

## بررسی بیان ژن های *CCL3*، *CCL4*، *CXCL8* در نوتروفیل های مواجهه یافته با انگل لیشمانیا اینفانتوم در محیط کشت سلولی

طاهره ناجی: دانشیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.

najitahere@yahoo.com

ارسلان همت زاده: دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.

arsalanhematt@yahoo.com

پوریا مولوی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

pooriamoulavi@yahoo.com

ساناز نوروزی: دانشجوی کارشناسی ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران. sayana.nrzi@gmail.com

\* بهروز صابری: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

B3hr0oz.saberi@gmail.com. (\*نویسنده مسئول)

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** مطالعات مختلف نشان می دهند که نوتروفیل ها در اثر محرک های انگلی می توانند کمواین های مختلف تولید کنند. این کمواین ها باعث فراخوانی لوکوسیت ها، نفوسیت های T، سلول های دندریتیکی، مونوسیت ها، سلول های کشنده طبیعی و نوتروفیل ها به محل عفونت می شوند. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن های *CCL3*، *CCL4*، *CXCL8* در نوتروفیل های مواجهه یافته با انگل لیشمانیا اینفانتوم می باشد.

**روش کار:** طی این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از ۳۰ فرد سالم خونگیری شد و نوتروفیل های خون محیطی با استفاده از روش هیستوپاک -۱۰۷۷، دکستران و سانتریفیوژ جدا شدند. پس از انجام آزمون تعیین درصد زنده بودن و خلوص، سلول ها شمارش شدند. سپس این سلول ها با اشکال پروماستیگوت انگل لیشمانیا اینفانتوم که از بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور تهیه شده بود، در فاز ایستا مجاور شد و در انکوباتور CO<sub>2</sub> به مدت یک ساعت انکوبه شد، نوتروفیل های تحریک نشده به عنوان شاهد استفاده شدند. پس از استخراج RNA، RNA توسط مجموعه آنزیمی به cDNA تبدیل شد. از cDNA برای انجام Real Time PCR استفاده شد. ژن های انتخاب شده، ژن کمواین های *CCL3*، *CCL4*، *CXCL8* بوده و از  $\beta$ -Actin هم به عنوان ژن فرانس استفاده شد و سپس توسط روش آماری ANOVA تغییر بیان ژن ها بررسی شد.

**یافته ها:** نتایج این تحقیق نشان دادند که بیان ژن *CXCL8* در نوتروفیل های مواجهه یافته با انگل لیشمانیا دچار افزایش معنا دار نسبت به نوتروفیل های شاهد گردید ( $p < 0.001$ ). از سویی بیان ژن های *CCL3* و *CCL4* در نوتروفیل های مواجهه با انگل لیشمانیا نسبت به نوتروفیل های شاهد بیانگر تغییر معناداری نگردید.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان می دهد که مواجهه با انگل لیشمانیا سبب تغییری در بیان mRNA ژن های *CCL3*، *CCL4* در میان نوتروفیل های تحریک شده مشاهده نگردید اما باعث افزایش بیان بالایی از *CXCL8* گردید. بر این مبنای، اندازه گیری بیان ژن *CXCL8* می تواند به عنوان معیاری جهت تشخیص ابتلا به انگل لیشمانیا مطرح باشد.

کلیدواژه ها: لیشمانیا، نوتروفیل، *CCL3*، *CCL4*، *CXCL8*

### مقدمه

تاژک دیده می شود (۴). بیماری لیشمانیوز به صورت عمده به ۳ شکل بالینی: جلدی، جلدی-مخاطی و احشایی بروز می کند (۵). ۹۰ درصد از موارد سالک جهان از کشورهای افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، پرو، عربستان و سوریه گزارش می شود که در میان این کشورها ایران و عربستان سعودی بیشترین میزان شیوع بیماری مذکور دارا می باشند (۶). کالا آزار فرم احشایی و جدی ترین

لیشمانیوز یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که از طریق پشه خاکی از جنس لوتزمیا در آمریکا و فلوبوتوموس در آسیا و اروپا منتقل می شود (۱ و ۲). مخزن نهایی آن شامل انسان، سگ سانان و جوندگان نیز می باشد (۳). عامل بیماری تک یاخته ای به نام لیشمانیا که برحسب زندگی خود به دو شکل تاژک دار و بی

گلبول‌های سفید در گردش خون واسطه اولین مراحل پاسخ‌های التهابی هستند و نخستین خط دفاعی در برابر عوامل عفونی و یا مواد بیگانه که از موانع فیزیکی بدن عبور کرده‌اند (۱۳). نوتروفیل‌ها در مغز استخوان تولید می‌شوند و از رده مشترکی با فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای منشأ می‌گیرند (۱۴ و ۱۵). نوتروفیل‌ها اولین سلول‌های ضد میکروبی مؤثر بوده و توانایی از بین بردن پاتوژن‌های مهاجم را دارند و برای تحقق این امر نوتروفیل‌ها دارای مجموعه‌ای از مکانیسم‌های میکروب‌کشی هستند (۱۶، ۱۷ و ۱۸). مطالعات حاکی از آن است که نوتروفیل‌ها دارای یک مکانیسم ضد باکتریایی به نام (Neutrophil Extracellular Traps (NETs) هستند که وظیفه آن‌ها به دام انداختن و کشتن باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد (۱۳). در ادامه مشخص شده است که نوتروفیل‌ها انگل لیشمانیا را توسط مسیر مستقل از اپسونین فاگوسیتوز می‌کنند (۱۹) و همین‌طور نوتروفیل‌ها پس از قرار گرفتن در معرض لیشمانیا، می‌توانند چندین سایتوکاین را ترشح کنند (۲۰). مطالعات بیانگر آن می‌باشند که در موش‌های مقاوم تحریک ماکروفاژها باعث تولید اینترلوکین-۱۲ و در نتیجه تولید بیشتر اینترفرون گاما شده و باعث سرکوبی انگل می‌شود (۲۱). بررسی‌ها نشان می‌دهند که کموکاین‌ها نقش مهمی در فعال کردن ایمنی ذاتی و اکتسابی علیه لیشمانیوز جلدی بر عهده دارند (۲۲). پژوهش‌ها بیانگر آنند که عفونت اولیه با لیشمانیا تولید کموکاین CXCL8، باعث تقویت در به‌کارگیری نوتروفیل‌ها در جایگاه عفونت می‌شوند (۲۳) و همین‌طور مطالعات نشان می‌دهد که بزاق پشه خاکی باعث القا بیان CCL2 می‌شود که این کموکاین اثر کموتاکتیک بر روی ماکروفاژها دارد (۲۴) پژوهش‌ها نشان می‌دهند که توانایی القای فعالیت ضد لیشمانیایی در ماکروفاژها توسط CCL2 بوده (۲۵) و همین‌طور کموکاین‌های CXCL9 و CXCL10 در پاسخ ایمنی علیه عفونت با لیشمانیا مؤثر می‌باشند (۲۶). علاوه بر این ماکروفاژهای انسانی توسط لیشمانیا اینفانتوم باعث تنظیم منفی در تولید رسپتور کموکاینی CCR1 می‌شود که این رسپتور به‌صورت بالقوه در

فرم لیشمانیوز است که اگر درمان نشود باعث مرگ می‌گردد (۷). عامل بیماری در منطقه مدیترانه‌ای از جمله ایران به‌طور غالب لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد (۸ و ۹). لیشمانیا اینفانتوم نخستین بار از نمونه بیماران لیشمانیوز احشایی مغز استخوان جدا شد که لیشمانیوز احشایی یک عفونت سیستمیک است که باعث تب نامنظم، کاهش وزن، بزرگ شدن طحال و کبد و کاهش عناصر سلولی می‌شود (۱۰ و ۱۱)؛ اما در لیشمانیوز جلدی، ضایعات شبیه به لکه‌های کمرنگ به نظر می‌رسد و اغلب شبیه جذام می‌باشد (۲). لیشمانیوز جلدی-مخاطی این بیماری در ابتدا شبیه لیشمانیوز پوستی ایجاد می‌شود اما سپس به‌صورت زخم‌بخش‌های پوستی - مخاطی حلق مثل سقف دهان و بینی و به‌ندرت اندام‌های تناسلی و مقعد پیشرفت می‌کند (۱۲). کموکاین‌ها خانواده بزرگی از سایتوکاین‌ها با ساختاری مشابه هستند که محرک جا به جایی لکوسیت‌ها و تنظیم‌کننده مهاجرت لکوسیت‌ها از خون به بافت می‌باشند. بعضی از کموکاین‌ها ممکن است در پاسخ به تحریک التهابی توسط سلول‌های مختلف تولید شوند، سایر کموکاین‌ها به‌طور طبیعی در بافت‌های مختلف تولید می‌شوند و لکوسیت‌ها را در غیاب التهاب به این بافت فرا می‌خوانند. کموکاین‌های زیر خانواده CC (CCL3, CCL4) و CXC (CXCL8) توسط لکوسیت‌ها و انواع متعددی از سلول‌های بافتی نظیر سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های اپی‌تلیال و فیبروبلاست‌ها تولید می‌شوند. CCL3(MIP-1 $\alpha$ ) دارای گیرنده‌های کموکاینی CCR1 و CCR5 نیز می‌باشد که عملکرد عمده آن فراخوانی لکوسیت‌ها نیز می‌باشد همچنین CCL4(MIP-1 $\beta$ ) دارای گیرنده CCR5 بوده و به‌طور عمده در فراخوانی سلول‌های T، سلول‌های دندریتیک، مونوسیت‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی در محل عفونت نقش دارند و CXCL8(IL-8) دارای گیرنده‌های کموکاینی CXCR1 و CXCR2 می‌باشد و در فراخوانی نوتروفیل‌ها در محل عفونت نقش دارد (۱۸ و ۲۲). نوتروفیل‌ها که لکوسیت‌هایی با هسته چندشکلی می‌باشند، فراوان‌ترین گروه از

سالم خون‌گیری شد. سپس محیط کشت مایع RPMI1640(Gibco-us) خریداری شد و به همراه ۲۰-۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر تکمیل گردید. نمونه انگل نگهداری شده در تانک ازت از بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور تهیه شد و این انگل به محیط کشت NNN انتقال داده شد. انگل‌های روز هفتم (در فاز لگاریتمی) جهت پاساژ دادن استفاده شد. برای این کار محیط کشت RPMI به کشت اضافه گردید. به منظور استخراج نوتروفیل، ابتدا ۷ سی‌سی از فایکول که در دمای محیط بوده را در فالكون ۵۰ میلی‌لیتر ریخته، سپس ۱۰ سی‌سی خون محیطی به فایکول اضافه شد. این فالكون در سانتیفریوژ دور ۲۰۰۰ در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از اتمام سانتیفریوژ حلقه حاصله ما بین دو فاز تشکیل شده که شامل لنفوسیت‌ها بود و آن را به آرامی و با دقت جدا کرده و با RPMI شستشو داده شد. سپس مایع رویی خالی گردید و هم حجم خون باقی مانده RPMI و دکستران را که به نسبت مساوی مخلوط شده بودند، اضافه گردید. فاز بالایی که RBC بود را جدا کرده و با RPMI شستشو داده شد.

سلول‌ها به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه اول: شاهد-تحریک نشده با *CXCL8*. گروه دوم: تحریک شده با *CXCL8*. گروه سوم: شاهد-تحریک نشده با *CCL3*. گروه چهارم: تحریک شده با *CCL3*. گروه پنجم: شاهد-تحریک نشده با *CCL4*. گروه ششم: تحریک شده با *CCL4*. از ۳۰ فرد سالم خون‌گیری شد و نوتروفیل‌های خون محیطی با استفاده از HISTOPAQUE- (Sigma – Aldrich) 1077، دکستران و سانتیفریوژ جدا شد. پس از انجام آزمون تعیین درصد زنده بودن و خلوص، سلول‌ها با لام ویژه نئوبار شمارش شد. سپس این سلول‌ها با اشکال پروماستیگوت انگل در فاز ایستا که توسط روش تشخیص میکروسکوپی معین گردید، مجاور شد و در انکوباتور CO<sub>2</sub> به مدت یک ساعت انکوبه شد نوتروفیل‌های تحریک نشده به عنوان کنترل

به‌کارگیری ماکروفاژها در بافت آلوده نقش دارد که بیان کموکاین‌ها و گیرنده‌های کموکاینی توسط میزبان آلوده با انگل لیثمانیا باعث توانایی میزبان در مهار کردن انگل و ایجاد یک پاسخ ایمنی مؤثر می‌گردد. علاوه بر این کموکاین‌ها می‌توانند به واسطه استخدام جمعیت سلول‌های فعال در سیستم ایمنی، ایمنی با واسطه سلول را افزایش داده و این یک خاصیت ضد انگلی می‌باشد (۳۸).

برخلاف بسیاری از یافته‌ها، مطالعات بیانگر آن می‌باشند که ماست سل‌ها و آنتی‌بادی‌ها به‌تنهایی و بدون دخالت سیستم ایمنی سلولی نقش حفاظتی در برابر انگل ندارند (۲۷ و ۲۸). از سویی دیگر برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در صورت سرکوب سلول‌های کشنده طبیعی معمولاً اینترفرون گاما کمتری تولید شده و در نتیجه موش‌های مقاوم به عفونت حساسیت بیشتری پیدا می‌کنند (۲۹ و ۳۰). همچنین، مطالعات دیگر بیانگر آن بودند که خوردن نوتروفیل‌های آلوده آپوپتوتیک (غیر زنده) توسط ماکروفاژها یک راه برای ورود لیثمانیا به داخل ماکروفاژ است (۲۴) و از طرفی برخی دیگر از مطالعات نشان داده‌اند که علاوه بر این، عفونت ماکروفاژهای انسانی توسط لیثمانیا اینفانتوم باعث تنظیم منفی در تولید رسپتورهای کموکاینی CCR1 نیز می‌شوند (۳۱).

از آن جا که بیماری لیثمانیوز در اروپای جنوبی و کشورهای حاشیه اقیانوس‌ها و دریاها شیوع قابل توجهی دارد (۳۲) و باعث بروز علائم بالینی می‌گردد (۳۳) و با توجه به وجود موارد ضد نقیض در خصوص بیان کموکاین‌های *CCL3*، *CCL4*، *CXCL8* در مواجهه با لیثمانیا اینفانتوم (۲۴، ۲۶، ۲۳ و ۳۱) و همچنین مطالعات محدود در حیطه تحقیق؛ بنابراین، پژوهش حاضر به بررسی بیان کموکاین‌های *CXCL8*، *CCL4*، *CCL3* تولید شده توسط نوتروفیل‌ها در مواجهه یافته با انگل لیثمانیا اینفانتوم می‌پردازد. نتایج حاصل از این پژوهش در حوزه درمان بیماری لیثمانیوز اهمیت دارد.

## روش کار

طی این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از ۳۰ فرد

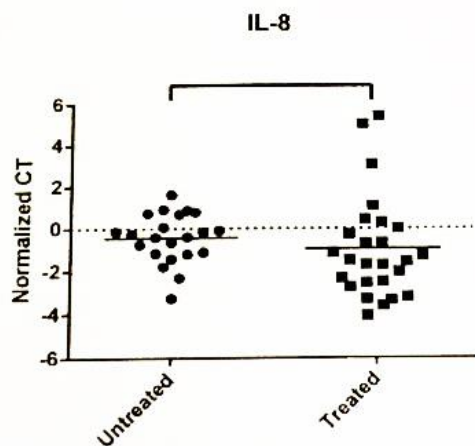
جدول ۱- پرایمر های مورد استفاده برای بیان ژن های B-Actin, CCL3, IL-8, MIP-1β همراه با توالی (۳۱ و ۳۲)

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR
B-Actin	B-Actin For	GATGGTGGGAATGGGTGAGA	233
	B-Actin Rev	GGGTGATCTTTTCACGGTTGG	
CCL3	CCL3 F	AGTTCTCTGCATCACTTGCTGCTGAC	139
	CCL3 R	TCTTCGCTTGGTTAGGAAGATGACAC	
IL-8	IL-8 For	CTGGCCGTGGCTCTCTTGG	125
	IL-8 Rev	GGGTGGAAGGTTGGAGTATGTC	
MIP-1β	MIP For	TAGTAGCTGCCTTCTGCTCTCCAG	112
	MIP Rev	TCTACCACAAAGTTGCGAGGAAGC	

معنی دار بین این دو گروه است یعنی انگل باعث تحریک تولید CCL3 نشده است. نمودار ۳ میانگین برای نمونه های تحریک شده ۶/۱ و برای نمونه های تحریک نشده ۵/۶ است که دار بین این دو گروه است یعنی انگل باعث تحریک تولید CCL4 نشده است.

### بحث و نتیجه گیری

یافته ها نشانگر آن می باشد که تغییری در بیان



نمودار ۱ - CT نمونه های تحریک شده و تحریک نشده برای CXCL8 می باشد. داده ها حاصل از تجربیات بر روی انگل لیشمانیا اینفانتوم می باشد که با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند.

استفاده شدند. پس از استخراج RNA با استفاده از کیت QIAzol Lysis Reagent (شرکت سیناژن)، RNA توسط مجموعه آنزیم Mulv-M و RNase inhibitor و Random hexamer به cDNA تبدیل شد. از cDNA برای انجام Real Time PCR استفاده شد.

ارزیابی بیان ژن توسط SYBR® Premix tag II (شرکت تاکارا) صورت گرفت که از رنگ SYBR greenI جهت شناسایی تکثیر محصول PCR استفاده شد. ژن های انتخاب شده ژن کموکاین های CXCL8, CCL4, CCL3 و از β-Actin هم به عنوان ژن رفرانس استفاده شد و جهت مقایسه آماری بین گروه ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه استفاده گردید.

### یافته ها

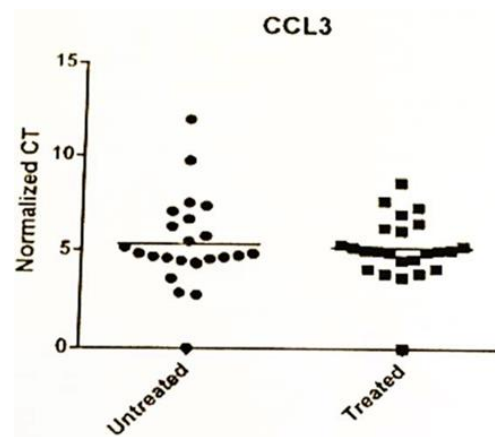
نمودار ۱ میانگین برای نمونه های تحریک شده ۰/۹۵- و برای نمونه های تحریک نشده ۰/۴۳- است که آنالیز آماری نشان دهنده اختلاف معنی دار بین این دو گروه است یعنی انگل باعث تحریک تولید IL-8 شده است (p < ۰/۰۱۷).

نمودار ۲ میانگین برای نمونه های تحریک شده ۵/۱۴ و برای نمونه های تحریک نشده ۵/۳۴ است که آنالیز آماری نشان دهنده عدم وجود اختلاف

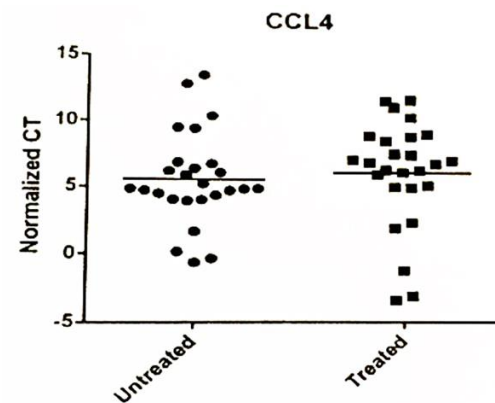
لیشمانیا مشاهده نشد؛ اما نوتروفیل‌ها بیان بالایی از *CXCL8* بعد از مواجهه با لیشمانیا نشان دادند. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهند که کموکاین *CXCL8* در مواجهه با انگل لیشمانیا اینفانتوم بیان می‌شود. در این راستا تحقیقات بیانگر آن هستند که عفونت اولیه با لیشمانیا تولید کموکاین *CXCL8* باعث تقویت در بکارگیری نوتروفیل‌ها در جایگاه عفونت می‌شوند (۲۳). هم چنین مطالعات مختلف نشان داده که بیان کموکاین و گیرنده‌های کموکاینی توسط میزبان آلوده با انگل لیشمانیا باعث توانایی میزبان در مهار کردن انگل می‌شود (۳۱). دیگر یافته‌ها بیانگر آنند که علاوه بر *CXCL8*، *CCL2* و *CCL3* نیز اثر کموتاکتیک بر روی ماکروفاژها دارد (۲۴). هم چنین مطالعات در *in vitro* نشان می‌دهند که عفونت با انگل لیشمانیا دونووانی باعث تنظیم بالای کموکاین‌های *MIP-1 $\alpha$* ، *MIP-1 $\beta$*  و *CCL5* همراه با رسپتورهای یعنی *CCR5* در ماکروفاژهای انسانی می‌شود (۳۴). حذف ژن‌های *CCR5* و *MIP-1 $\alpha$*  در موش مبتلا به انگل لیشمانیا دونووانی با افزایش تولید اینترفرون گاما و همچنین کاهش فشار بار انگل در طحال و کبد بعد از ۸ هفته از عفونت همراه می‌شود (۳۹). علاوه بر این نشان داده شده که در مدل موشی آلوده به لیشمانیا ماژور یک تنظیم مثبت برای تولید *CCL7* ایجاد می‌شود (۳۵).

مطالعه ای دیگر نتایج متناقضی بدست آمده است، در این مطالعه با حذف *MIP-1 $\alpha$*  مقاومت بیشتری ایجاد شده که ممکن است سویه‌های موش‌های انتخاب شده در این تناقض نقش داشته باشند. به نظر می‌رسد *MIP-1 $\alpha$*  نقش مهمی در محدود نگه داشتن بار انگل در فاز اولیه عفونت و همچنین تولید سایتوکاین‌های ضد لیشمانیایی محیطی داشته باشد اما ممکن است در مراحل بعدی مزمن شدن عفونت به لیشمانیا دونووانی زیان آور باشد (۴۰ و ۴۱). هم چنین مطالعات حاکی از آن می‌باشند که در مدل موشی مقاومت در برابر لیشمانیا به پاسخ‌های *Th1* دیده شده است (۳۶).

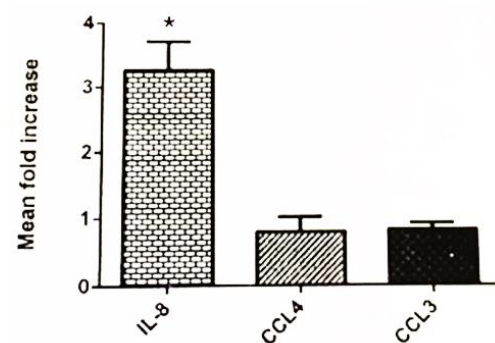
از نظر مکانیسم احتمالی می‌توان گفت با توجه به فعالیت ضد لیشمانیایی با میانجیگری



نمودار ۲ - CT نمونه‌های تحریک شده و تحریک نشده برای *CCL3* می‌باشد. داده‌ها حاصل از تجربیات بر روی انگل لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد که با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند.



نمودار ۳ - CT نمونه‌های تحریک شده و تحریک نشده برای *CCL4* می‌باشد. داده‌ها حاصل از تجربیات بر روی انگل لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد که با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند.



نمودار ۴ - این نمودار مقایسه میزان تغییرات سه ژن *CCL3*، *CCL4*، *IL-8* را نشان می‌دهد. داده‌ها حاصل از تجربیات بر روی انگل لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد که با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند. علائم \* شامل می‌باشد که نشانگر  $P < 0.0017$  می‌باشد.

mRNA ژن‌های *CCL3*، *CCL4* در میان نوتروفیل‌های تحریک نشده و تحریک شده با

leishmanial activity. *Phytomedicine*; 2005.12(6-7):514-35.

6. Mohebbali M, Yaghoobi P, Hooshmand B, khamesipour A. Efficacy of paromomycin ointment prepared In Iran (paromo-u) against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in mouse model. *Iran J Dermatol*; 2004. 26:88-94. [Persian].

7. Mahmoudzadeh-Niknam H, Abrishami F, Doroudian M, Moradi M, Alimohammadian MH, Parvizi P. Complete conservation of an immunogenic gene (*Icr1*) in *Leishmania infantum* and *Leishmania chagasi* isolated from Iran, Spain and Brazil. *J Vector Borne Dis*; 2010.47(4):204-10. [Persian].

8. Hashemi-Nasab A, Zadeh-Shirazi H. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fars Province, Iran: study of 130 cases. *J Trop Med Hyg*; 1980.83(3):119-22. [Persian].

9. Edrisian GH, Nadim A, Alborzi A, Ardehali S. Visceral leishmaniasis: the iran experience. *Arch Irn Med*; 1981:22-260. [Persian].

10. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*; 2004.173(11):6521-5.

11. Kone AK, Niare DS, Thera MA, Kayentao K, Djimde A, Delaunay P, et al. Epidemiology of the outbreak, vectors and reservoirs of cutaneous leishmaniasis in Mali: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med*; 2016.9(10):985-990.

12. Weigle KA, de Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg*; 1987.36(3):489-96.

13. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*; 2007.5(8):577-82.

14. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 2011.11(8):519-31

15. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*; 2011.12(11):1035-44

16. Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of *Maxadilan* and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol*; 2003.25(3):127-34.

17. el Hassan AM, Ghalib HW, Zijlstra EE, Eltoun IA, Satti M, Ali MS, et al. Post kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: clinical features, pathology and treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 1992.86(3):245-8.

18. Abolabbas A, Likhtman A, Pillai S, Keihani A,

کموکاین‌ها در *in vitro* و *in vivo* آلوده به لیشمانیا دونووانی بررسی شده است، ماکروفاژهای ابتدایی به وسیله کموکاین‌های  $MIP-\alpha$ ،  $CCL2$  از طریق القای واکنش‌های تنفسی و نیتریک اکساید باعث کاهش فرم آماستیگوت لیشمانیا دونووانی کنترل می‌شوند. نظیر همین مکانیسم در ماکروفاژهای آلوده انسانی در لیشمانیا اینفانتوم دیده می‌شود (۳۷).

این مطالعه در حیطه بررسی بیان کموکاین‌های  $CXCL8$ ،  $CCL3$ ،  $CCL4$  تولید شده توسط نوتروفیل‌ها در مواجهه با انگل لیشمانیا اینفانتوم انجام گرفته و تفسیر نتایج بر مبنای تغییر بیان ژن صورت پذیرفته است.

نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه با انگل لیشمانیا سبب تغییری در بیان mRNA ژن‌های  $CCL3$ ،  $CCL4$  در میان نوتروفیل‌های تحریک شده مشاهده نگردید اما باعث افزایش بیان بالایی از  $CXCL8$  گردید. بر این مبنای یافته این پژوهش از نظر بررسی اثرات انگل لیشمانیا بر عملکرد نوتروفیل‌ها از نظر تغییر بیان ژن‌های کموکاین حایز اهمیت بوده، اما از نظر بالینی و تشخیص‌های آزمایشگاهی نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

از زحمات تمام عزیزانی که ما را در تهیه این مقاله یاری کردند سپاس گزاریم.

### منابع

1. Goldman L, Bennet JC, Plum F. Cecil text book of medicine. 21st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. P. 1958-1963.
2. Rostami N, Dorghi M. Medical parasitology (protozoology). Tehran: Tehran University of medical Science Publishers; 2005. P. 308-361 [Persian].
3. Modabber F. First generation leishmaniasis vaccine clinical development: moving but what next? *Curr Opin Anti - Infect Invest Drug*; 1992.12:35-39.
4. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular trap kill bacteria. *Science*; 2004.303(5663):1532-1535.
5. Rocha LG, Almeida JR, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with anti

- al. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. *Acta Trop*; 2015.148:115-9
34. Bhattacharyya S, Dey R, Majumder N, Bhattacharjee S, Majumdar S. A novel approach to regulate experimental visceral leishmaniasis in murine macrophages using CCR5 siRNA. *Scand J Immunol*; 2008.67(4):345-53.
35. Katzman SD, Fowell DJ. Pathogen-imposed skewing of mouse chemokine and cytokine expression at the infected tissue site. *J Clin Invest*; 2008.118(2):801-11.
36. Aoun K, Chahed MK, Mokni M, Harrat Z, Bouratbine A. Importance of amastigote forms morphology to differentiate *Leishmania infantum* and *Leishmania major* species. *Arch Inst Pasteur Tunis*; 2003.80(1-4):53-6.
37. Mannheimer SB, Hariprashad J, Stoeckle MY, Murray HW. Induction of macrophage antiprotozoal activity by monocyte chemotactic and activating factor. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 1996.14(1):59-61.
38. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*; 2007.85(2):138-47.
39. Sato N, Ahuja SK, Quinones M, Kostecki V, Reddick RL, Melby PC, et al. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J Exp Med*; 2000.192(2):205-18.
40. Rosas LE, Barbi J, Lu B, Fujiwara Y, Gerard C, Sanders VM, et al. CXCR3<sup>-/-</sup> mice mount an efficient Th1 response but fail to control *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*; 2005.35(2):515-23.
41. Rousseau D, Demartino S, Anjuère F, Ferrua B, Fragaki K, Le Fichoux Y, et al. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. *Eur Cytokine Netw*; 2001.12(2):340-7.
- Mohammadi M. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Arjmand; 2010. p. 380-430
19. Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*; 2002.70(2):826-35.
20. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*; 2001.487(3):318-22.
21. Weigel MM, Armijos RX, Zurita C, Racines J, Reddy A, Mosquera J. Nutritional status and cutaneous leishmaniasis in rural Ecuadorian children. *J Trop Pediatr*; 1995.41(1):22-8.
22. Ritter U, Körner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*; 2002.24(6):295-301.
23. van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania promastigotes* release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun*; 2002.70(8):4177-84.
24. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*; 2002.169(2):898-905.
25. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*; 2000.404(6776):407-11.
26. Bogitsh BJ, Carter C, Oeltmann TN. *Human Parasitology*. 3th ed. Elsevier academic press; 2005. P. 104.
27. Hatam G, Ardahani S. The methods isolation and characterization of leishmania parasite. Shiraz: Shiraz University of medical science publishers; 2005. P.12-15. [Persian].
28. Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol*; 1995;49:239-76.
29. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 2007;37(12):3424-34.
30. Bogdan C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*; 2012. 29(2):69.
31. Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol*; 2010.126(3):389-96.
32. Maia C, Cardoso L. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet Parasitol*; 2015.213(1-2):2-11
33. Leça Júnior NF, Guedes PE, Santana LN, Almeida Vdos A, Carvalho FS, Albuquerque GR, et





## Evaluation of gene expression CXCL8, CCL4, CCL3 chemokines in neutrophils exposed to *Leishmania infantum* in cell culture

**Tahereh Naji**, Associate Professor, Department of Cell & Molecular Sciences, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran. najiitahere@yahoo.com

**Arsalan Hematzadeh**, MSc student of Department of Cell & Molecular Sciences, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran. arsalanhematt@yahoo.com

**Pooria Moulavi**, MSc Student of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University of North Tehran, Tehran, Iran. pooriamoulavi@yahoo.com

**Sanaz Noroozi**, Student of Genetic, Department of Genetic, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Mazandaran, Iran. sayana.nrzi@gmail.com

**\*Behrooz Saberi**, MSc Student of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Mazandaran, Iran (\*Corresponding author). B3hr0oz.saberi@gmail.com

### Abstract

**Background:** Studies have shown that neutrophils in effect by parasitic triggers can produce many different chemokines. These chemokines are called leukocytes, T lymphocytes, dendritic cells, monocytes, lethal cells and neutrophils to the site of infection. The aim of this study is to investigate the expression of neutrophils exposure with *leishmania infantum*.

**Methods:** During this experimental-laboratorial study the blood was collected from 30 healthy individuals. Peripheral blood neutrophils were isolated by HYSTOPAQUE 1077, dextran and centrifuge. Then cells were exposed to the promastigote forms of the *Leishmania infantum* parasite, which was prepared from the immunology department of the Pasteur Institute in stationary phase and was incubated for one hour in CO<sub>2</sub> incubator, not stimulated neutrophils were used as control. After extracting RNA, RNA was converted to cDNA by enzyme complex. cDNA was used for Real Time PCR. Selected gene been gene of CCL3, CCL4 and CXCL8 chemokines and  $\beta$ -Actin was used as references gene and then gene expression change was evaluated by ANOVA statistical methods.

**Results:** The results indicated that CXCL8 gene expression were significantly increased in the face of leishmania compared to control neutrophils ( $p < 0.001$ ). On the other hand CCL3 and CCL4 genes expression weren't significant change in the face of leishmania compared to the control neutrophils.

**Conclusion:** The results show that exposure with leishmania parasite caused no change in expression of CCL3 and CCL4 mRNA genes among of simulation neutrophils but lead to increases high expression of CXCL8. On this basis measuring of CXCL8 can consider as a criterion for detecting leishmania infection level.

**Keywords:** Leishmania, Neutrophils, CCL3, CCL4, CXCL8