelial tissue and skin.

Key Words: Bioinformatics Analysis, Differential gene expression analysis, Gene Ontology Analysis, Cutaneous leishmaniasis, Keratin

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

Corresponding author:
Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
Email: ghorbian20@gmail.com

کاهش بیان ژن‌های دخیل در سنتز کراتین در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی

کاووس مومنی[۱]، سعید قربیان[۱*]، احسان احمد پور[۲]، رسول شریفی[۳]

۱. گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. گروه بیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در بسیاری از کشورها، از جمله ایران، لیشمانیوز جلدی یک بیماری شایع و در حال افزایش است. درمان مناسب و سریع بسیاری از این بیماران، بعلت عدم آشنایی کافی با عواملی که در پاتوژنز لیشمانیوز جلدی نقش دارند، بسیار مشکل است. با استفاده از روش‌های توالی‌یابی RNA با کارایی بالا و بررسی نحوه بیان ژن‌های مختلف در بافت‌های گوناگون، افق جدیدی بر روی شناسایی عوامل پاتوژنز بیماریها و بدست آوردن روش‌های درمانی جدید باز شده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در دو بخش بیوانفورماتیکی و بالینی انجام شد. مرحله اول تحقیق بر روی دیتای GSE127831 از سایت NCBI انجام گرفت. بعد از فیلتراسیون‌های اولیه، آنالیز های DGEs و Gene Ontology بر روی ژن‌های بدست آمده انجام گرفت. در بخش بالینی، میزان بیان نسبی ژن‌های منتخب در مرحله قبلی در ۲۷ نمونه پوستی حاصل از اطراف زخم لیشمانیوز و ۱۲ نمونه سالم پوست، بروش qPCR ، اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد فعالیت عمده یک‌صد ژن اول از لیست ژن‌هایی که بیشترین کاهش بیان را در زخم های لیشمانیوز دارند مربوط به ژن های کد کننده انواع پروتیین‌های کراتین می‌باشد و مسیر ژنتیکی " تشکیل فیلامان‌های داخل بافتی" بیشتر از همه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. تعداد زیادی از ژن‌های فعال در ساخت کراتین، کاهش بیان شدید و معنی داری در طی لیشمانیوز جلدی پیدا می‌کنند. اندازه گیری سطح بیان ژن‌های *KRTAP11-1* و *KRT33B* و *KRT85* و *KRT35* و *KRT86* و *KRT81* که بیشترین کاهش را در مرحله بیوانفورماتیک نشان داده بودند نشان دهنده هماهنگی نتایج مراحل بیوانفورماتیکی و بالینی می‌باشد. هر چند مقدار کاهش بیان در نمونه‌های ما کمتر بود.

نتیجه‌گیری: یکی از علل اصلی ایجاد زخم‌های دیر بهبود یابنده در لیشمانیوز پوستی کاهش بیان گروه خاصی از ژن‌ها می‌باشد که مسئول تولید کراتین میباشند. کراتین مولکولی مهم در ساخت و نگه‌داری از بافت اپیتلیال و پوست می‌باشد.

واژگان کلیدی: آنالیز بیوانفورماتیک ، آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها، آنالیز هستی شناسی ژن، لیشمانیوز جلدی، کراتین

مقدمه

پیشرفت در مطالعات زیست شناسی و ژنتیک مولکولی، انقلابی در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌های مختلف ایجاد کرده است. تشخیص مولکولی (Molecular Diagnostics) به ابزار مهمی برای ارائه دهندگان مراقبت‌های بهداشتی و درمانی تبدیل شده و بینش‌های جدیدی را در مورد پاتوژنز و پیش آگهی بیماری‌های مختلف ارائه می‌دهد. روش های تشخیص مولکولی بتدریج از مرحله مطالعاتی صرف، تبدیل به فناوری‌های جدیدی در آزمایش‌های بالینی شده‌اند که اثر انگشت مولکولی بیماری‌ها را شناسایی و پاسخ به درمان را پیش‌بینی می‌کنند. تشخیص مولکولی زمینه‌های مختلفی مانند بیماری‌های عفونی، ژنتیک، فارماکوژنومیک و انکولوژی را در بر می‌گیرد (۱). لیشمانیوز یکی از بیماری‌های انگلی شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان بوده وتهدیدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شود. انواع این بیماری به‌صورت ضایعات پوستی (سالک)، جلدی مخاطی

نویسنده مسئول:
گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
پست الکترونیکی: ghorbian20@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

و احشایی (کالازار) بروز می‌کند. نوع جلدی به دو شکل اصلی خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می‌شود. سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization (WHO)) بیماری لیشمانیوز را در ردیف شش بیماری مهم انگلی مناطق گرمسیری دنیا قرار داده و با معرفی لیشمانیوز به‌عنوان یک "بیماری استوایی نادیده گرفته شده" ((Neglected tropical diseases (NTD)) بر تأثیر قابل توجه آن بر سلامت جوامع انسانی تأکید می‌کند (۲). تخمین زده می‌شود که سالانه ششصد هزار تا یک میلیون مورد جدید لیشمانیوز جلدی در سراسر جهان رخ می‌دهد، اما تنها حدود دویست هزار مورد به WHO گزارش می‌شود. با وجود اینکه انگل عامل بیماری لیشمانیوز جلدی و راههای انتقال آن کاملاً شناخته شده و تحقیقات بسیاری در مورد این بیماری انجام گرفته ولی متأسفانه لیشمانیوز جلدی همچنان دربسیاری از کشورهای جهان به عنوان یک بیماری شایع مطرح بوده وحتی درحال گسترش است. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در ۹۸ کشور بیماری لیشمانیوز بومی است و بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا هستند، تعداد مبتلایان به لیشمانیا حدود ۱۲ میلیون نفر تخمین زده شده است. بیش از ۹۰ ٪ موارد لیشمانیوز جلدی در افغانستان، الجزیره، عربستان سعودی، ایران، سوریه، بولیوی، برزیل، کلمبیا، نیکاراگوئه و پرو دیده می‌شود (۳). طبق آمار ارائه شده از طرف اداره کل پیشگیری و مبارزه با بیماری‌های وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، میزان بروز لیشمانیوز جلدی در ایران سی نفر در هر یکصد هزار نفر می‌باشد. گرچه سالانه حدود بیست هزار مورد بیماری لیشمانیوز جلدی در ایران گزارش می‌شود ولی احتمالاً موارد حقیقی بیش از ۴ تا ۵ برابر آن است. دو نوع لیشمانیوز پوستی یا سالک (شهری و روستایی)و یک نوع لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) در کشور ما وجود دارد. سالک یکی از مهمترین بیماریهای پوستی مشترک بین انسان و حیوان است که توسط گزش پشه خاکی به انسان منتقل می‌شود. این بیماری به دلیل طولانی بودن دوره درمان، ایجاد ظاهر ناخوشایند و اضافه شدن عفونت‌های ثانویه باید تحت کنترل قرار گیرد. کانون اصلی سالک در کشور ما شهرهای مشهد، نیشابور، تهران، شیراز، کرمان، بم، یزد و... است (۷-۴).

داروهایی که در حال حاضر برای درمان این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند گران قیمت بوده و عوارض متعددی دارند. مثلا گلوکانتیم(ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان) که رایج ترین دارو می‌باشد نیاز به تزریقات مکرر دارد و علاوه بر بار اقتصادی دارای عوارض جانبی مثل آریتمی قلبی، افزایش آنزیم‌های کبدی، کم خونی، آسیب به پانکراس، قلب، کبد و بافت خونساز می‌باشد. تزریق آن دردناک بوده و ممکن است منجر به ایجاد اسکار در محل تزریق شده و مشکلات روحی و روانی برای کودکان و زنان ایجاد کند (۸). سازمان بهداشت جهانی توصیه می‌کند که تحقیقات جدید و اساسی در این خصوص انجام گیرد (۹). نتایج حاصل از روش‌های درمانی فعلی در افراد مختلف، متفاوت می‌باشد و نیاز شدیدی به شناسایی دقیق عوامل پاتوژنز انگل لیشمانیا بر اساس تکنیک‌های جدید مولکولی وجود دارد تا روش‌های درمانی موثرتر و کم عارضه‌تری به خصوص برای کودکان پیشنهاد شود (۱۰). با در دسترس قرار گرفتن روش‌های مطالعه مولکولی با توالی یابیRNA و بررسی نحوه بیان ژن‌های مختلف در بافت‌های گوناگون، افق جدیدی بر روی شناسایی عوامل پاتوژنز بیماری‌ها و بدست آوردن روش‌های درمانی جدید باز شده است. در دهه گذشته، پلتفرم‌های توالی یابی پیشرفته مثل ایلومینا امکان شناسایی بیان ژن در سلول‌های مختلف و شناسایی ژن‌های مرتبط با پاتوژنیسیته بیماری‌ها را امکان‌پذیر کرده‌اند (۱۱). تحقیقات نشان می‌دهد تغییرات در میزان بیان ژن‌های مختلف در سلول بیمار می‌تواند بر سیر و نتیجه بیماری موثر باشد. به دلیل مشکل بودن تهیه بیوبسی پوست از اطراف زخم لیشمانیوز جلدی، اکثر مطالعات قبلی به تجزیه و تحلیل سلول‌های موجود در خون محیطی محدود شده است. پاسخ‌های ایمنی سیستمیک ممکن است همبستگی کامل با سیستم ایمنی بافتی نداشته باشند. برای ارزیابی دقیق این موضوع در بیماری لیشمانیوز جلدی، لازم است توالی‌یابی RNA سلولی بر روی نمونه‌های پوستی بیماران لیشمانیوز جلدی انجام گرفته و دیتا بدست آمده با نتایج حاصل از سلول‌های سالم پوستی مقایسه شود. این اطلاعات باید با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی آنالیز اطلاعات ژنتیک مثل آنالیز Gene Ontology مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرند تا ژن‌هایی که میزان بیان متفاوتی در شرایط مختلف داشته‌اند شناسایی شده و اثرات بیماریزایی این تغییرات بررسی شود. در این تحقیق، بعد از شناسایی ژن‌ها و یا مسیرهای ژنتیکی که تغییرات بیان معنی‌دار از نظر آماری، بیولوژیک و پاتولوژیک داشته‌اند ضمن بررسی آن‌ها، جهت ارزیابی صحت این نتایج، تعداد مناسب نمونه بیوبسی پوستی از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی و نیز افراد سالم تهیه شده و با استفاده از روش qPCR مقدار بیان این ژن‌ها را اندازه‌گیری نموده و با نتایج قبلی مقایسه می‌کنیم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

مواد و روش‌ها

مرحله بیوانفورماتیکی

برای پیدا کردن دیتای اولیه مناسب جهت آنالیزهای بیوانفورماتیک به سایت National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus در آدرس:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo مراجعه شد و با استفاده از کلمه کلیدی Leishmania Cutaneous از بین پروفایل های Microarray و RNAseq در این سایت جستجو کردیم. از بین نتایج حاصله دیتای GSE127831 (۱۲) که تا حدود زیادی با شرایط مورد نظر ما منطبق و مناسب بود برای ادامه کار انتخاب شد. در این تحقیق ۲۱ نمونه پوستی از ناحیه کناره ملتهب زخم‌های پوستی بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی حاصل از لیشمانیا تروپیکا (Leishmania Tropica) و هفت نمونه از پوست سالم برداشته شده و RNA آن‌ها استخراج شده است. بر روی این نمونه‌ها RNA sequencing توسط دستگاه Illumina انجام گرفته است و اطلاعات حاصله در سایت NCBI و دیتا بیس GEO با شماره دسترسی GSE127831 ثبت گردیده است. این دیتا توسط برنامه GEO2R که در همین سایت وجود دارد مورد آنالیز قرار گرفت. برای بالا بردن معنی داری نتایج ، ژن‌هایی که کمتر از دو برابر تغییرات بیان داشتند ($logFC < 2$) حذف شدند و ژن‌های باقی مانده به‌ترتیب از معنی دارترین کاهش بیان ژن ((Neg)LOG10(P.value)) به پایین مرتب گردیدند. این جدول به اسم S1-All در ضمیمه این مقاله قرار دارد و حاوی اطلاعات مربوط به ۹۱۸۰ ژن می‌باشد. برای گرفتن مهمترین و با معنی ترین نتیجه، ادامه آنالیز را به یک‌صد ژن اول این جدول که بیشترین و معنی دارترین کاهش بیان را در نمونه‌های بیمار داشتند محدود کردیم و از طریق سایت GENERIC GENE ONTOLOGY (GO) TERM FINDER که مربوط به دانشگاه پرینستون (go.princeton.edu) است اقدام به آنالیز Gene Ontology این یک‌صد ژن (جدول S2-100 ضمیمه) نموده و آن‌ها را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادیم. در نهایت ۶ عدد ژن شناسایی و انتخاب شدند که کاهش شدید و معنی دار داشتند. برای تایید تغییر بیان این ژن‌ها در نمونه-های واقعی از آزمایش qPCR استفاده کردیم.

مرحله آزمایشگاهی

در این مرحله تست Quantitative REAL-TIME PCR (qPCR) (۱۳) روی نمونه‌های واقعی انجام شد. نمونه ها از پوست ناحیه اطراف زخم جلدی لیشمانیوز ۲۷ بیمار تهیه شدند. این بیماران به آزمایشگاه انگل شناسی بیمارستان امام رضا (ع) در شهر مشهد مراجعه کرده بودند و با مشاهده میکروسکپی اجسام لیشمن در گسترش مستقیم، زخم لیشمانیوز جلدی آن‌ها تایید شده بود. ۱۲ نمونه سالم هم از پوست نواحی سالم بدن همان بیماران گرفته شد. تست qPCR روی نمونه حاصل از عصاره‌های بافتی فوق با استفاده از شش پرایمر از ژن‌هایی که در مرحله قبل شناسایی شده بودند انجام شد تا مقدار تغییرات بیان این ژنها در زخم‌های لیشمانیوز پوستی نسبت به پوست‌های سالم اندازه‌گیری شود. توالی این پرایمرها در ستون‌های ۵ و ۶ ، جدول ۳ آمده است. همزمان با انجام آزمایش qPCR برای هر یک از ژن‌های مورد نظر بر روی نمونه‌های بیماران و افراد سالم، جفت پرایمر دیگری نیز از یک ژن رفرانس در ویالهای آزمایش قرار گرفت. این ژن طوری انتخاب می‌گردد که در شرایط مختلف بیان ثابتی داشته و میزان بیان آن تحت تاثیر بیماری قرار نمی‌گیرد. طبق تحقیقات قبلی (۱۴) ژن *rRNA45* بهترین گزینه به‌عنوان ژن رفرانس برای ما بود و پرایمر های آن (جدول ۱) را نیز در هر ویال به‌همراه هر یک از پرایمرهای ژن‌های مورد آزمایش، قرار دادیم تا میزان بیان آن را به‌عنوان مقدار رفرانس در محاسبات در نظر بگیریم.

جدول ۱ : ژن رفرانس و توالی پرایمرهای آن

رفرانس‌ژن	rRNA45
فوروارد توالی	CCTACCATGCCGTGTCCTTCTA
رورس توالی	AACGACCCCTGCAGCAATAC

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

جهت انجام واکنش Real time PCR از دستگاه Mic Real Time PCR Cycler استفاده شد (۱۵) و محلول مستر میکس مورد استفاده محصول شرکت Amplicon بود (۱۶). برنامه سیکل کاری دستگاه PCR بترتیب زیر تنظیم شد:

-- دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه (زمان و دمای فعالسازی آنزیم اولیه)

۴۰سیکل شامل :

-- در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه

-- اتصال پرایمرها و بسط واکنش(annealing and extension) به ترتیب در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱۰ ثانیه.

یافته‌ها

یافته های بیوانفورماتیکی

همان‌طور که نتایج آنالیز UMAP بر روی دیتای GSE127831 نشان می‌دهد، (شکل ۱) ، نحوه بیان ژن‌ها در بین افراد سالم و بیمار اختلاف زیادی دارد و با آنالیز آن می‌توان به نتایج معنی داری رسید. طبیعی است که در هر عفونتی بیان ژن‌های سیستم ایمنی افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا می‌کند، ما در این تحقیق به ژن‌های سیستم ایمنی توجهی نداشتیم و آنالیزهای بیوانفورماتیک بر روی ژن‌هایی انجام شد که در زخم های لیشمانیوز کاهش بیان شدید داشتند. لیست یک‌صد ژنی که بیشترین و با معنی ترین کاهش بیان را در نمونه های مبتلا به لیشمانیوز داشته‌اند بهمراه اطلاعات مربوطه در جدول S2 که در فایل ضمیمه مقاله می‌باشد آمده است. نتایج آنالیز Gene Ontology آن‌ها در جدول ۴ دیده می‌شود. مهمترین گروه ژن‌های موجود در این لیست مربوط به ترم Gene Ontology: 0045109 - Intermediate Filament Organization می‌باشد. همه نتایج حاصل از این آنالیز در آدرس:

https://go.princeton.edu/cgi-bin/JobWatch.pl?id=7854240

قابل مشاهده می‌باشد. به‌طور طبیعی کمتر از ۰,۴ درصد ژن‌های انسان در این گروه قرار می‌گیرند ولی در این آنالیز ۱۴ درصد از ژن‌ها در این ترم قرار دارند که نشان دهنده معنی داری این نتیجه می‌باشد. همان‌طور که در ستون اول جدول ۴ دیده می‌شود همه موضوعات هستی‌شناسی (Ontology) ژن که برای این گروه صدتایی از ژن‌ها مشخص شده‌اند مربوط به ساخت و افتراق و نگهداری از پوست و بافت اپیتلیال می‌باشند. در این میان ژن‌های تولید کننده کراتین تقریبا در تمام ترم ها مشاهده می‌شوند بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که کاهش تولید کراتین می‌تواند یکی از عوامل اصلی بیماریزا در این مورد باشد. لیست همه ۴۳ ژنی که در تولید کراتین نقش دارند و در این آنالیز تغییر بیان داشته اند بهمراه اطلاعات مربوط به تغییر بیان آنها در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اکثر آنها کاهش بیان شدیدی دارند. در این میان ما شش ژن از ابتدای همین جدول که لگاریتم تغییر بیان آنها بیش از شش برابر می‌باشد ($LogFC > 6.2$) یعنی حداقل بیش از هشتاد برابر کاهش بیان داشتند را برای ادامه آنالیز و آزمایشات عملی انتخاب نمودیم. اسامی این ژن‌ها بهمراه مقدار تغییر بیان و مقدار معنی دار بودن آن‌ها در سه ستون اول جدول ۳ آمده است.

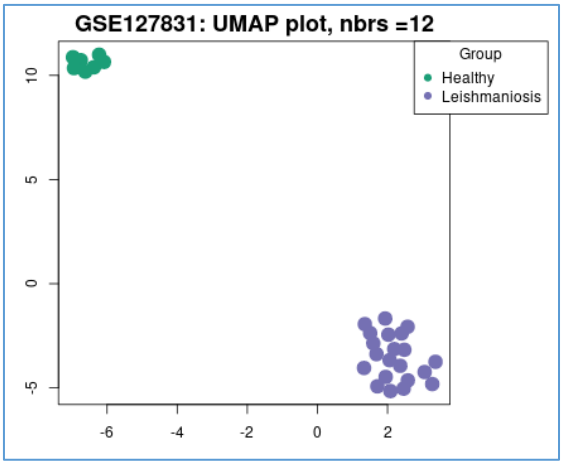
یافته‌های آزمایشگاهی

آزمایشات qPCR بر روی ژن‌های انتخاب شده از مرحله قبل بر روی نمونه‌های تهیه شده از پوست‌های نرمال و همچنین مبتلا به لیشمانیوز جلدی در شرایط یکسان انجام شدند. نتایج حاصل از آزمایشات بصورت لگاریتم نسبت تغییر بیان ژن ($Log(FC)$) بین پوست سالم و پوست مبتلا به لیشمانیوز جلدی در شکل ۲ نشان داده شدن است. همانطور که مشاهده می‌شود مقدار بیان همه ژن‌های انتخابی در بین نمونه‌های سالم و بیمار تغییر معنی داری پیدا کرده‌اند. این ژن‌ها در نمونه‌های سالم بیان بیشتری داشتند و محدوده تغییرات آن‌ها در افراد مختلف هم نسبتاً زیاد بود که به احتمال قوی این تغییرات بسته به شرایط پوست تنظیم میگردد ولی در همه نمونه های لیشمانیوز جلدی بیان آنها کاهش یافته و محدوده تغییرات خیلی کوچکی دارد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

جدول ۲: ژن‌های تولید کننده کراتین که در این آنالیز تغییر بیان داشتند.

Symbol	log2(fold change)
KRTAP11-1	6.752
KRT33B	6.736
KRT85	6.619
KRT35	6.572
KRT86	6.414
KRT81	6.233
KRT31	6.143
KRT82	5.761
KRT32	5.602
KRT40	5.474
KRT27	5.374
KRT71	5.264
KRT25	5.246
KRT38	4.9
KRT77	4.495
KRT2	4.323
KRT33A	4.185
KRTAP5-AS1	4.053
KRT10	3.64
KRT10-AS1	3.544
KRT15	3.519
KRT1	2.69
KRT7-AS	2.618
KRT7	2.601
KRT72	2.452
KRT73	2.204
KRT12	2.194
KRT23	1.786
KRT37	1.674
KRT8	1.647
KRT18	1.621
KRTCAP3	1.474
KRT222	1.366
KRT19	1.204
KRT6B	-2.623
KRT16P3	-2.669
KRT17	-2.821
KRT6A	-2.905
KRT16	-2.953
KRT17P1	-2.967
KRT6C	-3.023
KRT76	-3.233
KRT3	-4.663



شکل ۱: نتایج آنالیز UMAP نشان دهنده اختلاف قابل توجه در طرح کلی بیان ژن‌های بین سلول‌های سالم و مبتلا به لیشمانیوز می‌باشد.

جدول ۳ : لیست ژن‌های انتخاب شده برای آزمایش qPCR و مقدار تغییر بیان آن‌ها در آنالیز بیوانفورماتیک و توالی پرایمر هر کدام از آن‌ها

Symbol	log2(fold change)	(Neg)LOG10(Pvalue)	Description	Forward Primer	Reverse Primer
KRTAP11-1	6.752	2.718	keratin associated protein	CCAGGTGACTTGCTCTCGACAA	TGGTTGGCAGACACTGGAGATG
KRT33B	6.736	10.289	keratin 33B	GAAGTGGAGCAATGGTTCGCCA	AGGGCATTGACTGTGCGTCTCA
KRT85	6.619	4.27	keratin 85	CAAGTCCCTCAACAGCAGGTTC	TGAACAGTGGCTCCAGGTTGCT
KRT35	6.572	3.952	keratin 35	CCTGACTACCAGTCCTACTTCC	CTTGGTCCTGAAGTCATCTGCAG
KRT86	6.414	16.853	keratin 86	GCTGAGAACGAGTTTGTGGCTC	TCATACAGCCGCCTCAGGAAGT
KRT81	6.233	14.955	keratin 81	GCTGAGAACGAGTTTGTGGCTC	TCATACAGCCGCCTCAGGAAGT

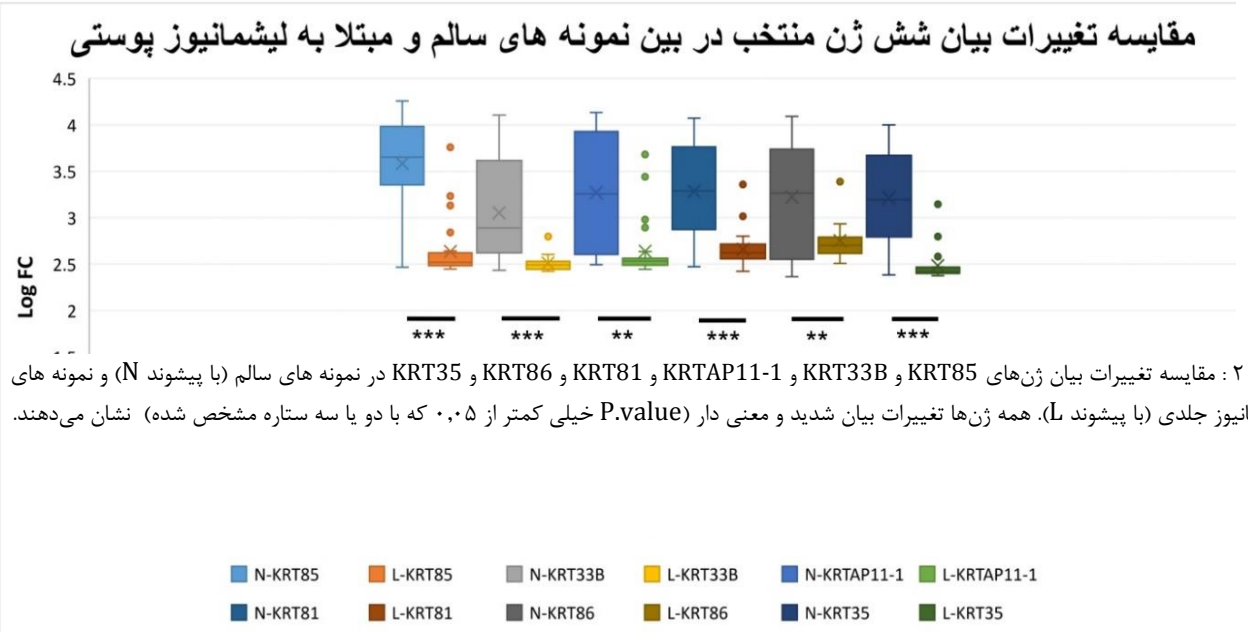
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-15]

بحث

بعلت پیچیدگی عوامل موثر در پاتوژنز بیماری لیشمانیوز جلدی، هنوز عده زیادی از این بیماران درمان مناسب و کافی دریافت نمی‌کنند و درگیر مشکلات بعد از بیماری هستند. آنالیز بیوانفورماتیکی دیتای حاصل از توالی یابی RNA سلول‌های مبتلا به لیشمانیا می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد عوامل بیمایزا و آسیب رسان این بیماری در اختیار ما قرار دهد. این مطالعه در دو مرحله بیوانفورماتیکی و بالینی انجام شد. مرحله اول تحقیق بر روی دیتای موجود در بانک اطلاعاتی GEO انجام گرفت. دیتای مورد استفاده ما به شناسه GSE127831 از آزمایش RNA-Seq بر روی نمونه های بیوبسی پوستی ۲۱ مریض مبتلا به لیشمانیوز جلدی و ۷ فرد سالم تهیه شده بود. بعد از دانلود و فیلتراسیون‌های اولیه، آنالیز Differential Gene Expression Analysis (DGEs) با استفاده از نرم افزار GEO2R که در سایت GEO قرار دارد انجام گردید تا ژن‌هایی که بیشترین تغییرات بیان را در بین این دو گروه بیمار و سالم داشتند شناسایی شوند.

جدول۴ : نتایج آنالیز Gene Ontology یک‌صد ژنی که بیشترین کاهش بیان را در آنالیز Defferential Gene Expression داشتند.

Gene Ontology term	P-value	Genes annotated to the term
Intermediate filament organization	1.05E-15	KRT32, KRT38, KRT27, KRT40, TCHH, KRT82, KRT33B, KRT85, KRT86, KRT81, KRT71, KRT25, KRT35, KRT31
Intermediate filament cytoskeleton organi	3.70E-14	KRT32, KRT38, KRT27, KRT40, TCHH, KRT82, KRT33B, KRT85, KRT86, KRT81, KRT71, KRT25, KRT35, KRT31
Intermediate filament-based process	4.32E-14	KRT32, KRT38, KRT27, KRT40, TCHH, KRT82, KRT33B, KRT85, KRT86, KRT81, KRT71, KRT25, KRT35, KRT31
Epithelial cell differentiation	5.36E-07	KRT38, KRT27, TCHH, KRT33B, KRT85, KRT81, DSG4, ADIPOQ, PCK1, KRT35, TNMD, KRT32, KRT82, KRT40, ERBB4, KRT86, SPRR4, KRT71, KRT25, KRT31
Keratinization	0.00021	SPRR4, KRT81, KRT71, TCHH, KRT82, KRT85, KRT86
Epidermis development	0.00056	KRT32, KRT27, TCHH, KRT82, KRT85, KRT86, SPRR4, KRT81, KRT71, DSG4, KRT25, KRT31
Keratinocyte differentiation	0.00304	TCHH, KRT82, KRT85, KRT86, KRT81, SPRR4, KRT71, DSG4
Epithelium development	0.00304	KRT38, KRT27, TCHH, KRT33B, KRT85, KRT81, DSG4, ADIPOQ, PCK1, KRT35, TNMD, KRT32, KRT82, KRT40, ERBB4, KRT86, SPRR4, KRT71, KRT25, KRT31
Skin development	0.00457	KRT27, TCHH, KRT82, KRT85, KRT86, SPRR4, KRT81, KRT71, DSG4, KRT25



شکل ۲ : مقایسه تغییرات بیان ژن‌های KRT85 و KRT33B و KRTAP11-1 و KRT81 و KRT86 و KRT35 در نمونه های سالم (با پیشوند N) و نمونه های لیشمانیوز جلدی (با پیشوند L). همه ژن‌ها تغییرات بیان شدید و معنی دار (P.value خیلی کمتر از ۰،۰۵ که با دو یا سه ستاره مشخص شده) نشان می‌دهند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

یک‌صد ژن اول حاصل از این آنالیزDGEs که بیشترین کاهش بیان را داشتند. دقیقا مورد تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک قرار گرفت و از طریق آنالیز Gene Ontology عملکرد آنها مشخص گردید (جدول۴). مهمترین کار این گروه از ژن‌ها ساخت و نگهداری از بافت پوست و اپیتلیال می‌باشد و ژنهای سازنده کراتین مهمترین گروه را در آن میان تشکیل می‌دهند. بهمین علت شش عدد از مهمترین آنها برای ادامه آنالیز آزمایشگاهی انتخاب شدند. این تحقیق در مرحله دوم با انجام تست qPCR بر روی نمونه‌های پوست افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی ادامه پیدا کرد. تست qPCR روی نمونه حاصل از عصاره‌های بافتی فوق با استفاده از ۶ عدد پرایمر مربوط به ژن‌های *KRTAP11-1* و *KRT33B* و *KRT85* و *KRT35* و *KRT86* و *KRT81* که در مرحله قبل شناسایی شده بودند انجام شد تا مقدار تغییرات بیان این ژن‌ها در زخم-های لیشمانیوز پوستی نسبت به پوست‌های سالم اندازه گیری شود. نتایج در شکل ۲ قابل مشاهده است. هر شش ژن در نمونه های لیشمانیوز پوستی کاهش بیان شدید و کاملا معنی دار داشتند. معنی داری کاهش بیان ژن‌های *RT33B* و *KRT35* و *KRT86* و *KRT81* بیش از سایرین بود. این نتایج تایید کننده نظریه کاهش تولید کراتین در پوست مبتلا به لیشمانیوز است که می‌تواند منجر به ترمیم دیرهنگام زخم‌های پوستی شود. به‌طور کلی کراتین قسمت عمده پروتئین‌های استخراج شده از پوست و ضمائم آن مثل مو و ناخن را تشکیل میدهد و میزان فعالیت ژن‌های تولیدکننده آن در پروسه ساخت و نگهداری از بافت‌های پوست و ماهیچه اهمیت زیادی دارند (۱۷). کاهش بیان آنها سلولها را در مقابل عوامل مخرب، آسیب پذیر ساخته و ترمیم سلول‌های آسیب دیده پوستی را به-تاخیر می‌اندازد. اخیراً مشخص شده که رشته‌های کراتین در پروسه سیگنالیگ سلولی و انتقال ویزیکول‌های داخل سلولی هم نقش مهمی دارند (۱۸). طبق نتایج تست DGEs انجام شده در نمونه‌های ما ۳۴ ژن از ۴۴ ژنی که در این نمونه ها برای ساخت کراتین فعال بودند با کاهش بیان شدید و معنی دار مواجه شده اند (جدول۲). بیان ژن‌های کد کننده کراتین تحت کنترل شدید بوده و با توجه به شرایط محیطی که بافت پوست در آن قرار دارد تغییر میکند، مقدار تولیدی کراتین در سلول‌های پوستی، اکثراً در مرحله رونویسی کنترل می‌گردد. مولکول‌های کراتین در سلول‌های اپیتلیال به‌عنوان پروتیین‌های سازنده اسکلت سلولی عمل می‌کنند. مولکول کراتین با ساختار محکمی که تولید می‌کند، تشکیل دهنده‌های اصلی چهار چوب سلول‌های اپیتلیال می‌باشند و کاهش تولید آنها آسیب جدی به استحکام بافت پوست رسانده و آن را در مقابل عوامل مخرب حساس می‌سازد (۱۷, ۲۲-۱۹). تحقیقات بافت شناسی نشان داده اند که انگل لیشمانیا در سلول‌های پوست موش موجب غیر فعال شدن سلول‌های کراتینوسیت شده و با کاهش کراتین پوست زمینه مناسب برای ایجاد زخم پوستی فراهم می‌شود (۲۳). تحقیقات زیادی در این باره بر روی پوست انسان انجام نگرفته است. آنالیزهای DGE و GO که در طی این تحقیق انجام گرفتند اطلاعات ارزشمندی در اختیار ما قرار دادند. این اطلاعات نشان می-دهد که یکی از علل اصلی ایجاد زخم‌های پوستی دیر بهبود یابنده در لیشمانیوز جلدی کاهش بیان ژنهای تولیدکننده کراتین مثل ژن‌های KRT84 و KRT33B و KRT81 و KRT35 میباشد و باید تحقیقاتی در مورد استفاده از آنها در جهت بهبود سریع تر و موثر تر زخم‌ها انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات بالا نشان می‌دهد که یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عوارض ناخواسته بیماری در لیشمانیوز جلدی، تغییرات در بیان ژن‌های کد کننده پروتیین‌های نگه دارنده پوست و عضلات، مخصوصا کراتین می‌باشد.این مقاله برگرفته از رساله دکترای اینجانب کاووس مومنی می‌باشد که با عنوان " آنالیز بیوانفورماتیک تغییرات بیان ژن در نمونه ضایعات پوستی مبتلایان به لیشمانیوز" با شناسه IR.IAU.TABRIZ.REC.1401.179 به تصویب "کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تبریز" رسیده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

منابع

1.Raghavendra P, Pullaiah T. Chapter 1 - Cellular and Molecular Diagnostics: An Introduction. In: Raghavendra P, Pullaiah T, editors. Advances in Cell and Molecular Diagnostics: Academic Press; 2018. p. 1-32.

2.(WHO) Who. Global report on neglected tropical diseases 2023 2023. Available from: https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1489232/retrieve.

3.organization(WHO) Wh. Leishmaniasis 2023 [Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=As%20of%202021%2C%20Leishmania%2DHIV,Africa%20and%20South%2DEast%20Asia.

4.Shirzadi MR. Cutaneous leishmaniasis (Salek) in Iran 2010. .Available from: https://health.mubabol.ac.ir/download/?id=3704.

5.Mahami-Oskouei M, Mohebali M, Spotin A, Alizadeh Z. A Review of effectual factors in the Pathogenesis of Leishmania Parasites. arumsj. 2018;18(3):279-97.

6.Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol. 1998;28(1):121-34.

7.Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. J Immunol. 2001;166(2):1141-7.

8.Norouzinezhad F, Ghaffari F, Norouzinejad A, Kaveh F, Gouya MM. Cutaneous leishmaniasis in Iran: Results from an epidemiological study in urban and rural provinces. Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2016;6:614-9.

9.(WHO) Who. Global leishmaniasis surveillance 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap2020. Available from: https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1367727/retrieve.

10.de Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. Am J Clin Dermatol. 2022;23(6):823-40.

11.Singhania A, Wilkinson RJ, Rodrigue M, Haldar P, O'Garra A. Transcriptomics in TB: the immune response and diagnosis. Nat Immunol. 2018;19(11):1159-68.

12.Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, Misic AM, Carvalho LP, Carvalho EM, et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. Sci Transl Med. 2019;11.(۵۱۹)

13.Page R, Stromberg A. Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments. TheScientificWorldJournal. 2011;11:1383-93.

14.Ouakad M, Bahi-Jaber N, Chenik M, Dellagi K, Louzir H. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in Leishmania major developmental stages. Parasitol Res. 2007;101(2):473-7.

15.system b-bm. Mic User Manual version 2.10.1. 2022.

16.Ampliqon. Taq DNA Polymerase 2x Master Mix 2022.

17.Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. J Anat. 2009;214(4):516-59.

18.Margiotta A, Bucci C. Role of Intermediate Filaments in Vesicular Traffic. Cells. 2016;5.(۲)

19.Blumenberg M, Paramio J. Transcriptional Regulation of Keratin Gene Expression. 2007. p. 93-109.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

20.Ho M, Thompson B, Fisk JN, Nebert DW, Bruford EA, Vasiliou V, et al. Update of the keratin gene family: evolution, tissue-specific expression patterns, and relevance to clinical disorders. Hum Genomics. 2022;16(1):1.

21.Sharma P, Alsharif S, Bursch K, Parvathaneni S, Anastasakis DG, Chahine J, et al. Keratin 19 regulates cell cycle pathway and sensitivity of breast cancer cells to CDK inhibitors. Sci Rep. 2019;9(1):14650.

22.McLean WH, Moore CB. Keratin disorders: from gene to therapy. Hum Mol Genet. 2011;20(R2):R189-97.

23.Gimblet C, Loesche MA, Carvalho L, Carvalho EM, Grice EA, Artis D, et al. IL-22 Protects against Tissue Damage during Cutaneous Leishmaniasis. PLoS One. 2015;10(8):e0134698.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]