# بررسی بیان ژن‌های *CXCL8*، *CCL4*، *CCL3* در نوتروفیل‌های 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.
najiitahere@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
(*نویسنده مسئول). B3hr0oz.saberi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۲

**چکیده**

**زمینه و هدف:** مطالعات مختلف نشان می‌دهند که نوتروفیل‌ها در اثر محرک‌های انگلی می‌توانند کموکاین‌های مختلف تولید کنند. این کموکاین‌ها باعث فراخوانی لوکوسیت‌ها، لنفوسیت‌های T، سلول‌های دندریتیکی، مونوسیت‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی و نوتروفیل‌ها به محل عفونت می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های *CXCL8*، *CCL4*، *CCL3* در نوتروفیل‌های مواجهه یافته با انگل لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد.

**روش کار:** طی این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از ۳۰ فرد سالم خونگیری شد و نوتروفیل‌های خون محیطی با استفاده از روش هیستوپاک -۱۰۷۷، دکستران و سانتریفیوژ جدا شدند. پس از انجام آزمون تعیین درصد زنده بودن و خلوص، سلول‌ها شمارش شدند. سپس این سلول‌ها با اشکال پروماستیگوت انگل لیشمانیا اینفانتوم که از بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور تهیه شده بود، در فاز ایستا مجاور شد و در انکوباتور $CO_2$ به مدت یک ساعت انکوبه شد، نوتروفیل‌های 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. ژن‌های انتخاب شده، ژن کموکاین‌های CCL3، CCL4، CXCL8 بوده و از Actin– β هم به عنوان ژن رفرانس استفاده شد و سپس توسط روش آماری ANOVA تغییر بیان ژن ها بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان دادند که بیان ژن *CXCL8* در نوتروفیل‌های مواجهه یافته با انگل لیشمانیا دچار افزایش معنا دار نسبت به نوتروفیل‌های شاهد گردید (p< ۰/۰۰۱). از سویی بیان ژن‌های *CCL3* و *CCL4* در نوتروفیل‌های مواجهه با انگل لیشمانیا نسبت به نوتروفیل‌های شاهد بیانگر تغییر معناداری نگردید.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مواجهه با انگل لیشمانیا سبب تغییری در بیانmRNA ژن‌های CCL3,CCL4 در میان نوتروفیل های تحریک شده مشاهده نگردید اما باعث افزایش بیان بالایی از CXCL8 گردید. بر این مبنا، اندازه‌گیری بیان ژن CXCL8 می‌تواند به عنوان معیاری جهت تشخیص ابتلا به انگل لیشمانیا مطرح باشد.

**کلیدواژه‌ها**: لیشمانیا، نوتروفیل، CCL3، CCL4، CXCL8

## مقدمه

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 می‌شود (۱ و ۲). مخزن نهایی آن شامل انسان، سگ‌سانان و جوندگان نیز می‌باشد (۳). عامل بیماری تک‌یاخته‌ای به نام لیشمانیا که برحسب زندگی خود به دو شکل تاژک‌دار و بی تاژک دیده می‌شود (۴). بیماری لیشمانیوز به‌صورت عمده به ۳ شکل بالینی: جلدی، جلدی-مخاطی و احشایی بروز می‌کند (۵). ۹۰ درصد از موارد سالک جهان از کشورهای افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، پرو، عربستان و سوریه گزارش می‌شود که در میان این کشورها ایران و عربستان سعودی بیشترین میزان شیوع بیماری مذکور دارا می‌باشند (۶). کالا آزار فرم احشایی و جدی‌ترین

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

فرم لیشمانیوز است که اگر درمان نشود باعث مرگ می‌گردد (۷). عامل بیماری در منطقه مدیترانه‌ای ازجمله 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 زخم بخش‌های 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 لوکوسیت ها 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 لوکوسیت ها 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 اپی تلیال و فیبروبلاست ها تولید می‌شوند. CCL3(MIP-1α) دارای گیرنده‌های کموکاینی CCR1 و CCR5 نیز می‌باشد که عملکرد عمده آن فراخوانی لوکوسیت ها نیز می‌باشد همچنین CCL4(MIP-1β) 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 لوکوسیت‌هایی با هسته چندشکلی می‌باشند، فراوان‌ترین گروه از 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 ضدمیکروبی مؤثر بوده و توانایی از بین بردن پاتوژن‌های مهاجم را دارند و برای تحقق این امر نوتروفیل‌ها دارای مجموعه‌ای از مکانیسم‌های میکروب‌کشی هستند (۱۱،۱۶ و ۱۷). مطالعات حاکی از آن است که نوتروفیل‌ها دارای یک مکانیسم ضد باکتریایی به نام (Neurophil 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 ماکروفاژ های انسانی توسط لیشمانیا اینفانتوم باعث تنظیم منفی در تولید رسپتور کموکاینی CCR1 می‌شود که این رسپتور به‌صورت بالقوه در



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

به‌کارگیری ماکروفاژها در بافت آلوده نقش دارد که بیان کموکاین‌ها و گیرنده‌های کموکاینی توسط میزبان آلوده با انگل لیشمانیا 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 درنتیجه 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 لیشمانیا به داخل ماکروفاژ است (۲۴) و از طرفی برخی دیگر از مطالعات نشان داده‌اند که علاوه بر این، عفونت ماکروفاژهای انسانی توسط لیشمانیا اینفانتوم باعث تنظیم منفی در تولید رسپتورهای کموکاینی CCR1 نیز می‌شوند (۳۱).

از آن جا که بیماری لیشمانیوز در اروپای جنوبی و کشورهای حاشیه اقیانوس‌ها و دریاها شیوع قابل‌توجهی 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 لیشمانیا اینفانتوم (۲۳،۲۶،۲۴ و ۳۱) و همچنین مطالعات محدود در حیطه تحقیق؛ بنابراین، پژوهش حاضر به بررسی بیان کموکاین‌های CCL3، CCL4، CXCl8 تولید شده توسط نوتروفیل‌ها در مواجهه یافته با انگل لیشمانیا اینفانتوم می‌پردازد. نتایج حاصل از این پژوهش در حوزه درمان بیماری لیشمانیوز اهمیت دارد.

## روش کار

طی این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از ۳۰ فرد 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. به‌منظور استخراج نوتروفیل، ابتدا ۷ سی‌سی از فایکول که در دمای محیط بوده را در فالکون ۵۰ میلی‌لیتر ریخته، سپس ۱۰ سی‌سی خون محیطی به فایکول اضافه شد. این فالکون در سانتریفیوژ دور ۲۰۰۰ در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ حلقه حاصله ما بین دو فاز تشکیل شده که شامل لنفوسیت ها 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-1077(Sigma – Aldrich)، دکستران و سانتریفیوژ 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 $CO_2$ به مدت یک ساعت انکوبه شد نوتروفیل‌های تحریک نشده به عنوان کنترل



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

جدول ۱- پرایمر های مورد استفاده برای بیان ژن های B-Actin، CCL3، IL-8، MIP-1β همراه با توالی (۲۲و۳۱)

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

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 کموکاین‌های CCL3،CCL4،CXCL8 بوده 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.

## یافته‌ها

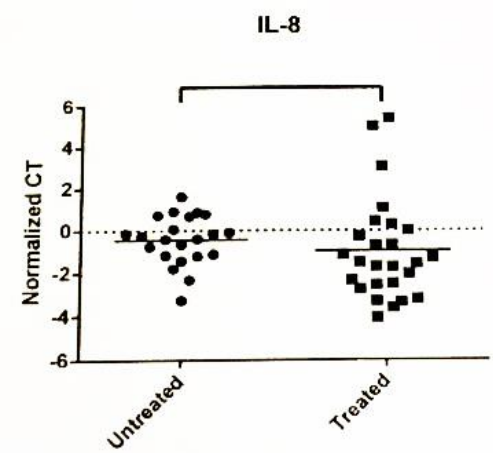
نمودار ۱ میانگین برای نمونه های تحریک شده ۰/۹۵- و برای نمونه های تحریک نشده ۰/۴۳- است که آنالیز آماری نشان دهنده اختلاف معنی دار بین این دو گروه است یعنی انگل باعث تحریک تولید IL-8 شده است (p<۰/۰۰۱۷).

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 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 آنالیز آماری نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین این دو گروه است یعنی انگل باعث تحریک تولید CCL4 نشده است.

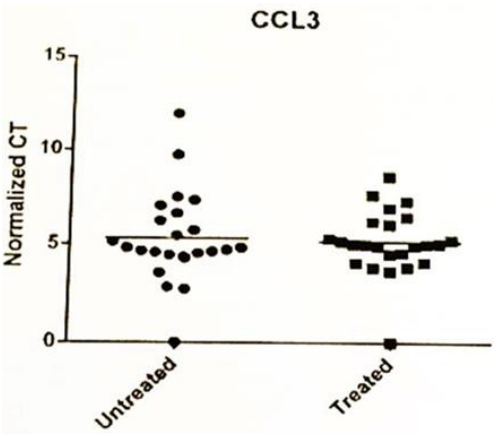
## بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشانگر آن می‌باشند که تغییری در بیان

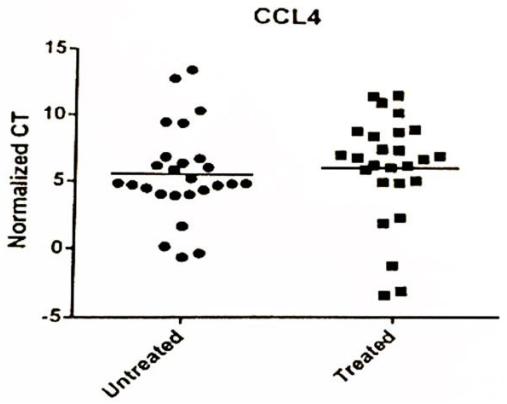



نمودار ۱ – CT نمونه های تحریک شده و تحریک نشده برای CXCL8 می باشد. داده ها حاصل از تجربیات بر روی انگل لیشمانیا اینفانتوم می باشد که با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند.

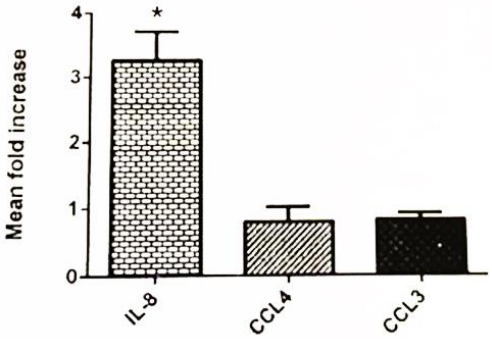
[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]




نمودار ۲ – CT نمونه های تحریک شده و تحریک نشده برای CCL3 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.




نمودار۳ – CT نمونه های تحریک شده و تحریک نشده برای CCL4 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.




نمودار ۴ – این نمودار مقایسه میزان تغییرات سه ژن CCL3، CCL4، IL-8 را نشان می دهد.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. علائم شامل * می باشد که نشانگر $P<0.0017$ می باشد.

mRNA ژن‌های CCL4،CCL3 در میان نوتروفیل‌های تحریک نشده و تحریک شده با 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 ماکروفاژ ها دارد (۲۴). هم چنین مطالعات در in vitro نشان می‌دهند که عفونت با انگل لیشمانیا دونووانی باعث تنظیم بالای کموکاین‌های MIP-1α، MIP-1β و CCL5 همراه با رسپتورش یعنی CCR5 در ماکروفاژهای انسانی می‌شود (۳۴). حذف ژن های CCR5 و MIP-1α 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-1α مقاومت بیشتری ایجاد شده که ممکن است سویه های موش‌های انتخاب شده در این تناقض نقش داشته باشند. به نظر می‌رسد MIP-1α نقش مهمی در محدود نگهداشتن 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 می توان گفت با توجه به فعالیت ضد لیشمانیایی با میانجیگری



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

کموکاین‌هـا در in vivo و in vitro آلـوده بـه لیشمانیا دونووانی بررسی شده است، ماکروفاژهـای ابتدایی به وسیله کموکاین‌های MIP-α، CCL2 از طریق القای واکنش های تنفسی و نیتریک اکساید باعث کاهش فرم آماسـتیگوت لیشـمانیا دونـووانی کنتـرل می‌شـوند. نظیـر همـین مکانیسـم در ماکروفاژهای آلوده انسـانی در لیشـمانیا اینفـانتوم دیده می‌شود (۳۷).

این مطالعه در حیطه بررسی بیان کموکاین‌هـای CXCL8،CCL3،CCL4 تولیـد شـده توسـط نوتروفیل‌ها در مواجهه با انگل لیشـمانیا اینفـانتوم انجام گرفته و تفسیر نتایج بر مبنای تغییر بیان ژن صورت پذیرفته است.

نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهـه بـا انگـل لیشمانیا سبب تغییری در بیـان mRNA ژن هـای CCL3,CCL4 در میـان نوتروفیل‌هـای تحریـک شده مشاهده نگردید اما باعث افزایش بیان بـالایی از CXCL8 گردید. بر این مبنا، یافته این پـژوهش از نظر بررسی اثـرات انگـل لیشـمانیا بـر عملکـرد نوتروفیل‌ها از نظر تغییـر بیـان ژن‌هـای کموکـاین حایز اهمیت بوده، اما از نظر بالینی و تشخیص‌های آزمایشگاهی نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

## تقدیر و تشکر

از زحمات تمام عزیزانی کـه مـا را در تهیـه ایـن 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 (protozeology). 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 leishmanial activity. Phytomedicine; 2005.12(6-7):514-35.

6. Mohebali 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 Dermato; 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 (lcr1) 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 irania 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, Eltoum 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,



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

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. 3thed. Elsevier adademic press; 2005. P. 104.

27. Hatam G, Ardahani S.The methodes 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 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-/- 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.

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

# 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 $co_2$ 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 β-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 neutrophilsbut 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

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]