مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و نهم، شماره یازدهم، بهمن ۱۴۰۰
تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۰۹/۰۹
تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۱۲/۱۰

# مقایسه الگوی بیان ژن‌های پیش التهابی در نوتروفیل‌های خون محیطی و طحال موش‌های BALB/c آلوده به لیشمانیا ماژور

حسین رضوان*[۱]، سحر هامون‌نورد[۱]، سهیلا اخزری[۱]

**مقاله پژوهشی**

**مقدمه:** بیماری لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده و هدف این مطالعه، الگوی بیان ژن‌های پیش التهابی در سلول‌های نوتروفیل و مقایسه آن با الگوی بیان این ژن‌ها در سلول‌های طحال در روند بیماری، جهت ارائه یک چارچوب استاندارد برای تشخیص مراحل مختلف بیماری و مراحل بهبود آن است.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، تعداد $۲\times۱۰^{۶}$ فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور به صورت داخل جلدی در ناحیه قاعده دم موش ماده نژاد BALB/c تزریق و پس از بروز زخم جلدی، حیوانات به گروه اول (کنترل) بدون درمان و گروه دوم تحت درمان با دارو گلوکانتیم به مدت سی روز و به صورت تزریق داخل زخمی تقسیم شدند، در پایان هفته دوم و هفته چهارم از درمان، بیان ژن سایتوکاین‌های IL-12p35، CCL3، CCL4، IL-12p40، TNF-α، CCL5، IL -1α، IL-1β، IFN-γ و CCR5 در سلول‌های نوتروفیل خون محیطی و سلول‌های طحال با استفاده از تکنیک PCR معمولی انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS version 16 و با آزمون‌های تی، آنالیز یک‌طرفه و توکی تحلیل شدند ($P <۰/۰۵$).

**نتایج:** در موش‌های آلوده به لیشمانیا، قبل از انجام درمان با دارو گلوکانتیم، ژن‌های IFN-γ، IL-1β، CCR5، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35 و در نوتروفیل‌های خون محیطی فقط IFN-γ در طحال بیان شد که با الگوی بیان ژن‌ها در گروه درمانی با گلوکانتیم متفاوت بود.

**نتیجه‌گیری:** سایتوکاین‌های IFN-γ, IL-12, TNF-α از فاکتورهای مهم در پاسخ ایمنی علیه انگل لیشمانیا بوده و عدم بیان این ژن‌ها در طی دوره عفونت به‌دنبال فقدان دریافت دارو استاندارد گلوکانتیم در موارد مبتلا می‌تواند موجب پیشرفت ضایعه زخم گردد.

**واژه‌های کلیدی:** لیشمانیا، نوتروفیل، طحال، ژن‌های پیش التهابی

**ارجاع:** رضوان حسین، هامون نورد سحر، اخزری سهیلا. **مقایسه الگوی بیان ژن‌های پیش التهابی در نوتروفیل‌های خون محیطی و طحال موش‌های BALB/c آلوده به لیشمانیا ماژور**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۱۱): ۸۰-۴۲۶۸.

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۸۱۳۴۲۲۷۴۷۵، ۰۹۱۸۷۱۰۳۷۴۵، پست الکترونیکی: h.rezvan@basu.ac.ir، صندوق پستی: ۶۵۱۷۶۵۸۹۷۸

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

## مقدمه

بیماری لیشمانیوز جلدی یا سالک یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است و بعد از مالاریا به‌عنوان یک معضل بهداشتی در جهان مورد توجه قرار گرفته است. عامل این بیماری، تک‌یاخته‌ای از گروه تاژکداران خانواده تریپانوزوماتیده و جنس لیشمانیا است که به‌وسیله نیش پشه‌های ناقل گونه‌های فلبوتوموس به انسان منتقل می‌شود. علایم این بیماری به صورت زخم‌هایی خشک یا مرطوب ظاهر می‌شوند که بعضاً ممکن است تا یک سال روی نقاطی از بدن از جمله دست، پا و صورت باقی بمانند. هم اکنون تعداد افراد مبتلا به این بیماری در جهان به بیش از ۱۲ میلیون مورد رسیده که این تعداد با وقوع بیماری‌هایی مانند ایدز و بحران‌های اجتماعی در مناطق آلوده در دهه‌های اخیر در حال افزایش بوده است (۱). در ایران حدود پانزده هزار نفر سالانه به سالک مبتلا می‌شوند و بر اساس تحقیقات موجود، میزان واقعی موارد آن ۴ تا ۵ برابر میزانی است که گزارش می‌شود به نحوی که میزان بروز بیماری در ایران ۲۸ در هر هزار نفر جمعیت تخمین زده می‌شود (۲). درمان‌های رایج در این بیماری استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان (پنتوستام و گلوکانتیم) است گرچه علی‌رغم تلاش‌های فراوان، تاکنون کنترل بیماری چندان موفقیت‌آمیز نبوده و درمان آن نیز در عمل با مشکلات متعددی ازجمله عدم پاسخ به درمان به علت مقاومت دارویی مواجه بوده است؛ به همین دلیل در سال‌های اخیر سازمان جهانی بهداشت بیماری لیشمانیوز را به عنوان یک بیماری گرمسیری فراموش شده مطرح کرده است (۳). یافته‌های ایمنی شناسی در لیشمانیوز عمدتاً از طریق مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی با استفاده از نژادهای خالص موش به‌دست آمده است. این یافته‌ها نشان داده‌اند که مقاومت به عفونت لیشمانیا به‌طور مشخصی با فعالیت لنفوسیت‌های Th1 ارتباط دارد (۴). در این راستا، سلامت سیستم ایمنی میزبان و نیز گونه انگل در سیر بیماری تعیین‌کننده می‌باشند (۵). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برای کنترل عفونت لیشمانیایی در میزبان، به‌وجود آمدن ایمنی سلولی مؤثر که قادر به فعال کردن ماکروفاژها باشد، مورد نیاز است (۵). با وجود این که پردازش و ارائه آنتی‌ژن توسط ماکروفاها صورت می‌گیرد ولی ایجاد پاسخ ایمنی به عهده لنفوسیت‌هایی است که در اعضایی مانند طحال و عقده‌های لنفاوی حضور دارند (۶). پژوهش‌ها نشان داده است که ژن‌های پیش التهابی نقش مهمی در چگونگی فعال شدن سیستم ایمنی و در نهایت از بین بردن عفونت لیشمانیایی به عهده دارند. فعال شدن ماکروفاژها توسط سایتوکاین IFN-γ صورت می‌گیرد. مکانیسم اصلی برای از بین بردن انگل در این سلول‌ها، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتریک اکسید است. به علاوه، IFN-γ که از لنفوسیت‌های T آزاد می‌شود تولید TNF-α را در ماکروفاژها تحریک می‌کند. بنابراین TNF-α واسطه شیمیایی در هر دو نوع پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی و عامل ارتباطی مهم بین پاسخ‌های ایمنی اکتسابی و التهاب حاد است (۶). پژوهش‌ها نشان داده است که بهبود عفونت ناشی از لیشمانیا در موش‌های مقاوم نظیر C57BL/6، در نتیجهٔ تولید سایتوکاین‌های فعال کننده ماکروفاژها به‌خصوص IFN-γ بوده که شاخصهٔ پاسخ ایمنی Th1 است. نابودی انگل‌های درون ماکروفاژ از طریق افزایش فعالیت ماکروفاژها و در نتیجه افزایش تولید نیتریک اکساید صورت می‌گیرد. در مقابل، حساسیت موش BALB/c به عفونت ناشی از لیشمانیا به علت تولید سایتوکاین‌های مهار کننده فعالیت ماکروفاژها نظیر IL-4 و IL-10 بوده که از مشخصه‌های پاسخ Th2 است (۷). در پژوهش‌های قبلی نشان داده شده است که نوتروفیل‌ها نقش مهمی در شناسایی، دریافت و انتقال انگل لیشمانیا به داخل ماکروفاژها دارند که این انتقال در روند پاتولوژی بیماری مؤثر است. از طرفی در موش‌های BALB/c، گسترش بیماری لیشمانیوز جلدی همواره با ورود انگل به طحال همراه بوده و نهایتا منجر به مرگ حیوان می‌گردد. بیان ژن‌های پیش التهابی در نوتروفیل‌های خون محیطی در بیماری لیشمانیازیس در پژوهش‌های قبلی ما نشان داده شده است (۸). از طرفی با توجه به بررسی محققان در زمینه اهمیت نوتروفیل‌ها در کنترل

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

عفونت لیشمانیا ماژور و توانایی این انگل در ممانعت از فرآیند هضم توسط نوتروفیل با داشتن آنزیم اندونوکلئاز، بررسی بیان پروفایل سایتوکاینی شاخص در این سلول‌ها می‌تواند در پیشبرد و دستیابی به نقش مهم سلول‌های ایمنی ذاتی و عوامل مترشحه از این سلول‌ها در کنترل عفونت لیشمانیا مهم بوده (۹) و حتی طبق بررسی محققان، نوع گونه لیشمانیا نیز می‌تواند بر عملکرد و نحوه برخورد نوتروفیل‌ها موثر باشد (۱۰). اما بیان ژن‌های پیش التهابی در طحال و مقایسه الگوی بیان این ژن‌ها در طحال با بیان این ژن‌ها در نوتروفیل‌های خون محیطی در بیماری لیشمانیازیس تا به حال مورد بحث قرار نگرفته است. لذا در این پژوهش ارتباط بین بیان ژن‌های پیش التهابی در نوتروفیل‌های خون محیطی و طحال موش‌های BALB/c آلوده به لیشمانیا در شرایط بدون درمان و درمان شده با داروی گلوکانتیم مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

## روش بررسی

### انگل لیشمانیا

سوش وحشی انگل لیشمانیا ماژور (MHOM/76/IR)، از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله در دمای ۲۵ °C کشت داده شد.

### تلقیح انگل

موش‌های بالغ ماده BALB/c با سن ۸ تا ۱۲ هفته از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران خریداری و به‌صورت کاملاً تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. انگل لیشمانیا در پاساژهای ۲-۴ به تعداد ۲ میلیون در ۱۰۰ میکرولیتر به هر موش و به‌صورت داخل جلدی در ناحیه قاعده دم تزریق گردید (۶). هیچ‌گونه درمانی در موش‌های گروه کنترل انجام نشد ولی موش‌های گروه دوم تحت درمان ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن داروی استاندارد (گلوکانتیم) به‌صورت روزانه و به شکل تزریق در محل زخم قرار گرفتند.

### جداسازی نوتروفیل

برای جداسازی نوتروفیل میزان ۱ میلی‌لیتر خون با مقدار مساوی سرم فیزیولوژی رقیق گردید. جهت ایجاد شیب غلظت جهت جداسازی سلول طبق توصیه پروتکل منبع اشاره شده از داروی مگلومین کامپاند ۷۶٪ (شرکت دارو پخش) استفاده شد. برای آماده‌سازی مگلومین، این دارو به نسبت حجمی ۳ به ۱ با سرم فیزیولوژی مخلوط گردید و خون رقیق‌شده به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ ($g$ ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه)، مایع رویی تخلیه و محلول ته لوله با حرکات دورانی و اضافه کردن ۴۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی همگن و سپس ورتکس گردید. برای لیز کردن گلبول‌های قرمز ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد و ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۲/۵۵٪ به ۱ میلی‌لیتر نمونه اضافه و نمونه‌ها سانتریفیوژ ($g$ ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) شدند؛ این مرحله تا جایی که محلول رویی کاملاً شفاف و فاقد گلبول قرمز باشد، تکرار شد. سپس تعداد نوتروفیل‌ها با روش متیلن‌بلو شمارش گردیده و سلول‌های جدا شده ($۴\times۱۰^{۶}$/ml) برای انجام آزمایش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱).

### نمونه‌گیری

پس از ایجاد زخم لیشمانیا در موش‌های آلوده از هر دو گروه، نمونه‌گیری از طحال و خون به منظور بررسی ژن‌های پیش التهابی در سه مرحله انجام شد؛ اولین نمونه‌گیری قبل از شروع درمان و سپس نمونه‌های بعدی در پایان هفته دوم و هفته چهارم اخذ گردید. جهت مقایسه و به‌عنوان کنترل دوم، نمونه‌های خون و طحال از موش‌های سالم نیز اخذ گردید. نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۸۰- °C قرار داده و تا زمان آزمایش در این دما نگهداری گردیدند.

### طراحی پرایمر

جهت ارزیابی صحت PCR، بیان ژن کنترل GAPDH برای تمام نمونه‌ها ارزیابی شد و ژن‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: IL-12p40، IL-12p35، IL-1β، IL-1α، CCR5، CCL5/RANTES، CCL4/MIP-1β، CCL3/MIP-1α، IFN-γ و TNF-α که پس از یافتن توالی ژن‌ها در بانک ژنی، با استفاده از نرم افزار طراحی پرایمر در سایت NCBI پرایمر مناسب برای هر ژن طراحی گردید. توالی کلیه پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن‌های پیش التهابی

| نام ژن پیش التهابی | طول باند (bp) | توالی (sequence) | دمای ذوب پرایمر (°C) |
|---|---|---|---|
| CCL3/MIP-1α | ۱۰۰ | F: 5'-TCTGCGCTGACTCCAAAGAG-3' | ۶۲ |
| | | R: 5'-GTGGCTATCTGGCAGCAAAC-3' | ۶۲ |
| CCL4/MIP-1β | ۱۰۰ | F:5'-CAGCCCTGATGCTTCTCACT-3' | ۶۲ |
| | | R: 5'-GGGAGACACGCGTCCTATAAC-3' | ۶۲ |
| CCL5/RANTES | ۱۰۰ | F: 5'-GTGCTCCAATCTTGCAGTCG-3' | ۶۲ |
| | | R: 5'-AGAGCAAGCAATGACAGGGA-3' | ۶۲ |
| CCR5 | ۱۰۰ | F: 5'-ATTCTCCACACCCTGTTTCG-3' | ۶۰ |
| | | R: 5'-GAATTCCTGGAAGGTGGTCA-3' | ۶۰ |
| lL-1α | ۱۰۰ | F: 5'-CAGTTCTGCCATTGACCATC-3' | ۶۰ |
| | | R: 5'-TCTCACTGAAACTCAGCCGT-3' | ۶۰ |
| IL-1β | ۱۰۰ | F: 5'-TTGACGGACCCCAAAAGATG-3' | ۶۰ |
| | | R: 5'AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3' | ۶۰ |
| IL-12p35 | ۱۰۰ | F: 5'-ATGATGACCCTGTGCCTTGG-3' | ۶۲ |
| | | R: 5'-CACCCTGTTGATGGTCACGA-3' | ۶۲ |
| IL-12p40 | ۱۰۰ | F: 5'-CTGCTGCTCCACAAGAAGGA-3' | ۶۲ |
| | | R: 5'-ACGCCATTCCACATGTCACT-3' | ۶۲ |
| TNF-α | ۱۰۰ | F: 5'-TATAAAGCGGCCGTCTGCAC-3' | ۶۲ |
| | | R: 5'-TCTTCTGCCAGTTCCACGTC-3' | ۶۲ |
| IFN-γ | ۱۰۰ | F: 5'-GCTCTGAGACAATGAACGCT-3' | ۶۰ |
| | | R: 5'-AAAGAGATAATCTGGCTCTGC-3' | ۶۰ |
| GAPDH | ۴۰۰ | F: 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3'<br>R: 5'-CACACCCATCACAAACATGG-3' | ۵۶ |

**استخراج** RNA

استخراج RNA با کیت تجاری استخراج RNA توتال (شرکت دنا زیست) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای جداسازی RNA از طحال، ۵۰ میلی‌گرم از بافت طحال در حمام اولتراسونیک هموژنیزه شده و ۱ میلی‌لیتر از محلول G1 موجود در کیت به آن اضافه و پیپیتنگ گردید. میکروتیوب در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس با دور g ۱۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحلهٔ بعد، مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شده و پس از اضافه شدن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفروم به آن، به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۲۰۰ سانتریفوژ شده و لایه رویی به

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

میکروتیوب جدید منتقل گردید. پس از اضافه شدن همان میزان ایزوپروپانول و محلول G2 موجود در کیت و پیپتنگ، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شده و سپس میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید و پس از حذف مایع رویی، مقدار ۱ میلی‌لیتر اتانول۷۰٪ به آن اضافه و پس از هم زدن، مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی کاملاً تخلیه شده و میکروتیوب در دمای آزمایشگاه تا خشک شدن محتویات قرار گرفت. در مرحله آخر ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به میکروتیوب اضافه گردید. برای استخراج RNA از نوتروفیل، ابتدا مقدار ۱ میلی‌لیتر خون به لوله آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد منتقل و نوتروفیل‌های جدا شده با روش بالا، RNA از آن‌ها استخراج گردید.

**سنتز cDNA**

تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت تجاری شرکت سینا کلون انجام پذیرفت. ابتدا برای جلوگیری از تولید محصول PCR از DNA ژنومی سلول، فراورده RNA با آنزیم DNase تیمار و آلودگی احتمالی DNA حذف گردید. سپس کیفیت و کمیت محصول با استفاده از ژل الکتروفورز و مورد بررسی قرار گرفته و در یک میکروتیوب به ترتیب ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo-dT، ۱ µl مخلوط dNTPs و ۱۰ میکرولیتر RNA استخراجی اضافه شد. میکروتیوب پس از قرارگرفتن در دمای ۶۵ °C به مدت ۵ دقیقه و سانتریفوژ با دورg ۱۲۰۰ به مدت ۲ دقیقه، در کنار یخ قرار گرفت. در یک میکروتیوب جدید ۲ میکرولیتر بافر 10X و ۱۰۰ واحد Reverse Transcriptase M-MuLV اضافه شد. سپس حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ میکرولیتر رسانده شده و به میکروتیوب اول اضافه شد. پس از قرار گرفتن در دمای ۴۲ °C به مدت ۶۰ دقیقه و سپس در دمای ۸۵°C به مدت ۵ دقیقه، میکروتیوب در کنار یخ قرار گرفته و cDNA تهیه شده به فریزر منتقل گردید.

**PCR**

برای انجام واکنش PCR، ۳۷/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه دو بار تقطیر، ۵ میکرولیتر بافر X10PCR، ۱/۵میکرولیتر MgCl2 ۰/۸ میکرولیتر dNTP، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز، ۱ میکرولیتر cDNA و ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse برای ژن‌های پیش التهابی (به صورت جداگانه) به هر میکروتیوب اضافه شد (حجم کل هر میکروتیوب ۵۰ میکرولیتر). سپس میکروتیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل گردیده و ابتدا به مدت ۵ دقیقه با دمای °C ۹۵، سپس ۴۵ ثانیه با دمای °C ۹۵، ۴۵ ثانیه با دمای °C ۵۶ ،۱ دقیقه با دمای °C۷۲ مجموعاً ۳۲ سیکل و در نهایت ۱۰ دقیقه با دمای °C۷۲ انکوبه شدند. محصول نهایی PCR به همراه DNA استاندارد روی ژل آگارز ۱/۵٪ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری**

بررسی بیان ژن در نمونه‌های مورد آزمایش با روش PCR معمولی انجام و نمونه‌ها در ژل آگارز الکتروفورز گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 و آزمون‌های آماری تی، آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

**ملاحظات اخلاقی**

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده پیرادامپزشکی تایید شده است (کد اخلاق به IR.BASU.REC.1398.053).

## نتایج

**ارزیابی اندازه زخم**

پس از گذشت ۱ هفته از تزریق لیشمانیا در ناحیه قاعده دم زخم مشاهده شد. در گروهی که تحت درمان با گلوکانتیم بودند به مرور زمان (۲۱ روز) زخم‌ها جمع شده و هیچ‌گونه ندول یا زخم ناشی از لیشمانیوز باقی نماند در حالیکه در گروه کنترل در مدت زمان مشابه زخم‌های پوستی گسترش یافته و در نهایت منجر به مرگ حیوان گردیدند.

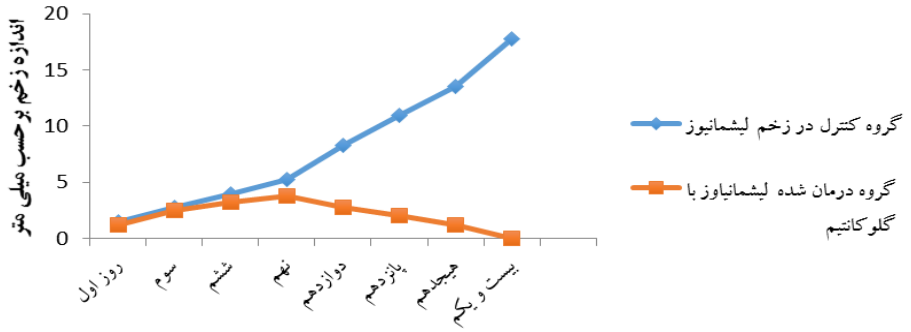
**بیان ژن‌های پیش التهابی در طحال و نوتروفیل‌های خون محیطی**

نتایج به‌دست آمده نشان داد که طبق انتظار، ژن کنترل GAPDH در تمام نمونه‌های مورد آزمایش بیان شده که دلیلی بر صحت انجام PCR دارد و از طرفی هیچ یک از

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

ژن‌های پیش التهابی در بافت طحال موش‌های سالم بیان نشد. از طرفی در موش‌های آلوده به لیشمانیا، قبل از انجام درمان ژن‌های IFN-γ، IL-1β، CCR5، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35، در نوتروفیل‌های خون محیطی و فقط IFN-γ در طحال بیان شدند. در گروه موش‌های کنترل تیمار شده با PBS، در هفته دوم ژن IFN-γ همچنان در نوتروفیل‌ها و سلول‌های طحال با میزان بالا بیان می‌شد. هم‌چنین در نوتروفیل این موش‌ها، بیان ژن‌های IL-1β، CCR5، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35 ادامه یافت اما در طحال آن‌ها هیچ یک از این ژن‌ها بیان نشد. در هفته چهارم در موش‌های گروه کنترل، زخم‌ها گسترش یافته و منجر به مرگ موش‌ها می‌شدند و ژن‌های IFN-γ، IL-1α، IL-1β، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35، TNF-α و CCL3/MIP-1α در نوتروفیل‌های خون محیطی بیان شدند. در طحال هیچ ژنی بیان نشد. در گروه درمان شده با گلوکانتیم، در هفته دوم IFN-γ، IL-1α، IL-1β، IL-12p40، IL-12p35، TNF-α و CCL3/MIP-1α در نوتروفیل و IL-1α، CCR5، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35، TNF-α و CCL4/MIP-1β در طحال بیان شدند. در هفته چهارم در این گروه، زخم‌ها در شرایط بهبود قرار داشته و ژن‌های IFN-γ، CCR5، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35، TNF-α و CCL3/MIP-1α در نوتروفیل و IFN-γ، IL-1α، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35 و TNF-α در طحال بیان شدند (جدول ۲ و شکل ۱).




نمودار ۱: مقایسه اندازه زخم لیشمانیوز: برای ایجاد لیشمانیوز تعداد ۲ میلیون انگل لیشمانیا ماژور به صورت داخل جلدی به ۲ گروه موش BALB/c تزریق شد. در گروه تست، مقدار mg/kg ۳۰ گلوکانتیم به صورت داخل ضایعه در ساعات ۳، ۶ و ۱۲ تزریق شد. اندازه زخم به فاصله هر ۳ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج اختلاف معناداری را بین گروه تست و کنترل نشان داد.

جدول ۲: مقایسه بیان ژن در نوتروفیل‌های خون محیطی و طحال در موش مبتلا به لیشمانیوز جلدی

| نوع نمونه | مرحله نمونه گیری | گروه | IFN-γ | IL-1α | IL-1β | CCR5 | CCL-5 | IL-12p40 | IL-12p35 | TNF-α | CCL3/MIP-1α | CCL4/MIP-1β | GAPDH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نوتروفیل | | بافت و خون موش سالم | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| طحال | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| نوتروفیل | قبل از دریافت PBS | گروه کنترل تیمار شده با PBS | +++ | | + | ++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | + |
| طحال | | | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| نوتروفیل | هفته دوم | | +++ | | + | ++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | + |



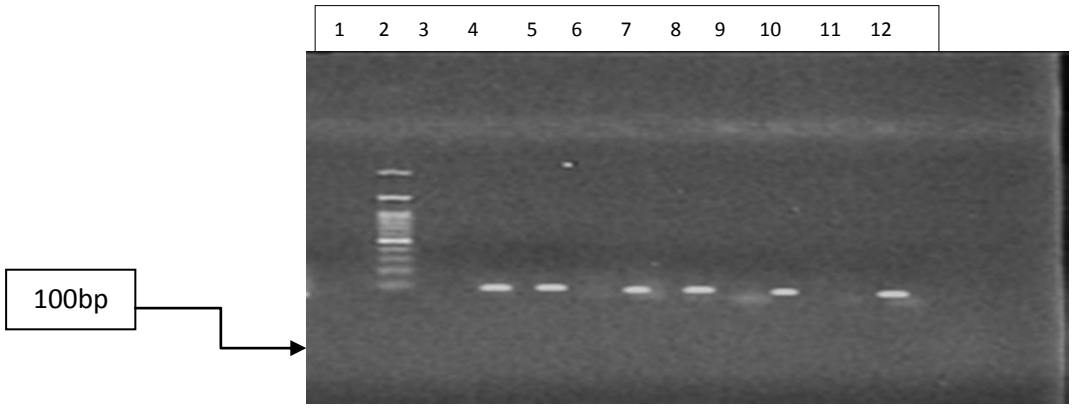
[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]
[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| طحال | | | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| نوتروفیل | هفته | | + | + | + | - | + | + | ++ | + | + | - | + | - | + |
| طحال | چهارم | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| نوتروفیل | قبل از | گروه درمان | +++ | - | + | ++ | ++ | ++ | - | - | - | - | - | - | + |
| طحال | شروع درمان | شده با گلوکانتیم | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| نوتروفیل | هفته دوم | | ++ | + | - | – | – | ++ | ++ | + | + | | + | | + |
| طحال | | | - | ++ | - | + | ++ | ++ | ++ | ++ | – | + | + | | + |
| نوتروفیل | هفته چهارم | | +++ | – | - | + | + | ++ | ++ | + | ++ + | – | + | | + |
| طحال | | | ++ | + | - | - | +++ | + | + | + | - | - | - | - | + |

- عدم بیان ژن در حیوانات مورد آزمایش + بیان ژن در ۱/۳ حیوانات مورد آزمایش

++ بیان ژن در ۲/۳ حیوانات مورد آزمایش

+++ بیان ژن در کل حیوانات مورد آزمایش




شکل ۱: بیان ژن‌های پیش التهابی در نوتروفیل‌های خون محیطی در موش مبتلا به لیشمانیوز جلدی: بیان ژن‌های پیش التهابی در هفته اول عفونت لیشمانیوز در نوتروفیل‌های خون محیطی. شماره ۱ تا ۱۲به ترتیب۱. کنترل منفی، ۲.استاندارد DNA ۳. CCL4،۴ CCL3، ۵. TNF-α، ۶. IL-1α، ۷. IL-12p35، ۸. IL-12p40، ۹. CCL-5، ۱۰. CCR5، ۱۱. IL-1β و۱۲. IFN-γ. اندازه باند در این ژن‌ها ۱۰۰bp می باشد.

## بحث

اگرچه در اکثر مطالعات نقش پاسخ ایمنی در درمان و پیشگیری علیه انگل لیشمانیا بررسی شده است، اما کمتر به پاسخ‌های التهابی با میانجی‌گری سلول‌های سیستم ایمنی و الگوی بیان ژن‌های تاثیرگذار در پاسخ‌های التهابی توجه گردیده است. پس از مواجه سیستم ایمنی با انگل لیشمانیا، رفتار بیولوژیکی سلول‌های فاگوسیت کننده به سمت میزبانی انگل تغییر پیدا نموده و سلول‌های دندرتیک نیز به عنوان عامل محرک برای لنفوسیت‌های T در ایجاد پاسخ محافظت کننده علیه عامل عمل می‌کنند. کارایی ایمنی ذاتی در مقابل انگل به عملکرد نوتروفیل بر اساس گونه لیشمانیا نیز بستگی دارد برخی از مطالعات نشان دادند که انگل لیشمانیا می‌تواند در داخل نوتروفیل‌ها باقی‌مانده و از تشکیل فاگولیزوزوم ممانعت کند و یا در مورد لیشمانیا ماژور با داشتن اندونوکلئاز مانع از فرایند فاگوسیتوزی نوتروفیل می‌شود (۱۲). اما به‌طور کلی پاسخ ایمنولوژیکی پیچیده‌ای در روند لیشمانیوزیس ایجاد می‌شود که یکی از این موارد تنظیم تکثیر لنفوسیتی و تمایز به ماکروفاژها به عنوان سلول اصلی در پاسخ به عامل لیشمانیا بوده و متابولیسم ماکروفاژها مرتبط با سایتوکاین‌های متفاوت بوده و نقش تعیین کننده‌ای در مقاومت یا حساسیت به عامل دارد. در این میان کموکاین‌ها نقش تنظیم حرکت سلول‌های ایمنی را در موضع عفونت دارند، زیرگروهای سلول‌های T نیز

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

در نوع پاسخ محافظتی در مقابل انگل نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱۳). هدف از این پژوهش، بررسی و درک بهتر الگوی بیان ژن‌های پیش التهابی در مراحل مختلف ایجاد و پیشرفت بیماری سالک در سلول‌های نوتروفیل و مقایسه آن با الگوی بیان این ژن‌ها با سلول‌های طحال که حاوی سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک، به عنوان سلول‌های میزبان انگل لیشمانیا، می‌باشد. محور بررسی این پژوهش بررسی کیفی بیان ژن‌های سایتوکاین‌های پیش التهابی بوده که با روش PCR معمولی سنجیده شد. در مطالعه حاضر، نتایج بیان ژن‌های پیش التهابی در مدل حیوانی بسیار حائز اهمیت بوده که در ارزیابی کلی پاسخ ایمنی ناشی از انگل مهم است، اما بررسی دقیق بیان ژن، مستلزم انجام PCR کمی با روش ریل تایم و انجام تکنیک الایزا جهت تشخیص ترشح سایتوکاین‌های مربوطه می باشد؛ چراکه با روش PCR معمولی نمی‌توان بیان دقیقی از میزان سایتوکاین بیان شده را عنوان کرد. در این پژوهش همان طور که قابل انتظار بود در گروه موش‌های BALB/c تحت درمان با گلوکانتیم بر خلاف گروه کنترل در طی سه هفته بهبودی مشاهده شد. علت بهبود در گروه درمان شده را می‌توان به عدم انتشار انگل در سایر اندام‌های موش به‌خصوص طحال نسبت داد. این ویژگی یکی از شاخص‌های تأثیر دارو در درمان لیشمانیوز جلدی در موش‌های حساس مانند BALB/ c است (۱۴). نتایج این پژوهش نشان داد که در موش‌های آلوده به بیماری لیشمانیوز جلدی، ژن‌های پیش التهابی به‌طور قابل مقایسه‌ای در نوتروفیل‌های خون محیطی و نیز طحال بیان گردیدند اما الگوی بیان این ژن‌ها متفاوت است. در موش‌های سالم، ژن‌های پیش التهابی در نوتروفیل‌ها و سلول‌های طحال در حد غیر قابل تشخیصی قرار داشت. با دقت در الگوی بیان ژن‌های پیش التهابی در موش‌های گروه کنترل که آلوده به لیشمانیا بوده اما تحت درمان با گلوکانتیم قرار نداشتند، می‌توان نتیجه گرفت که در این گروه، انگل لیشمانیا در طحال موجب کاهش شدید ژن‌های پیش التهابی شده است به نحوی که از بین همه ژن‌های مورد آزمایش فقط ژن IFN-γ در طحال بیان گردید که البته بیان این ژن در اواخر دوره بیماری نیز متوقف گردید. برعکس در نوتروفیل‌های خون محیطی در هفته اول بیماری ژن‌های IFN-γ، IL-1β، CCR5، CCL-5، IL-12p40 و IL-12p35 بیان گردیدند و در اواخر دوره بیماری نیز IL-1α، TNF-α و CCL3/MIP-1α بیان شدند اما بیان CCR5 متوقف گردید. پژوهش‌های قبلی همواره بر نقش مهم محور IFN-γ و IL-12 در تحریک پاسخ‌های Th1 و ایجاد مقاومت بر علیه انگل لیشمانیا در لیشمانیوز جلدی تاکید داشته (۱۵) و هم‌چنین ترشح IL-1α و IL-1β را موجب افزایش تولید و آزادسازی نوتروفیل و پلاکت از مغز استخوان می‌دانند. در مراحل ابتدایی عفونت، بیان ژن‌های التهابی در نوتروفیل بیشتر از طحال بود که این حاکی از آن است که نوتروفیل‌ها مهم‌ترین سلول بیگانه خوار محیطی هستند که نقش بسیار مهمی را در مقابله با عوامل مهاجم از جمله لیشمانیا بر عهده دارند و با مهاجرت به کانون‌های عفونت، میکروارگانیسم‌های مهاجم را نابود می‌سازند، لذا آغازگر فرآیند التهاب هستند (۱۵). عدم تطابق الگوی بیان ژن‌های پیش التهابی در طحال و نوتروفیل‌های خون محیطی نشان دهنده عملکرد متفاوت انگل در طحال و خون است. از طرفی بیان ژن‌های پیش التهابی تا آخر دوره بیماری و زمان مرگ موش‌ها در سلول‌های نوتروفیل ادامه داشتند که نشان دهنده نقش فعال نوتروفیل‌ها در مقابله با انگل در تمام طول دوره بیماری است. البته الگوی بیان ژن‌های پیش التهابی در نوتروفیل‌های خون محیطی متعاقب درمان با گلوکانتیم تا حدودی تغییر می‌کند. به نحوی که بیان ژن IL-1β متوقف شده و ژن‌های TNF-α و CCL3/MIP-1α بیان شدند که این تغییر می‌تواند به عنوان مارکر برای بررسی روند درمان مورد توجه قرار گیرد. همان‌طوری که اشاره شد، لیشمانیا ماژور ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی را کاهش داده و از این طریق موجب تضعیف پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌گردد. در مطالعه‌ای که توسط لاپارا و همکاران انجام شد نقش بعضی از ترکیبات باکتریایی مانند LPS در کاهش بیان ژن‌های پیش التهابی در ماکروفاژها گزارش شده است (۱۶). محققین فرضیه‌ای ارائه دادند که علت عدم پاسخ قوی و محافظت کننده سلولی در مقابل این انگل، پنهان شدن انگل در

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

سلول‌های فیبروبلاست، نوتروفیل‌ها، و ماکروفاژهای M2 می‌باشد که عامل را دور از دسترس نگه داشته و باعث عفونت نهان می‌شود (۱۷)، احتمالاً انگل لیشمانیا نیز با مکانیسم‌های مشابه قادر به کنترل بیان ژن‌های پیش التهابی در ماکروفاژها و این سلول‌ها بوده که می‌تواند باعث پایداری بیشتر انگل در داخل این سلول‌ها گردد. افزایش میزان TNF-α در گروه تحت درمان با گلوکانتیم در طحال حاکی از آن است که میزان TNF-α در سیر بیماری لیشمانیوز، از مرحلهٔ فعال تا بهبود قابل ردیابی است. این واسطه التهابی از سایتوکاین‌های اصلی فعال‌کنندهٔ ماکروفاژ برای تولید نیتریک اکساید است که در نابودی انگل‌های درون سلولی موثراست (۱۸) و لذا در بهبود عفونت ناشی از عامل بیماریزای درون سلولی لیشمانیا ماژور اهمیت دارد (۱۹). از نتایج فوق می‌توان چنین استنباط کرد که هنگام استفاده از داروی ضد لیشمانیا نیز همچنان نقش سیستم ایمنی در دفع انگل غیر قابل انکار است. نقش TNF-α به همراه IL-12 و IFN-γ در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی لنفوسیت‌هایT CD4+ (Th1) و کنترل عفونت لیشمانیا در موش نشان داده شده است. این موضوع در مطالعات اخیر با بررسی فعالیت محور IFN-γ و IL-12 در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و یا افرادی که داروهای سرکوب کننده سیتم ایمنی دریافت می‌کنند و دارای حساسیت بیشتری نسبت به عفونت‌های لیشمانیایی می‌باشند مورد تایید قرار گرفته است. در این بیماران، سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-12 به شدت کاهش و سایتوکاین‌های پاسخ‌های Th2 مانند IL-5، IL-4 و TGF-β افزایش می‌یابد (۲۰). البته میزان و نوع ژن‌های التهابی بیان شده برای سرکوب عامل پاتوژن در مراحل اولیه تا بهبود زخم لیشمانیا متفاوت است. با توجه به این که در مراحل اولیه ایجاد التهاب، سلول‌های نوتروفیل به عنوان اولین سلول‌ها به موضع مهاجرت می‌کنند، عملکرد آن‌ها تحت‌تاثیر عوامل تعیین کننده مانند سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها است، به عنوان مثال پس از ورود انگل به داخل ماکروفاژ، IFN-γ تولید شده توسط لنفوسیت‌های Th1 می‌تواند باعث فعال‌شدن ماکروفاژهای آلوده شده و تکثیر عامل را از طریق تولید واسطه‌های فعال اکسیژن کنترل کند، علاوه بر نقش مهم تولید سایتوکاین توسط Th1، وجود لنفوسیت‌های TCD8+ نیز می‌تواند با نقش دوگانه خود از یک طرف IFN-γ را تولید کرده و نقش محافظتی را ایفا کند و از طرف دیگر فعالیت اینفلامازوم NLRP3 را تحریک و IL-1β را تولید کرده و روند التهاب را تشدید نماید (۲۱)، واکنش‌های سیستم ایمنی منوط به ایجاد ارتباط بین سلول‌های ایمنی از طریق تولید پروتئین‌های سایتوکاینی است که به صورت زنجیروار بر یکدیگر موثرند. IL-1 یکی از اولین سایتوکاین‌های تولید شده در التهاب است که در بررسی حاضر نیز افزایش یافته است. محققان نیز نشان دادند که IL-1 نقش مهمی در این عفونت داشته به نحوی که اختلال در سیستم اینفلامازوم و به‌دنبال آن پردازش IL-1 مانع از کنترل بیماری می‌شود (۲۲). در لیشمانیوز احشایی و جلدی معمولاً کموکاین‌های التهابی مانند CCL3 و CCL4 در اثر پاسخ‌های التهابی القا می‌شوند که در اثر تماس با انگل لیشمانیا یا در اثر فعالیت سایتوکاین‌های التهابی مثل TNF-α عرضه این کموکاین‌های التهابی افزایش می‌یابد (۱۵). CCL4 و دیگر کموکاین‌ها دارای نقش پیش التهابی هستند و در هنگام التهاب، سلول‌های ایمنی را فراخوانده و به طور کلی چسبندگی، کموتاکسی و فعال‌سازی بسیاری از جمعیت‌های لکوسیتی را کنترل کرده و تنظیم کننده اصلی عبور و مرور لکوسیتی هستند. خانواده کموکاین‌ها در رگزایی و بهبود زخم نیز نقش تنظیمی دارد (۲۳). در پژوهش‌های اخیر نشان داده شده است که بیماران مبتلا به نقص سیتم ایمنی و یا افرادی که به داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت می‌کنند، دارای حساسیت بیشتری نسبت به عفونت‌های لیشمانیایی هستند. بررسی نتایج در گروه درمان شده با گلوکانتیم نشان می‌دهد که متعاقب درمان با این دارو، ژن‌های IFN-γ، IL-1α، CCR5، CCL-5، IL-12p40، IL-12p35، TNF-α و CCL4/MIP-1β در طحال بیان می‌شوند. این موضوع نشان می‌دهد که علی‌رغم ظهور علایم بالینی بیماری که به‌صورت زخم جلدی ظهور می‌یابد، نوع تعامل انگل با سیستم ایمنی همواره به‌صورت سیستمیک بوده و تنها به واکنش‌های موضعی بافتی محدود نمی‌گردد. بررسی بیان سایتوکاین‌های درگیر در پاسخ به لیشمانیا و خصوصاً میزان کمی

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

آن‌ها از جهات مختلف حائز اهمیت می‌باشد چراکه در گام اول، بررسی بروز این عوامل و در مراحل بعدی ارزیابی کمی این سایتوکاین‌ها به جهت اهمیت مقادیر بیان، ضروری است؛ به عنوان نمونه محققان در این زمینه نشان دادند که اگرچه سایتوکاینی همانند IFN-γ در کنترل عفونت لیشمانیا دارای نقش کلیدی است ولی بیان بیش از حد آن می‌تواند آسیب بافتی و متعاقباً پیشرفت ضایعه را به‌دنبال داشته باشد، بنابراین بیان این عوامل در مدل کنترل شونده باید در حد متعادل باشد و از طرفی ارائه راهکارهای درمانی در خصوص این بیماری مستلزم بررسی بیشتر در این زمینه به منظور دستیابی به حد بیان مطلوب عوامل سایتوکاینی در مقابله با این عارضه می‌باشد (۲۴). و در ارائه راهکارهای درمانی لذا پژوهش‌های بیشتر در مورد الگوی بیان سایتوکاین‌ها در بیماران لیشمانیوز مبتلا به نقص یا سرکوب سیستم ایمنی می‌تواند برای یافتن روش‌های درمانی مطمئن‌تر راهگشا باشد. شناخت مسیرهای فعالیت سیستم ایمنی از طریق بیان سایتوکاین‌ها به عنوان رابط و شروع‌کننده پاسخ‌های ایمنولوژیک، می‌تواند در زمینه ارائه راهکارهای درمانی مناسب بر پایه ایمنوتراپی در جهت مقابله با انگل لیشمانیا مفید باشد زیرا با توجه به مطالعات اخیر انجام شده، در شرایط حاضر داروی انتخابی این عارضه دارای اثرات جانبی بوده و در دسترس نمی‌باشد و از طرفی تحقیقات در زمینه واکسن نیز کامل نشده و قابلیت جامعیت را ندارد، لذا درک بیشتر مسیرهای ایمنولوژیک علیه انگل می‌تواند در بهبود روش‌های درمانی مبتنی بر ایمنوتراپی حائز اهمیت باشد (۲۵).

## نتیجه‌گیری

عدم شناخت کافی از چگونگی بیان ژن‌های مهم سایتوکاینی در جریان پاسخ‌های ایمنی در طی عفونت لیشمانیوز جلدی، از علل مهم عدم دستیابی به واکسن و ارائه راهکار درمانی مؤثر علیه لیشمانیوز بوده است. مطالعه بیان ژن‌های پیش التهابی در سلول‌ها و بافت‌های ایمنی چگونگی فعالیت آن‌ها را در مقابله با انگل روشن می سازد. از طرفی باید نقش موثر دارو گلوکانتیم را به عنوان یک دارو استاندارد در مقابل با عفونت لیشمانیا با اثرگذاری سیستمیک بر تغییر پاسخ سیستم ایمنی در نظر گرفته و بررسی دقیقی از تاثیرگذاری این دارو بر روند درمانی از طریق بیان ژن‌های سایتوکاینی در موضع زخم لیشمانیا، بافت طحال و کبد به عنوان ارگان‌های موثر در تنظیم پاسخ ایمنی علیه انگل را انجام داد.

## سپاس‌گزاری

این مطالعه از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد در رشته انگل‌شناسی استخراج شده و نویسندگان مایلند از دانشگاه بوعلی سینا برای تامین منابع مالی پروژه و سرکار خانم مهندس اعظمی و جناب آقای مهندس خوشروزی به جهت کمک‌های فنی در طول پروژه کمال تشکر را داشته باشند.

**حامی مالی:** این بررسی دانشگاه بوعلی سینا همدان و دانشکده پیرا دامپزشکی می‌باشد.

**تعارض در منافع:** وجود ندارد.

## References:

1-Rezvan H, Mafi M. ***An Overview on Leishmania Vaccines: A Narrative Review Article***. Vet Res Forum 2015; 6(1): 1-7.

2-Akbari M, Honma K, Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Matsuyama T, et al. ***IRF4 in Dendritic Cells Inhibits IL-12 Production and Controls Th1 Immune Responses Against Leishmania Major***. J Immunology 2014; 192(5): 2271-9.

3-Carvalho AM, Cristal JR, Muniz AC, Carvalho LP, Gomes R, Miranda JC, et al. ***Interleukin 10-Dominant Immune Response and Increased Risk of Cutaneous Leishmaniasis after Natural Exposure to***

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

***Lutzomyia Intermedia Sand Flies***. J Infect Dis 2015; 212(1): 157-65.

***4-***Eiras DP, Kirkman LA, Murray HW. ***Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers.*** Curr Treat Options in Infect Dis 2015; 7(1): 52-62.

***5-***Gois L, Badaró R, Schooley R, Grassi MF. ***Immune Response to Leishmania Antigens in an AIDS Patient with Mucocutaneous Leishmaniasis as a Manifestation of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS): A Case Report***. BMC Infect Dis 2015; 15(1): 38.

***6-***Ferrante CJ, Leiboich SJ. ***Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing***. Ave Wound Care (New Rochelle) 2012; 1(1): 10-6.

***7-***Oghumu S, Stock JC, Varikuti S, Dong R, Terrazas C, Edwards JA, et al. ***Transgenic Expression of CXCR3 on T Cells Enhances Susceptibility to Cutaneous Leishmania Major Infection by Inhibiting Monocyte Maturation and Promoting a Th2 Response.*** Infect Immun 2015; 83(1): 67-76.

***8-***Akhzari S, Rezvan H, Zolhavareh M. ***Expression of Pro-Inflammatory Genes in Lesions and Neutrophils during Leishmania Major Infection in BALB/C Mice***. Iran J Parasitol 2016; 11(4): 534-41.

***9-***Regli IB, Passelli K, Hurrell BP, Tacchini-Cottier F. ***Survival Mechanisms Used by Some Leishmania Species to Escape Neutrophil Killing***. Front Immunol 2017; 8: 1558.

***10-***Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. ***Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions***. Trends Parasitol 2016; 32(5): 392-401.

***11-***Rezapur A, Majidi J. ***An Improved Method of Neutrophil Isolation in Peripheral Blood of Sheep***. J Animal and Veterinary Advances 2009; 8(1): 11-15.

***12-***Bahrami F, Harandi AM, Rafati S. ***Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis***. Front Cell Infect Microbiol 2018; 8: 222.

***13-***Bhaskar S, Ricardo S. ***Cytokines in the Immunity and Immunopathogenesis in Leishmaniases***. Cytokine 2020; 145: 155320.

***14-***Oryan A. ***Plant-Derived Compounds in Treatment of Leishmaniasis***. Iran J Vet Res 2015; 16(1): 1-19.

***15-***Salman KD, Salman SQ, Abdulraheem GA. ***Immunogenic Potential of Cytosolic Proteins against Visceral Leishmaniasis in BALB/C Mice and the Role of Chitosan as Adjuvant***. Int J Adv Technol Innov Res 2015; 7(4): 540-5.

***16-***Lapara III NJ, Kelly BL. ***Suppression of LPS-Induced Inflammatory Responses in Macrophages Infected with Leishmania***. J Inflamm 2010; 7(1): 8.

***17-***Lee SH, Charmoy M, Romano A, Paun A, Chaves MM, Cope FO, et al***. Mannose Receptor High, M2 Dermal Macrophages Mediate Nonhealing Leishmania Major Infection in a Th1 Immune Environment***. J Exp Med 2018; 215: 357-75.

***18-***Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Cafe V, et al. ***Lesion Size Correlates with Leishmania Antigen-Stimulated TNF-Levels in Human Cutaneous Leishmaniasis.*** Am J Tropical Med Hyg 2011; 85(1): 70-3.

***19-***Bousquet E, Mura F, Villain M, Rivière S, Konate A, Schneider C. ***Complications Infectieuses Liées Au Traitement Par Anti-Tnfα: À Propos De Deux Cas***

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

***De Leishmaniose.*** J Français d'Ophtalmologie 2012; 35(9): 695-9.

***20-***Andargie TE, Ejara ED. ***Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Visceral Leishmaniasis***. J Cell Science & Therapy 2015 1; 6(3): 1.

***21-***Novais FO, Carvalho AM, Clark ML, Carvalho LP, Beiting DP, Brodsky IE, et al. ***CD8+ T Cell Cytotoxicity Mediates Pathology in the Skin by Inflammasome Activation and IL-1β Production***. PLoS Pathog 2017; 13(2): e1006196.

***22-***Hartley MA, Eren RO, Rossi M, Prevel F, Castiglioni P, Isorce N, et al. ***Leishmania Guyanensis Parasites Block the Activation of the Inflmmasome by Inhibiting Maturation of IL-1β***. Microb Cell 2018; 5: 137-49.

***23-***Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. ***CCR5-Dependent Homing of Naturally Occurring CD4+ Regulatory T Cells to Sites of Leishmania Major Infection Favors Pathogen Persistence***. J Exp Med 2006; 203(11): 2451-60.

***24-***Maspi N, Abdoli A and Ghaffarifar F. ***Pro-And Anti-Inflammatory Cytokines in Cutaneous Leishmaniasis: A Review.*** Pathog Glob Health 2016; 110(6): 247-60.

***25-***Akbari M, Oryan A, Hatam GH. ***Immunotherapy in Treatment of Leishmaniasis***. Immunol Lett 2021; 33: 80-6.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 29| NO 11 | Feb 2022

Received: 29 Nov 2020
Accepted: 2 Mar 2021

# Comparison of Pro-inflammatory Gene Expression Profile in Spleen and Peripheral Blood Neutrophils of BALB/C Mice Infected with *Leishmania Major*

**Hossein Rezvan[*1], Sahar Hamoon Navard[1], Soheyla Akhzari[1]**

**Original Article**

**Introduction:** Leishmaniasis is one of the common diseases between humans and animals. The present study was to investigate the expression pattern of pro-inflammatory genes in different stages of cutaneous leishmaniasis progression in order to provide a standard framework for diagnosis of various stages of the disease.

**Methods:** In this experimental study, $2\times10^6$ *Leishmania major* were injected in two groups of BALB/c mice in the base of the tail. After skin lesion, the animals were divided into control group, without treatment and the test group treated with glucantime for 30 days by intralesion injection. At the end of the second and fourth weeks of treatment, gene expression cytokines IL-12p35, CCL3, CCL4, IL-12p40, TNF-α, CCL5, IL-1α, IL-1β, IFN-γ and CCR5 was performed in peripheral blood neutrophil cells and spleen cells using conventional PCR technique. The data were analyzed through SPSS software version 16; t-tests, ANOVA and Tukey's test were also run ($P<0.05$).

**Results:** In Leishmania infected mice, before treatment with glucantime, IFN-γ, IL-1β, CCR5, CCL-5, IL-12p40, IL-12p35 in peripheral blood neutrophils and IFN-γ in the spleens were expressed, which was different from the expression pattern of the genes in Leishmania infected mice treated with Glucantim.

**Conclusion:** The cytokines (IFN-γ, IL-12, TNF-α) are important factors affecting the immune response as reducing the expression of these genes causes the lesion progression in leishmaniasis.

**Keywords:** Leishmania, Neutrophil, Spleen, Pro-inflammatory, Genes.

**Citation:** Rezvan H, Hamoon Navard S, Akhzari S. **Comparison of Pro-inflammatory Gene Expression Profile in Spleen and Peripheral Blood Neutrophils of BALB/C Mice Infected with Leishmania Major.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 29(11): 4268-80.

[1]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 08134227475**, email:** h.rezvan@basu.ac.ir



[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07 ]

[ DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8503 ]