

## مقایسه‌ی میزان Monocyte Chemotactic Protein-1 و نیتریک اکساید در سرم افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی قبل و بعد از درمان با گلوکانتیم

فائزه محمدی<sup>۱</sup>، منیژه نریمانی<sup>۲</sup>، نفیسه اسمعیل<sup>۳</sup>، دکتر حسین یوسفی<sup>۴</sup>، دکتر عباسعلی اسکندریان<sup>۵</sup>،  
دکتر سید حسین حجازی<sup>۶</sup>

### چکیده

**مقدمه:** شناخت و نقش عملکرد سیستم ایمنی و عوامل مختلف آن در التیام ضایعات ناشی از لیشمانیوز جلدی، درمان و کنترل بیماری ضروری به نظر می‌رسد. طبق مطالعات انجام شده، فاکتورهای ایمنی مثل MCP1 (Monocyte chemotactic protein-1) و نیتریک اکساید (Nitric oxide) یا NO دارای اثرات تعیین کننده‌ای در روند التیام ضایعات می‌باشند. بنابراین در این مطالعه سعی شد تداخل فاکتورهای ذکر شده با گلوکانتیم، داروی انتخابی درمان این بیماری، مورد بررسی قرار گیرد.

**روش‌ها:** از موارد مشکوک مراجعه کننده به مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، ۴۴ بیمار (شامل ۳۸ مرد و ۶ زن) که آزمایش مستقیم جلدی آن‌ها پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا از نظر بیماری لیشمانیوز مثبت شده بود، انتخاب شدند. قبل از تجویز هر نوع داروی درمانی، ۵ سی‌سی خون جهت اندازه‌گیری فاکتورهای MCP1 و NO از آن‌ها گرفته شد و پس از جداسازی سرم بیماران، تا زمان بررسی در ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. از همین بیماران ۲ تا ۴ هفته بعد از دریافت آخرین دوز دارویی جهت بررسی فاکتورهای ذکر شده، خون‌گیری مجدد انجام شد.

**یافته‌ها:** جهت بررسی رابطه‌ی متغیرهای NO و MCP1 قبل و بعد از درمان از آزمون Paired-t استفاده شد. در این بررسی ملاحظه شد که بین ۲ فاکتور ذکر شده و درمان دارویی با گلوکانتیم رابطه‌ی معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ )؛ به طوری که افزایش معنی‌دار MCP1 و NO پس از درمان و التیام ضایعه‌ی جلدی گزارش گردید.

**نتیجه‌گیری:** MCP1 القا کننده‌ی فعالیت‌های ضد لیشمانیایی در ماکروفاژها از طریق تولید NO است و در نتیجه باعث هدایت پاسخ ایمنی به سمت Th1 و کشتن انگل درون سلولی می‌شود.

**واژگان کلیدی:** نیتریک اکساید، لیشمانیوز جلدی، پروتئین-۱ جاذب شیمیایی مونوسیت‌ها

### مقدمه

سلول‌های ماکروفاژ مهره‌داران دیده می‌شود (۱-۲). در ایران *Leishmania major* و *Leishmania tropica* عوامل لیشمانیوز جلدی می‌باشند که از نظر الگوی بیماری‌زایی، به طور کامل متفاوت می‌باشند. کلیه‌ی تلاش‌ها در جهت حل این مشکل بهداشتی چه در حوزه‌ی درمان و چه در حوزه‌ی پیش‌گیری و تولید

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های مهم در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که توسط گونه‌هایی از جنس *Leishmania* ایجاد می‌گردد. انگل به دو شکل تاژک‌دار (پروماستیگوت) درون بدن پشه‌ی خاکی فلبوتوموس و بدون تاژک (اماستیگوت) درون

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد، گروه زیست سلولی و مولکولی، آزمایشگاه مرکزی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۳</sup> مربی، دانشجوی دکتری، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، گروه ایمنی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۴</sup> استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۵</sup> استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۶</sup> دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

بنیان سیستمی آنها توسط یک اسید آمینه از هم جدا شده است. گیرنده‌ی کموکاین‌ها، گیرنده‌های متصل به پروتئین G هستند که در سطح لکوسیت‌ها بارز می‌شوند. سلول‌های T بیشترین تعداد این گیرنده‌ها را دارند (۷). اعضای خانواده‌ی CXC کموکاین‌ها، به طور عمده PMN (Polymorphonuclear) را فعال می‌کنند؛ در حالی که اعضای خانواده‌ی CC کموکاین‌ها، منوسیت‌ها، بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و لنفوسیت‌ها را فعال می‌نمایند. شش گیرنده برای اعضای CXC کموکاین‌ها (CXCR1-CXCR6) و ده گیرنده برای اعضای CC کموکاین‌ها (CCR1-CCR10) شناسایی شده است.

MCP1 (Monocyte chemotactic protein-1) یا CCL2 که به آن فاکتور ۱- جاذب شیمیایی منوسیت‌ها نیز می‌گویند، توسط منوسیت‌ها، سلول‌های آندوتلیال، فیروبلست‌ها و سلول‌های T تولید می‌شود و باعث افزایش مهاجرت منوسیت‌ها از جریان خون به بافت و تبدیل آنها به ماکروفاژ می‌گردد و با القای فاگوسیتوز باعث حذف عفونت از بدن می‌شود (۸-۹).

MCP1 برای ایجاد انفجار تنفسی که با واسطه‌ی تولید رادیکال‌های اکسیژن و NO و توسط ماکروفاژ انجام می‌شود، ضروری می‌باشد. بنابراین از نظر تئوریک این کموکاین می‌تواند پتانسیل القای فعالیت‌های ضد لیشمانیایی از طریق تولید NO را داشته باشد (۱۰-۱۱).

سطح سرمی MCP1 و NO در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ناشی از *L. tropica* متعاقب درمان، افزایش یافته است (۱۲). با توجه به مطالعات انجام شده و بررسی نقش کموکاین‌ها در ایمنی ذاتی و کمک به تمایز سلول‌های ایمنی به سمت Th1 در بیماری و Cutaneous leishmaniasis و نقش آنها در رگ‌زایی و

واکسن هنگامی می‌تواند موفق باشد که مکانیسم‌های مختلف سیستم ایمنی و برهم‌کنش سلول‌های این سیستم و انگل در سطح مولکولی شناسایی گردد. سلول‌های ایمنی بدن از جمله ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های  $TCD4^+$ ،  $TCD8^+$  و سایتوکاین‌های مشتق شده از آنها مثل  $IFN\gamma$ ، IL12 و کموکاین‌های تولیدی مثل MCP1 و مولکول‌های Effector مثل نیتریک اکساید (Nitric oxide یا NO) از اجزای کلیدی در پاسخ ایمنی بدن به انگل درون سلولی *Leishmania* می‌باشد (۱-۳).

یکی از مکانیسم‌هایی که ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها علیه انگل‌ها اعمال می‌نمایند، تولید واسطه‌های نیتروژنی و اکسید پذیر (Reactive nitrogen intermediates) یا RNIS می‌باشد. NO از اجزای کلیدی این مکانیسم است که قدرت تخریب‌کنندگی بسیار شدیدی بر علیه ارگانیزم‌های درگیر دارد. NO از واکنش اکسیژن با نیتروژن گوانیدین انتهایی اسید آمینه‌ی ال- آرژینین، تولید می‌شود و توسط Inducible nitric oxide synthase (iNOS) کاتالیز می‌گردد (۴-۵). پس از عفونت با *Leishmania*، کموکاین‌ها نقش اساسی در جذب لکوسیت‌ها به محل عفونت را دارند. بیان کموکاین‌ها و گیرنده‌های کموکاینی در التیام ضایعات پوستی لیشمانیوز قابل توجه است؛ چرا که کموکاین‌ها در تمایز لنفوسیت‌های Th1/Th2 نقش دارند (۶). کموکاین‌ها، پلی‌پپتیدهایی ۸ تا ۱۲ کیلودالتونی هستند و دارای دو حلقه‌ی دی سولفید داخلی می‌باشند، بر اساس تعداد موقعیت بنیان‌های سیستمی در انتهای آمینی (N ترمینال) تقسیم‌بندی می‌شوند. دو خانواده‌ی اصلی کموکاین‌ها عبارت هستند از کموکاین‌های CC، که دو بنیان سیستمی مجاور هم می‌باشند و خانواده‌ی CXC که دو

خون گرفته شد و سرم آن‌ها مشابه روش فوق جداسازی گردید.

برای اندازه‌گیری میزان MCP1 از کیت ELISA (eBioscience) و روش Sandwich ELISA استفاده شد. در این روش، کف پلیت با آنتی‌بادی MCP1 پوشیده شد. طبق دستور کیت، به ترتیب سرم بیمار، آنتی‌بادی کنژوگه شده با آنزیم، سوبسترا و Stop solution ریخته شد و با استفاده از دستگاه ELISA reader، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

بررسی میزان NO با کیت Calbiochem و با روش رنگ‌سنجی انجام شد. مکانیسم سنجش NO با این روش، اندازه‌گیری میزان نیتريت تولید شده به روش رنگ‌سنجی است. به دلیل کوتاه بودن نیمه عمر NO، اندازه‌گیری مستقیم آن مشکل می‌باشد، بنابراین اندازه‌گیری آن با استفاده از متابولیت‌های پایدار آن یعنی نیتريت و نیترات صورت می‌گیرد.

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) با استفاده از آزمون‌های آماری Paired-t و  $\chi^2$  در سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

#### یافته‌ها

از ۴۴ بیمار مبتلا به CL که وارد مطالعه شدند، ۳۸ بیمار (۸۶/۴ درصد) مرد و ۶ بیمار (۱۳/۶ درصد) زن و دارای میانگین سنی  $10/18 \pm 28/59$  سال بودند (جدول ۱).

در این مطالعه ۱۴ بیمار (۳۱/۸ درصد) دارای یک تا دو زخم بودند، در حالی که ۳۰ بیمار (۶۸/۲ درصد) دیگر بیش از دو زخم داشتند. محل زخم‌ها شامل

ترمیم زخم و نیز با توجه به این که لیشمانیوز به عنوان یک مشکل بهداشتی در بخش‌هایی از ایران به ویژه در استان اصفهان محسوب می‌باشد و تاکنون مقایسه‌ی کمی سطوح MCP1 و NO به طور هم‌زمان در سرم بیماران مبتلا به CL در اصفهان انجام نشده است، در این مطالعه میزان MCP1 و NO در سرم مبتلایان به CL قبل و بعد از درمان با گلوکانتیم مقایسه شد و نقش این فاکتورها در بهبود بیماری بررسی گردید.

#### روش‌ها

این مطالعه‌ی توصیفی به منظور بررسی میزان MCP1 و NO طی دو مرحله‌ی قبل و بعد از درمان با گلوکانتیم بر روی ۴۴ بیمار (۳۸ بیمار مرد و ۶ بیمار زن بین سنین ۱۵ تا ۵۶ سال) مبتلا به CL مراجعه کننده به مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) انجام شد. در این مطالعه بیمارانی شرکت داشتند که فاقد تاریخچه‌ی درمان ضد لیشمانیازی و یا فاقد هر گونه بیماری نقص ایمنی، دیابت، اتوایمیون، نارسایی کبد و حاملگی بودند.

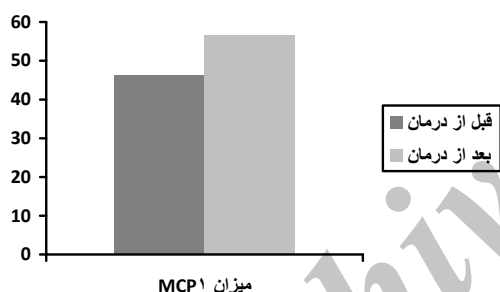
جهت آزمایش مستقیم از ضایعه‌ی بیمار، اسمیری تهیه و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد و با بزرگ‌نمایی  $100\times$  برای مشاهده‌ی آماستیگوت‌ها بررسی گردید. در مرحله‌ی بعد، از بیمارانی که لام مستقیم آن‌ها از نظر وجود انگل مثبت شده بود، پس از اخذ رضایت‌نامه، ۵ سی‌سی خون جهت اندازه‌گیری فاکتورهای MCP1 و NO گرفته شد. پس از ۲ تا ۳ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، نمونه‌های خونی، سانتریفیوژ و سرم‌های جدا شده در  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. ۲ تا ۴ هفته پس از دریافت آخرین دوز درمانی دارو و التیام ضایعات، از بیماران ۵ سی‌سی

جدول ۱. میانگین تعداد زخم در بیماران

جنس	تعداد افراد	میانگین زخم‌ها انحراف معیار $\pm$ میانگین	حداقل	حداکثر	محدوده
مرد	۳۸	$4/6 \pm 3/3$	۱	۱۵	۱۴
زن	۶	$4 \pm 2/6$	۲	۹	۷
کل	۴۴	$4/5 \pm 3/2$	۱	۱۵	۱۴

ضایعات، در سرم بیماران افزایش داشت ( $P < 0/001$ ) (نمودار ۱).

همچنین متغیر MCP1 با طیف تغییرات  $17/05 \pm 46/25$  پیکوگرم در میلی لیتر قبل از درمان و با طیف تغییرات  $17/17 \pm 56/62$  پیکوگرم در میلی لیتر بعد از درمان و بهبودی ضایعات، در سرم بیماران افزایش داشت ( $P < 0/001$ ) (نمودار ۲).



نمودار ۲. تغییرات میزان MCP1 قبل و بعد از درمان با داروی گلوکانتیم در بیماران مورد مطالعه

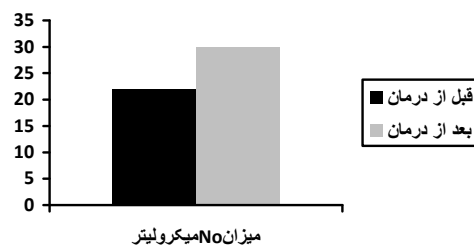
### بحث

Leishmania انگل درون سلولی اجباری است که با ورود به ماکروفاژها، عملکرد طبیعی آنها را مختل کرده، مکانیسم‌های سلولی را به نفع خود تغییر می‌دهد. یکی از مکانیسم‌های انهدام انگل در داخل سلول‌های ماکروفاژها، تولید NO می‌باشد. دو سایتوکاین  $IFN\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) و  $TNF-\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha) باعث افزایش القای آنزیم iNOS (Inducible NO synthase) و تولید NO می‌شوند (۱۳).

دست، پا، صورت و نواحی دیگر بود و زخم‌ها به تعداد متفاوت در این نواحی دیده شدند. در مجموع ضایعات در دست و پا ۷۵ درصد، در صورت ۱۳/۶ درصد و در سایر قسمت‌ها ۱۱/۴ درصد مشاهده شد. بیماران مورد مطالعه ۶۳/۶ درصد ایرانی و ۳۶/۴ درصد افغانی بودند.

جهت تعیین ارتباط بین جنس، سن و تعداد زخم‌ها بر روی ۲ فاکتور MCP1 و NO از آنالیز  $\chi^2$  استفاده شد که هیچ ارتباط معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ).

جهت بررسی رابطه‌ی متغیرهای MCP1 و NO قبل و بعد از درمان از آزمون Paired-t استفاده شد. در این بررسی ملاحظه شد که بین ۲ فاکتور ذکر شده و درمان دارویی با گلوکانتیم رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). متغیر NO با طیف تغییرات  $21/89 \pm 38$  میکرومتر قبل از درمان و با طیف تغییرات  $29/87 \pm 1/19$  میکرومتر بعد از درمان و بهبودی



نمودار ۱. تغییرات NO قبل و از درمان با داروی گلوکانتیم در بیماران مورد مطالعه

و هر پاتوژن داخل سلولی ضروری می‌باشد (۱۸-۱۹). در مطالعه‌ی Laskay و همکاران نشان داده شد که NK Cells و کموکاین‌های دیگری مثل CXCL10/IP10 نیز در التیام ضایعات *Leishmania* نقش دارند؛ بدین صورت که ۲۴ ساعت پس از عفونت با *Leishmania*، NK Cells به محل عفونت مهاجرت می‌کنند و بیان کموکاین CXCL10 نیز افزایش پیدا می‌کند و در نتیجه باعث مقاومت بیشتر در برابر عفونت می‌شوند (۲۰). بنابراین درمان موش‌های BALB/C حساس با کموکاین CXCL10 نوترکیب باعث افزایش NK Cells می‌شود. NK Cell با تولید IFN $\gamma$ ، پاسخ ایمنی را به سمت Th1 هدایت می‌کند و باعث بهبودی سریع‌تر موش‌های آلوده به *Leishmania* می‌گردد (۱۶). در بیماران مبتلا به CL که ضایعات آن‌ها التیام یافته است، میزان بالای کموکاین‌ها از جمله MCP1 باعث افزایش تعداد ماکروفاژها و سلول‌های TCD4<sup>+</sup> در محل عفونت می‌شود؛ ولی در بیماران مبتلا به CL مزمن کاهش سطح کموکاین‌ها و در نتیجه کاهش تعداد ماکروفاژها و سلول‌های TCD4<sup>+</sup> در محل ضایعات دیده شده است (۲۱-۶). در مطالعات انجام شده بر روی بیماران مبتلا به *L. mexicana* که ضایعات آن‌ها التیام پیدا کرده است، غلظت بالایی از MCP1 مشاهده شده است (۸). MCP1 از ماکروفاژهای فعال شده تولید می‌شود و پاسخ ایمنی را به سمت Th1 هدایت می‌نماید، بنابراین نقش مهمی در ایمنی اولیه علیه CL ایفا می‌کند (۲۲-۲۳). در مطالعات *in vitro* نشان داده شده است که MCP1 فعالیت ضد لیشمانیایی در ماکروفاژها را افزایش می‌دهد و این باعث تحریک انفجار تنفسی در مونوسیت‌های انسانی می‌شود. از طرفی، MCP1 با IFN $\gamma$  در فعال‌سازی ماکروفاژها دارای اثر سینرژیست

IFN $\gamma$  فعال‌کننده‌ی پر قدرتی برای فاگوسیت‌های تک هسته‌ای است که موجب غلبه‌ی سلول‌های کمکی به فنوتیپ Th1 می‌گردد. بنابراین یک سایتوکاین کلیدی در پاسخ ایمنی سلولی به عفونت *Leishmania* می‌باشد. این سایتوکاین به طور مستقیم ساخت آنزیم‌های iNOS را که واسطه‌ی انفجار تنفسی هستند تحریک کرده، به ماکروفاژ قدرت از بین بردن انگل‌های بلعیده شده را می‌دهد (۱۴).

یکی از پاسخ‌های ایمونولوژیک پیچیده‌ی دیگر در مقابل اشکال مختلف عفونت *Leishmania*، کموکاین‌ها و گیرنده‌های کموکاینی می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد که ترشح سریع و گذرای کموکاین‌ها و بیان ژن آن‌ها در ماکروفاژهای آلوده با گونه‌های مختلف *Leishmania* باعث کاهش بار انگلی می‌شود. بنابراین کموکاین‌ها در پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی در بیماران CL نقش بسزایی دارند (۱۶-۱۵).

یکی از کموکاین‌های مهم در التیام عفونت *Leishmania*، MCP1 (CCL2) و گیرنده‌ی آن CCR2 می‌باشد. در مطالعه‌ی Quinones و همکاران بر روی موش‌های C57BL/6j و BALB/c نشان داده شد که غیر فعال‌سازی ژنتیکی CCR2 و CCR2/CCL2 منجر به افزایش استعداد ابتلای موش‌ها به عفونت *L. major* می‌شود (۹). نشان داده شده است که بزاق پشه‌ی خاکی باعث بیان MCP1/CCL2 در ماکروفاژهای فعال شده می‌شود (۱۷).

در مطالعه‌ی Traynor و همکاران مشاهده شد که عفونت ریوی با *Aspergillus* و *Cryptococcus* در موش‌هایی که ژن CCR2 آن‌ها حذف شده بود با کاهش IFN $\gamma$  و افزایش Th2 و IgE همراه بود. بنابراین CCR2 برای ایجاد پاسخ ایمنی مناسب علیه *L. major*

که تعداد افرادی که بیش از یک تا دو زخم داشتند، رو به افزایش است. این نکته می‌تواند مؤید تغییر عادت خون‌خواری در پشه‌های خاکی باشد.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه با ارزیابی سطوح MCP1 و NO و مقایسه‌ی کمی آن‌ها در دوره‌های قبل و بعد از درمان، نقش واضح‌تری از این مدیاتورها در بیماران لیشمانیوز، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که رویکردهای درمانی حال حاضر می‌تواند شامل استفاده از کموکاین‌های نو ترکیب برای درمان اشکال مختلف لیشمانیوز باشد، به نظر می‌رسد که نیاز به تحقیقات و مطالعات دقیق‌تری در خصوص ارتقای روش‌های درمانی با فعالیت‌های کموکاینی باشد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه‌ی دانشجویی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی و همچنین طرح تحقیقاتی با کد ۳۹۰۰۰۷ انجام شد. در پایان از مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) و نیز آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی به دلیل حمایت‌های بی‌دریغشان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

است و با IL4 اثر آنتاگونیستی دارد؛ چرا که IL4 تولید MCP1 را توسط مونوسیت‌های آلوده به *Leishmania* کاهش می‌دهد و پاسخ ایمنی را به سمت Th2 هدایت می‌کند. مشاهده شده است که در ضایعاتی که التیام با تأخیر همراه می‌باشد، میزان IL4 از سطح MCP1 بالاتر است. IL4 و IL10 با کاهش iNOS، باعث مهار تولید NO و انفجار تنفسی در ماکروفاژها می‌شوند (۲۴-۲۵).

طی مطالعاتی که توسط Kumar و همکاران بر روی ۳۱ بیمار مبتلا به CL انجام گرفت، نشان داده شد که بالا بودن سطوح MCP1 و NO بعد از درمان نقش بسزایی در التیام هر چه سریع‌تر ضایعات بیماران داشته است (۱۱).

در مطالعه‌ی حاضر با بررسی میزان MCP1 و NO در سرم بیماران مبتلا به CL و مقایسه‌ی کمی آن‌ها، مشاهده شد که میزان MCP1 و NO پس از درمان، بالا مانده بود. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که MCP1، نقش مورد انتظاری را که در مطالعات مشابه نشان داده شده بود، در این مطالعه نیز در این گروه از بیماران داشت. بنابراین MCP1 و NO نقش مهمی در پاسخ ایمنی در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ناشی از *L. major* و بهبودی آنان دارند.

نکته‌ی دیگری در این مطالعه مشاهده شد، این بود

### References

1. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35(11-12): 1169-80.
2. Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, Jaffe CL, Schallig H, Al-Jawabreh A, et al. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol* 2006; 36(2): 237-46.
3. Von SE. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol* 2007; 16(4): 340-6.
4. Carlos Kusano BF, Eduardo LF, Adenilda Cristina HF. Nitric oxide, health and disease. *Journal of APPLIED BIOMEDICINE* 2009; 7(4): 163-73.
5. Ritter U, Frischknecht F, van ZG. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol* 2009; 25(11): 505-10.
6. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2006; 22(1): 32-40.
7. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate

- and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928.
8. Ritter U, Korner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2002; 24(6): 295-301.
  9. Quinones MP, Estrada CA, Jimenez F, Martinez H, Willmon O, Kuziel WA, et al. CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major*. *Parasite Immunol* 2007; 29(4): 211-7.
  10. Kocyigit A, Gur S, Gurel MS, Bulut V, Ulukanligil M. Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2002; 70(12): 6589-91.
  11. Kumar R, Bumb RA, Salotra P. Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors. *Immunology* 2010; 130(2): 193-201.
  12. Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S, Majumdar S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis* 2002; 185(12): 1704-8.
  13. Solbach W, Laskay T. The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol* 2000; 74: 275-317.
  14. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173: 17-26.
  15. Badolato R, Sacks DL, Savoia D, Musso T. *Leishmania major* infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp Parasitol* 1996; 82(1): 21-6.
  16. Vester B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* 1999; 67(6): 3155-9.
  17. Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* 2001; 31(8): 810-4.
  18. Traynor TR, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 2000; 164(4): 2021-7.
  19. Blease K, Mehrad B, Standiford TJ, Lukacs NW, Gosling J, Boring L, et al. Enhanced pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR2<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 2000; 165(5): 2603-11.
  20. Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 1995; 25(8): 2220-7.
  21. Braun MC, Lahey E, Kelsall BL. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol* 2000; 164(6): 3009-17.
  22. Oghumu S, Lezama-Davila CM, Isaac-Marquez AP, Satooskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol* 2010; 126(3): 389-96.
  23. Huang FP, Xu D, Esfandiari EO, Sands W, Wei XQ, Liew FY. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J Immunol* 1998; 160(9): 4143-7.
  24. Moll H. The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Inst Mitt* 1997; (99): 73-8.
  25. van ZG, 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.

## Serum Monocyte Chemotactic Protein-1 and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis Patients before and after Treatment with Glucantime

Faezeh Mohammadi MSc<sup>1</sup>, Manizheh Narimani MSc<sup>2</sup>, Nafise Esmaeil MSc<sup>3</sup>, Hossein Yousefi PhD<sup>4</sup>, Abasali Eskandarian PhD<sup>5</sup>, Seyed Hossein Hejazi PhD<sup>6</sup>

### Abstract

**Background:** It is necessary to recognize the role and function of immune system in wound healing, control, and treatment of cutaneous leishmaniasis (CL). According to the published papers, immune system factors such of monocyte chemotactic protein-1 (MCP1) and nitric oxide (NO) have an impact on wound healing. In this study, the role of these factors on wound healing and their interaction with glucantime in CL patients were investigated.

**Methods:** In a cross-sectional study, 44 (38 males and 6 females) patients who referred to Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, were diagnosed as positive CL using direct microscopy. Before and after treatment with glucantime, 5 ml whole blood samples were obtained from all samples and the sera were incubated at -70°C until use. Serum levels of MCP1 and NO were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method and Grise reaction, respectively. Paired t-test was used to compare NO and MCP1 values before and after treatment.

**Findings:** Improvements in cutaneous lesions and significant elevations in MCP1 and NO levels ( $P < 0.05$ ) were observed after treatment. These findings show a significant association between treatment with glucantime and levels of NO and MCP1 ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The interesting results of this investigation revealed that MCP1 and NO play an important role in wound healing of patients with CL.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, Monocyte chemotactic protein-1, Nitric oxide

<sup>1</sup> Department of Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>2</sup> Department of Cell and Molecular Biology, Central Laboratory, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>3</sup> Lecturer, PhD Student, Student Research Committee, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>6</sup> Associate Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.mui.ac.ir