

Alterations in Gene Expression of Interferon and Tumor Necrosis Factor- α in Human Blood Macrophage-Like Monocytes Induced by Clinical and Standard *Salmonella typhi* Strains *in vitro*

Mehdi Ghanbari Sardari¹, Ramak Yahya Raeyat^{1*}, Mohammadreza Mehrabi² ,

Taghi Zahraiee Salehi¹ , Jalil Mehrzad Salakojani¹ 

1. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Department of laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

 [10.30699/ijmm.15.6.658](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.6.658)



ABSTRACT

Background and Aim: *Salmonella typhi* as a human pathogen stimulates the human immune system and triggers gene expression changing its pathogenesis. Therefore, we aimed to investigate the expression levels of IFN- γ and TNF- α cytokines in human blood macrophage-like monocytes in dealing with clinical and standard samples of *Salmonella typhi* *in vivo*.

Materials and Methods: In this cross-sectional descriptive study, a total of 60 stool samples from patients with gastroenteritis were cultured and biochemical tests were used to diagnose *Salmonella*. Also, venous blood samples were taken for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation, and PBMCs were cultured in a culture medium containing 4×10^3 CFU/mL treatments of *Salmonella typhi* pathogen and standard. Cytotoxicity tests were also performed to determine the concentrations. Finally, quantitative expression levels of IFN- γ and TNF- α were measured and the results were analyzed by statistical tests.

Results: The results of the cytotoxicity test showed the use of *Salmonella typhi* concentrations for treatment in an authorized culture medium at a concentration of 4×10^3 CFU/mL. In comparison to control samples, significantly increased expression levels of the TNF- α gene have been detected in pathogen strain and ATCC strain ($P < 0.05$) ($P = 0.0198$). Furthermore, significantly increased expression levels of the IFN- γ gene have been detected in the pathogen strain and ATCC strain ($P < 0.05$) in comparison to the control sample ($P = 0.0001$).

Conclusion: Increased and significant expression of IFN- γ and TNF- α cytokines in the sample group treated with pathogen strain and ATCC strain indicates polarization of macrophages stimulated by *Salmonella typhi* *in vitro*.

Keywords: IFN- γ , Macrophage, *Salmonella typhi*, TNF- α

Received: 2021/07/28;

Accepted: 2021/11/05;

Published Online: 2021/12/08

Corresponding Information:

Ramak Yahya Raeyat, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran, Email: ryahya@ut.ac.ir



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Ghanbari Sardari M, Yahya Raeyat R, Mehrabi M, Zahraiee Salehi T, Mehrzad Salakojani J. Alterations in Gene Expression of Interferon and Tumor Necrosis Factor- α in Human Blood Macrophage-Like Monocytes Induced by Clinical and Standard *Salmonella typhi* Strains *in vitro*. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (6) :658-675

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

1. Introduction

The genus *Salmonella* consists of rod-shaped, Gram-negative, non-spore-forming, and mostly motile intestinal bacteria with 0.7-1.5 μm in diameter and 2-5 μm in length. These facultative anaerobic bacteria use organic substrates and redox reactions to obtain energy. Most *Salmonella* serovars produce hydrogen

sulfide (H_2S) and are not able to ferment lactose, which can easily be detected by growing in an environment containing iron sulfate. There are more than 2,500 *salmonella* serotypes (serovar) that are classified based on cell wall antigens (O antigen),

flagellar antigens (H antigen), and surface or envelope antigens (1, 2).

Salmonella typhi can colonize in several human organs and is present in the lymph tissues of the small intestine, liver, spleen, and bloodstream of infected patients. Infection in animals is not known and is more common in developing countries with poor health systems and a lack of antibiotics. Typhoid fever is still common in developing countries, affecting approximately 21.5 million people each year (3, 4).

Salmonella is a very successful intestinal pathogen because it has different strategies to deal with the host immune system. Gastrointestinal mucosa, the first innate immune barrier, is a thick layer of mucus that covers the surface of the intestinal epithelium. Other barriers include macrophage cells, which are innate immune-specific phagocytic cells that belong to one of the cell types present in connective tissues. As mobile and fixed cells, they have important effects on the body's innate immune system (5). Macrophages are classified as mononuclear phagocytic cells, which in addition to macrophages, also include monocytes, promonocytes, and their progenitor cells. The main function of these cells is to "cleanse" the blood, lymph, and other tissues by swallowing or phagocytosis of various particles. Macrophages are taken from the bone marrow, distributed throughout the body, and have different shapes and characteristics, often depending on the tissue in which they are found, the degree of differentiation, and the age or life span of the organism in which they are found (Figure 1) (6).

Over the past few years, the analysis of changes in mRNA expression has been explored in many studies. The results showed significant mRNAs expression changes in many infections, such as Salmonellosis. These expression profiles can be used in the treatment, prevention, and diagnosis of infected patients (7, 8). Clinical results obtained from gene expression profiles in different studies have led to different results, which has made their certainty and reproducibility questionable. Of course, it is clear that these differences may be due to the variety of test designs, including patient types, small tissue size, and lack of control samples in the experiments. Although studies of analytical tools have led to these differences and dissatisfaction with the use of these methods, studies still give us good information (9-11).

Classically or alternatively activated macrophages are immune-affecting cells and produce large volumes of lymphokine that are associated with the expression of genes such as IFN- γ , TNF- α , and TNF- β . During the immune response to various infectious agents, M1 and M2 macrophages are activated (12). In immune regulation mechanisms, the polarization of this population forms the basis of homeostasis. One way to confirm polarization is to express the IFN- γ and TNF- α cytokines for phenotype M1 and TGF β for phenotype M2. The aim of this study was to investigate the effect of *Salmonella typhi* on the activity of human blood macrophage-like monocytes *in vitro*. For this purpose, the expression of IFN- γ and TNF- α cytokines are used to confirm the polarization of *Salmonella typhi*-stimulated macrophages (13-16).

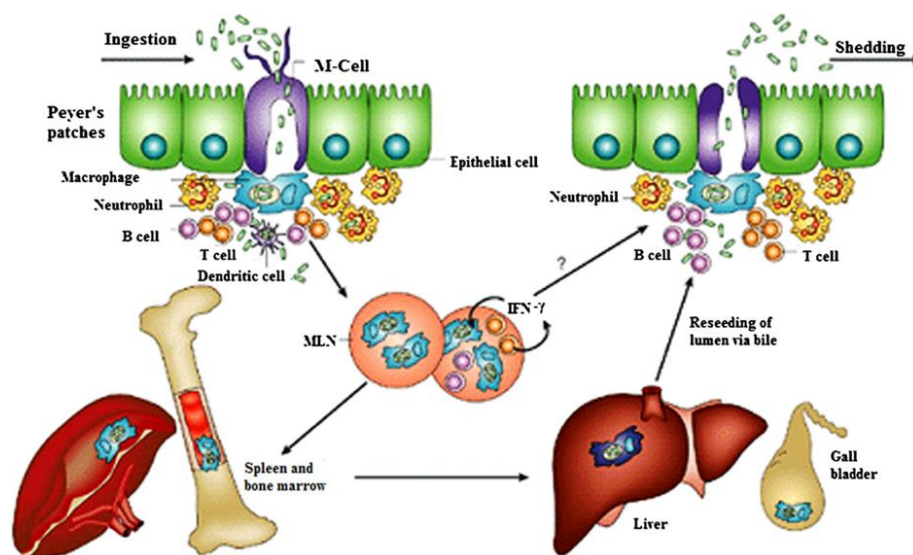


Figure 1. Schematic representation of immune cell interactions in *Salmonella typhi* infection (14).

2. Material and Methods

This cross-sectional descriptive study was performed with ethics code IR.lums.REC.1399.023 in 2021

on 60 samples of feces collected from patients with clinical signs of gastroenteritis admitted to the internal

wards of Ayatollah Boroujerdi, Dr. Chamran, Imam Khomeini, and Kosar hospitals, Boroujerd, Iran. The volunteers were given brief explanations by a specialist and written consent was obtained. A questionnaire was completed to collect patients' demographic information. In this study, people who did not sign a written consent, who had taken antibiotics before sampling, and also had a suppressed immune system were excluded from the study.

Sample Collection

Stool samples were collected in a clean, wide-mouthed plastic container with a tight, leak-free lid. The container was free of preservatives, detergents, metal ions, or toilet paper. At least one gram of stool with normal consistency (about the size of a hazelnut) or 5 mL of diarrhea stool was used for culture. Stool samples were taken fresh and cultured up to 2 hours after sampling.

Isolation and Identification of *Salmonella* sp.

To identify *Salmonella* sp., biochemical tests, including oxidase, nitrate, glucose fermentation, and gas production, TSI (H₂S +), lactose-sucrose-ONPG, IMViC (- + -) were performed. The *Salmonella typhi* ATCC14028 was used as a control purchased from Iran Scientific-Industrial Research Center (17).

Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

First, 15 cc of fresh heparin-containing venous blood was obtained from healthy volunteers. Then, under sterile conditions, an equal amount of phosphate-buffered saline (PBS) was added. Five mL of Ficoll (Inno-train, Germany) was added to 5 mL of blood mixed with PBS in a 15-cc tube. Blood was slowly added, eventually forming two separate phases. It was then centrifuged at 2000 rpm for 30 minutes. After that, a white, cloudy halo formed in the middle, which are PBMC cells. Platelets and plasma were elevated, and red blood cells and granulocytes were precipitated. Finally, PBMCs were gently removed with a Pasteur pipette, and cell survival percentage was counted after staining with trypan blue. PBMCs were then cultured in a flask containing RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, USA), FBS 10% (Fetal Bovine Serum) (Gibco, USA), and Pen-Strep 1%. The flask was incubated at 37°C and 5% CO₂. Monocytic populations were separated from floating cells in a complete cell culture medium by the adhesion technique. Mononuclear cells were attached to the culture medium and transformed into macrophage-like monocyte cells, which confirmed the morphology of macrophage-like monocytes using a contrast phase

microscope. After 3 days, the culture medium was changed, and the cells were passaged in three flasks separately, and each flask was treated (18).

It should be noted that the concentration of stimuli was previously determined by a cytotoxicity test using trypan blue. The results showed the use of *Salmonella typhi* concentrations for treatment in the authorized culture medium at a concentration of 4×10^3 cfu/mL. Under completely sterile conditions, macrophage-like monocytes attached to the culture medium were separated from the flask by a scraper. After washing with serum-free medium (2000 rpm for five minutes), cell sediment was used to study gene expression in the next step.

RNA Extraction with TRIzol

TRIzol™ Reagent Cat Numbers 155960 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) was used to extract RNA from the flask. In addition, RNase / DNase free microtubes, filtered tips, and nuclease-free water were used to prevent DNA contamination. In addition, RNase enzyme (Yekta Tajhiz, Iran) was used to remove extracted RNA.

cDNA Syntheses

Smobio (Taiwan) was used for cDNA synthesis according to the kit instructions. 500 ng of RNA was removed from each sample and reached a volume of 4 µL with water. Then 0.5 µL of dNTPs and 0.5 µL of Oligo dt and Random hexamer primers were added and incubated at 70°C for 5 minutes in a thermocycler device. Then 2 µL of DTT, 2 µL of DEPC water, 0.5 µL of RNase inhibitor and finally 0.5 µL of RT enzyme were added to each microtube. All microtubes were incubated in a thermocycler device for 50 minutes at 45°C.

Expression of TNF-α, IFN-γ using Real-Time PCR

For real-time PCR, Amplicon master mix and SYBR Green were used, which contains fluorescence and, after connecting to double-stranded DNA, emits fluorescent light. Finally, this light is measured by a Real-Time PCR device. In these reactions, the prepared cDNA was used as the template. GAPDH primer was used as an internal control. The sequence of primers used is shown in Table 1.

Statistical Analysis

All data obtained from Real-Time PCR were analyzed using Excel and GraphPad Prism software. Finally, the results were analyzed using the one-way ANOVA test, and statistical results less than 0.05 were considered significant.

Table 1. The sequence of primers for Real-time PCR (37)

Primer	Sequence	Molecular weight
IFN- γ F	TTGGGTTCTCTTGCTGTTA	151bp
IFN- γ R	TTCTGTCACCTCTCCTCTCCA	
TNF- α F	TTGGGTTCTCTTGCTGTTA	251bp
TNF- α R	TTCTGTCACCTCTCCTCTCCA	
GAPDH-F	TGCTGTCTCCCTGTTTGATGTATCT	86 bp
GAPDH-R	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	

3. Results

Sample Collection Results

Sixty patients with clinical signs of gastroenteritis, including 39 men and 21 women with a mean age of

55 \pm 4, were studied. *Salmonella* spp. was isolated from these 60 collected specimens, 3 of which were *Salmonella typhi*.

Table 2. Results of biochemical tests of fecal samples

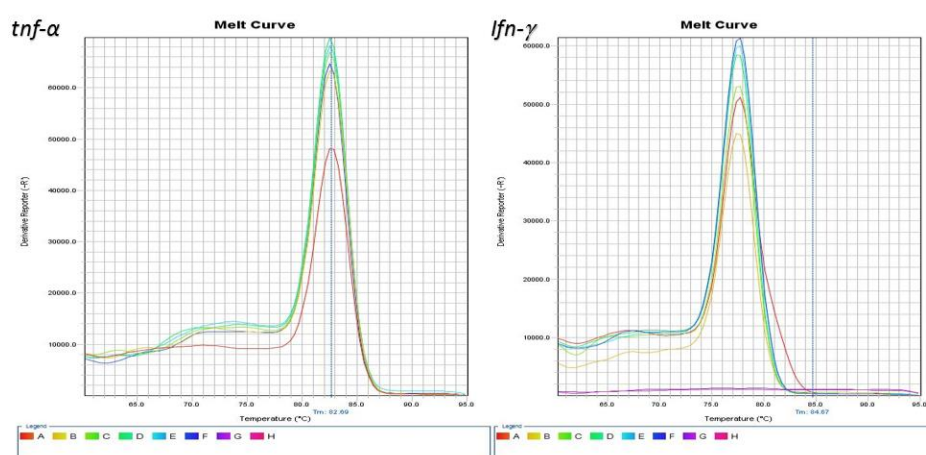
Organism	kIA	H ₂ S	Gas	MR	VP	citrate	LDC	Urease	Arabinose	Ornithin decarboxylase	Rhamnose	Trehalose
Genus: <i>Salmonella</i> <i>Typhi</i>	ALK/A	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+

Results of Specificity and Sensitivity of Primers

In order to design the primers, the mRNA sequence was extracted from the NCBI databases; the desired regions were designed for the target genes by Gene runner. Finally, the regions were specifically approved in the BLAST database.

Investigation of the Specific Amplification of Real-time PCR Products

The final products obtained from Real-time PCR were loaded on 5% agarose gel and electrophoresed to ensure the amplification of specific fragments of each gene and the absence of non-specific products and dimer primers. In addition, the melting curve was used (Figure 2).

**Figure 2.** Melting curve of studied genes such as TNF- α and IFN- γ , which indicates the specificity of their amplification.

Results of TNF- α Gene Expression

Quantitative expression of TNF- α gene in 60 cell culture media grown in medium containing

Salmonella typhi or ATCC14028 standard strain with a concentration of 4×10^3 cfu/mL was measured by Real-Time PCR after RNA extraction and cDNA synthesis.

The results showed that the relative changes in TNF- α gene expression in PBMCs treated with pathogen and ATCC strains both had a significant increase compared to the control sample (p : 0.198). Also, the one-way ANOVA test and Tukey's multiple comparison tests

were used for the group's comparison (Table 3). The increase in TNF- α gene expression in the pathogen group was statistically significant than in the control group.

Table 3. Comparison of TNF- α gene expression in target groups

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Control vs. ATCC	-0.4589	-1.948 to 1.030	No
Control vs. Pathogen	-1.875	-3.364 to -0.3861	Yes
ATCC vs. Pathogen	-1.416	-2.905 to 0.07280	No

Quantitative results of changes in TNF- α gene expression in control samples and in PBMCs treated with the pathogen and ATCC14028 strains are shown in Figure 3, and the multiplication of this gene (folds) in each sample is shown in Table 4.

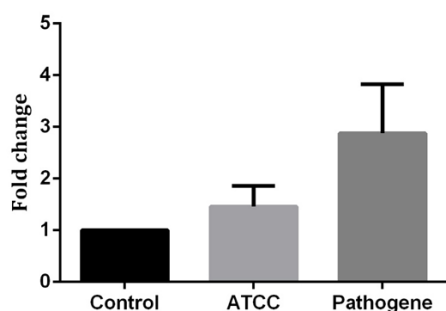


Figure 3. Changes in TNF- α gene expression in control, ATCC, and pathogen samples

Table 4. Expression TNF- α gene

Sample Type	Fold Change
control	1
ATCC	1.45
Pathogen	2.87

Results of IFN- γ Gene Expression

Quantitative expression of IFN- γ gene in the control group, samples treated with the pathogen and ATCC1609 strains was measured by Real-time PCR after RNA extraction and cDNA synthesis. The results showed that the relative changes in IFN- γ gene expression in PBMCs treated with the pathogen and ATCC14028 strains both had a significant increase compared to the control sample ($P=0.001$) (Figure 4). Also, using the One-way ANOVA test and Tukey's multiple comparison test, the groups were compared with each other, and the results are shown in Table 5. A statistically significant increase in IFN- γ gene expression in the pathogen group was observed than the control and ATCC 14028 groups.

Table 5. Comparison of IFN- γ gene expression in control, ATCC 14028 and pathogen

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Control vs. ATCC 14028	-0.1777	-1.103 to 0.7475	No
Control vs. pathogen	-2.010	-2.935 to -1.084	Yes
ATCC vs. pathogen	-1.832	-2.757 to -0.9067	Yes

Quantitative results of changes in IFN- γ gene expression in control samples and in PBMCs treated with the pathogen and ATCC 14028 strains are shown in Figure 4, and the multiplication of this gene (folds) in each sample is shown in Table 6.

Table 6. Multiplication table of INF- γ gene expression

Sample Type	Fold Change
Control	1
ATCC 14028	1.17
Pathogen	3

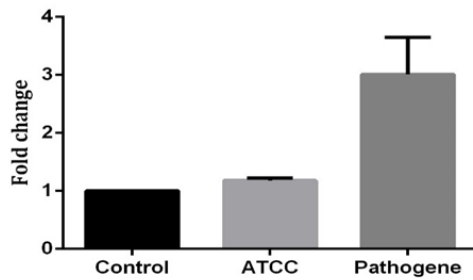


Figure 4. Changes in IFN- γ gene expression in control, ATCC, and pathogen groups

4. Discussion

Studies have shown that disease progression is associated with changes in expression at the genome level. Although the molecular mechanism involved due to these genetic changes is not yet fully understood, researchers have reported the activation of several genes in different cellular pathways. The range of changes in the expression of these genes and the pathways involved in bacterial infection is very diverse and wide. In other words, disease development is a very complex process associated with the abnormal expression of several genes. Therefore, changes in gene expression can be used as a biomarker in the diagnosis of disease (19, 20). Therefore, these changes can be used to diagnose Salmonellosis and to study the mechanism of action of the immune system and bacteria against each other.

S. typhi pathogenesis, like other Salmonella, is complex and multifactorial. This microorganism causes a wide and diverse set of infections (21). *S. typhi* pathogenicity depends on its ability to attack cells and form a protective lipopolysaccharide (LPS), the presence of Vi antigen, and the production of invasins (inv genes), a protein that attacks non-phagocytic cells; where bacteria can survive and multiply intracellularly (22, 23). These factors in the host cause immune system reactions.

In the 1990s, IL-4 was discovered to have different effects on macrophage gene expression compared to IFN- γ and LPS. In contrast to classical macrophage activation by IFN- γ , IL-4-induced macrophage gene expression was described as "alternative activation". A few years later, in 2000, Mills *et al.* proposed a new classification of macrophages as M1 or M2. These terms derive from the observation of macrophage arginine metabolism in mice by working on T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) (24, 25).

Th1 that produces more IFN- γ showed macrophage activation in which nitric oxide (NO) is produced from arginine, whereas ornithine is produced from Th2, which produces IL-4 and TGF β 1. This finding led to a consensus in the scientific community that M1

macrophages (classical activators) exhibit inflammatory functions, while M2 macrophages (alternative activators) exhibit anti-inflammatory functions (26). In 2004, Mantowani *et al.* further subdivided M2 macrophages into subgroups M2a, M2b, M2c, and M2d based on stimuli applied and the resulting transcriptional changes. Classification of M1 / M2 macrophages is currently considered a fairly simple method that does not adequately describe the population spectrum of macrophages (27).

For example, identifying tumor-associated macrophages (TAMs), which do not fit well into the M1 or M2 macrophage criteria, complicates the system. In addition, macrophages expressing T cell and CD169 receptors have been identified. The phenotype of macrophage subsets M1 and M2 and the function of macrophages derived from monocyte precursors are differentiated depending on the local tissue environment (28). They respond to environmental signals in tissues such as damaged cells, activated lymphocytes, or microbial products to distinguish distinct functional phenotypes. The M1 macrophage phenotype is characterized by the production of high levels of proinflammatory cytokines, the ability to resist pathogens, strong antimicrobial properties, the production of highly reactive nitrogen and oxygen mediators, and the enhancement of Th1 responses. In contrast, M2 macrophages are characterized by their efficient control of parasitic infection, tissue regeneration, immune regulation, tumor promotion, and efficient phagocytic activity (25). Therefore, in this study, the expression of genes related to cytokines TNF- α and IFN- γ was prioritized.

LPS, IFN- γ , and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) polarize macrophages toward the M1 phenotype, which secretes large amounts of cytokines such as IL-1- β , TNF, IL-12, IL-18, and IL-23. This helps to properly carry out the inflammatory responses of Th1 and Th17 cells specific for antigens (29). Typically, M1 macrophages stimulate high levels of class II tissue adaptation complexes, CD68 markers, and CD80 and CD86 molecules. M1 macrophages have also been shown to regulate SOCS3 expression and activate NOS2 to produce NO from L-arginine. In the context of disease, M1 macrophages are involved in initiating and maintaining inflammation, so they can be harmful to health (30).

Macrophages M1 and M2 have different chemokine and chemokine receptor profiles, with M1 secreting Th1-absorbing chemokines such as C1 in CXCL9 and CXCL10, and M2 secreting CCL17, CCL22, and CCL24. Recently, it has been shown that macrophages are able to repolarize from M2 to M1 *in vitro*, and reverse polarization depends on the chemokine environment.

Signaling molecules are involved in M1 / M2 polarization. A network of transcription factors and post-transcriptional regulators are involved in M1 / M2 polarization (Figure 5). Interferon regulatory factor (IRF), STAT, and SOCS are all involved in the deviation of macrophage function towards the M1 or M2 phenotype (31, 32). IRF / STAT pathways activated

by IFNs and TLR signaling polarize macrophages via STAT1 to M1 activation mode (33). M1 macrophages have been shown to regulate IRF5, which is involved in M1 polarization for M1 polarization and the whole STAT1-alpha / beta in an independent manner via MyD88 (27).

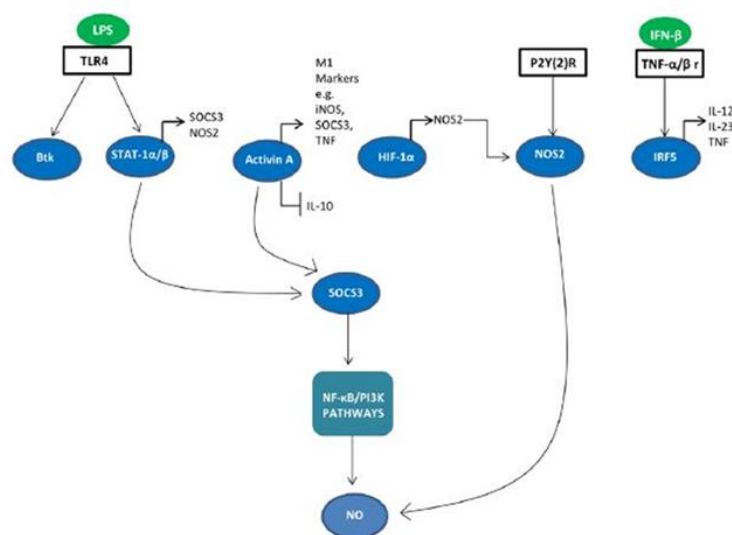


Figure 5. Signaling molecules involved in M1 polarization

In the present study, the gene expression of IFN- γ and TNF- α cytokines was evaluated to confirm the polarization of *Salmonella typhi*-stimulated macrophages *in vitro* in two groups of clinical and standard strains of *S. typhi*. The results of gene expression analysis showed both genes have increased in expression in clinical and standard strains of *S. typhi* compared to the control group. This increase in expression was significant in the clinical strain of *S. typhi*, which was higher than the standard strain.

In a study conducted by Ami Febriza in 2020 to measure TNF- α on blood samples of *S. typhi*-infected mice using the ELISA method, it was found that TNF- α levels in infected samples increased and treatment of mice with antibiotics leads to its reduction (34). In addition, IFN- γ has been shown to play a vital role in resistance to *S. typhi* infection by increasing the antibacterial activity of macrophages. It has also recently been shown that IFN- γ and TNF- α activate the JAK / STAT1 / IRF pathway in mice infected with COVID-19 infection, leading to lethal cytokine shock, and therefore death from COVID-19 can be prevented by using neutralizing antibodies against them (14). In a study conducted in 2019, the relationship between the profiles of IFN- γ and TNF- α -producing cells and liver and kidney damage in hepatitis B virus infection was found (35). As a result, according to the studies, changes in the

expression of IFN- γ and TNF- α cyto-kines can be used to identify *S. typhi*-related infections (36).

However, it should be noted that the present study could not investigate all the molecular aspects of polarization of macrophages and cytokines in the study and it is suggested that for better understanding of molecular pathways, more experiments be performed.

5. Conclusion

The increased expression of IFN- γ and TNF- α in both clinical and standard strains of *S. typhi* compared to the control group confirms their role in macrophage polarization. Therefore, we can use their expression changes as a molecular biomarker in the diagnosis of Salmonella-related infections.

Acknowledgment

The authors would like to thank all the people who helped in the various stages of this research. The Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran is also commended for providing the location and experimental materials, as well as the Department of Laboratory Sciences of the Islamic Azad University, Boroujerd Branch.

Funding

This article is taken from the PhD thesis in bacteriology, which was done in collaboration with the University of Tehran Research Council, and the relevant resources were provided by the Vice-Chancellor for Research, University of Tehran.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest among the authors.

References

- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(2):112-8. [DOI:10.1038/sj.icb.7100007] [PMID]
- Herrero-Fresno A, Olsen JE. *Salmonella typhimurium* metabolism affects virulence in the host - A mini-review. *Food Microbiol.* 2018;71:98-110. [DOI:10.1016/j.fm.2017.04.016] [PMID]
- Ramachandran G, Panda A, Higginson EE, Ateh E, Lipsky MM, Sen S, et al. Virulence of invasive *Salmonella typhimurium* ST313 in animal models of infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(8):e0005697. [DOI:10.1371/journal.pntd.0005697] [PMID] [PMCID]
- Sun H, Wan Y, Du P, Bai L. The Epidemiology of Monophasic *Salmonella typhimurium*. *Foodborne Pathog Dis.* 2020;17(2):87-97. [DOI:10.1089/fpd.2019.2676] [PMID]
- Broz P, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes.* 2012;3(2):62-70. [DOI:10.4161/gmic.19141] [PMID] [PMCID]
- Linehan SA, Holden DW. The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host-what can it teach us about innate immunity? *Immunol Lett.* 2003;85(2):183-92. [DOI:10.1016/S0165-2478(02)00227-4]
- Bazrgari N, Garoosi GA, Dadar M. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Clinical Isolates of *Brucella melitensis* Based on Gene Polymorphism of β Subunit of RNA Polymerase (rpoB) Gene in Iran. *Iran J Med Microbiol.* 2020;14(5):425-40. [DOI:10.30699/ijmm.14.5.425]
- Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, Hancock RE, Finlay BB. *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J Immunol.* 2000;164(11):5894-904. [DOI:10.4049/jimmunol.164.11.5894] [PMID]
- Khezri M, Rezaei M, Mohabbati Mobarez A. Detection of viable but non-culturable state of *Escherichia coli* O157: H7 using reverse transcription PCR. *Iran J Med Microbiol.* 2019;12(6):390-8. [DOI:10.30699/ijmm.12.6.390]
- Monson MS, Bearson BL, Sylte MJ, Looft T, Lamont SJ, Bearson SMD. Transcriptional response of blood leukocytes from turkeys challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK1. *Vet Immunol Immunopathol.* 2021;232:110181. [DOI:10.1016/j.vetimm.2020.110181] [PMID]
- Sheikh A, Charles RC, Sharmeen N, Rollins SM, Harris JB, Bhuiyan MS, et al. In vivo expression of *Salmonella enterica* serotype Typhi genes in the blood of patients with typhoid fever in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1419. [DOI:10.1371/journal.pntd.0001419] [PMID] [PMCID]
- Bardi GT, Smith MA, Hood JL. Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine.* 2018;105:63-72. [DOI:10.1016/j.cyto.2018.02.002] [PMID] [PMCID]
- Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1801. [DOI:10.3390/ijms19061801] [PMID] [PMCID]
- Kaur J, Jain SK. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol Res.* 2012;167(4):199-210. [DOI:10.1016/j.micres.2011.08.001] [PMID]
- Kim JE, Phan TX, Nguyen VH, Dinh-Vu HV, Zheng JH, Yun M, et al. *Salmonella typhimurium* Suppresses Tumor Growth via the Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin-1beta. *Theragnostic.* 2015;5(12):1328-42. [DOI:10.7150/thno.11432] [PMID] [PMCID]
- Sheppe AEF, Kummari E, Walker A, Richards A, Hui WW, Lee JH, et al. PGE2 Augments Inflammasome Activation and M1 Polarization in Macrophages Infected with *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. *Front Microbiol.* 2018;9:2447. [DOI:10.3389/fmicb.2018.02447] [PMID] [PMCID]
- Hojati P. Isolation and identification of *Salmonella* poultry ERic-PCR and serological methods (Doctoral dissertation, Dissertation of Poultry Veterinary. Tehran. Science and Research Azad University. 1997. [in Persian])
- Panda SK, Ravindran B. Isolation of human PBMCs. *Bio-protocol.* 2013;3(3):e323-e. [DOI:10.21769/BioProtoc.323]
- Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, Leonardson AS, Zink F, Zhu J, et al. Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature.* 2008;452(7186):423-8. [DOI:10.1038/nature06758] [PMID]
- Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, GuhaThakurta D, et al. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet.* 2005;37(7):710-7. [DOI:10.1038/ng1589] [PMID] [PMCID]
- Dos Santos AMP, Ferrari RG, Conte-Junior CA. Virulence Factors in *Salmonella typhimurium*: The Sagacity of a Bacterium. *Curr Microbiol.* 2019;76(6):762-73. [DOI:10.1007/s00284-018-1510-4] [PMID]
- Furter M, Sellin ME, Hansson GC, Hardt WD. Mucus Architecture and Near-Surface Swimming Affect Distinct *Salmonella Typhimurium* Infection Patterns along the Murine Intestinal Tract. *Cell Rep.*

- 2019;27(9):2665-78 e3. [DOI:10.1016/j.celrep.2019.04.106] [PMID] [PMCID]
23. Herman R, Bennett-Ness C, Maqbool A, Afzal A, Leech A, Thomas GH. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence factor STM3169 is a hexuronic acid binding protein component of a TRAP transporter. *Microbiology*. 2020;166(10):981. [DOI:10.1099/mic.0.000967] [PMID] [PMCID]
24. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol*. 2014;5:603. [DOI:10.3389/fimmu.2014.00603]
25. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 2011;89(4):557-63. [DOI:10.1189/jlb.0710409] [PMID] [PMCID]
26. Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget*. 2018;9(25):17937. [DOI:10.18632/oncotarget.24788] [PMID] [PMCID]
27. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:1084. [DOI:10.3389/fimmu.2019.01084] [PMID] [PMCID]
28. Weyand CM, Zeisbrich M, Goronzy JJ. Metabolic signatures of T-cells and macrophages in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol*. 2017;46:112-20. [DOI:10.1016/j.coi.2017.04.010] [PMID] [PMCID]
29. Liu L, Guo H, Song A, Huang J, Zhang Y, Jin S, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- κ B, MyD88 and MAPK pathways. *BMC Immunol*. 2020;21(1):32. [DOI:10.1186/s12865-020-00355-y] [PMID] [PMCID]
30. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*. 2014;5:532. [DOI:10.3389/fimmu.2014.00532] [PMID] [PMCID]
31. Jimenez-Garcia L, Higuera MA, Herranz S, Hernandez-Lopez M, Luque A, de Las Heras B, et al. A hispanolone-derived diterpenoid inhibits M2-Macrophage polarization in vitro via JAK/STAT and attenuates chitin induced inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2018;154:373-83. [DOI:10.1016/j.bcp.2018.06.002] [PMID]
32. Qin H, Holdbrooks AT, Liu Y, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol*. 2012;189(7):3439-48. [DOI:10.4049/jimmunol.1201168] [PMID] [PMCID]
33. Platanitis E, Decker T. Regulatory Networks Involving STATs, IRFs, and NF κ B in Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:2542. [DOI:10.3389/fimmu.2018.02542] [PMID] [PMCID]
34. Febriza A, Natzir R, Hatta M, As'ad S, Kaelan C, Kasim VN, et al. The Role of IL-6, TNF- α , and VDR in Inhibiting the Growth of *Stylyria*. *Open Microbiol*. 2020;14(1). [DOI:10.2174/1874285802014010065]
35. Wang H, Luo H, Wan X, Fu X, Mao Q, Xiang X, et al. TNF- α /IFN- γ profile of HBV-specific CD4 T cells is associated with liver damage and viral clearance in chronic HBV infection. *Journal of hepatology*. 2020;72(1):45-56. [DOI:10.1016/j.jhep.2019.08.024] [PMID]
36. Hu JL, Yu H, Kulkarni RR, Sharif S, Cui SW, Xie MY, et al. Modulation of cytokine gene expression by selected *Lactobacillus* isolates in the ileum, caecal tonsils and spleen of *Salmonella*-challenged broilers. *Avian Pathol*. 2015;44(6):463-9. [DOI:10.1080/03079457.2015.1086725] [PMID]
37. Gao J, Wu Y, Su Z, Amoah Barnie P, Jiao Z, Bie Q, et al. Primers used in real-time PCR. [Internet]. PLOS ONE; 2015 [cited 2021Dec22]. Available from: [https://plos.figshare.com/articles/dataset/ Primers_used_in_real_time_PCR_/1148102/1](https://plos.figshare.com/articles/dataset/Primers_used_in_real_time_PCR_/1148102/1)



تغییرات بیان ژن سائتوکاین های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ منوسیت های شبه ماکروفاژ خون انسان در مجاورت نمونه های بالینی و استاندارد سالمونلا تیفی در شرایط برون تن

مهدی قنبری سرداری^۱، رامک یحیی رعیت^{۱*}، محمد رضا مهرابی^۲، تقی زهرایی صالحی^۱، جلیل مهرزاد سلاکجانی^۱

۱. گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سالمونلا تیفی یک پاتوژن انسانی است که موجب تحریک سیستم ایمنی انسان و ایجاد تغییرات در سطح بیان ژن ها در مسیر بیماری زایی اش می شود؛ لذا هدف این مطالعه، بررسی تغییرات بیان ژن سائتوکاین های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ منوسیت های شبه ماکروفاژ خون انسان در برخورد با نمونه های بالینی و استاندارد سالمونلا تیفی در شرایط برون تنی است. **مواد و روش کار:** در این مطالعه مقطعی-توصیفی مدفع ۶۰ بیمار مبتلا به گاستروانتریت کشت داده شده و برای تشخیص سالمونلا از تست های بیوشیمیایی استفاده شد. همچنین از افراد نمونه خون وریدی برای جداسازی peripheral blood mononuclear cell (PBMC) گرفته شد و PBMCها در محیط کشت، حاوی تیمارهای 4×10^3 cfu/mL از سالمونلا تیفی پاتوژن و استاندارد کشت شدند. تست سمیت سلولی برای تعیین غلظت ها نیز انجام شد. در نهایت بیان کمی ژن های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ سنجیده شد و نتایج با آزمون های آماری، تحلیل گردید.

یافته ها: نتایج تست سمیت سلولی، استفاده از غلظت 4×10^3 cfu/mL سالمونلا تیفی را برای تیمار در محیط کشت مجاز نشان داد که استفاده شد. تغییرات نسبی بیان ژن سائتوکاین های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ در PBMC های تیمار شده با سویه پاتوژن و سویه ATCC14028 به ترتیب افزایش معناداری نسبت به نمونه کنترل داشت ($P=0/0198$, $P=0/0001$). **نتیجه گیری:** بیان افزایش یافته و معنی دار سائتوکاین های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ در گروه نمونه تیمار شده با سویه پاتوژن و سویه ATCC نشان دهنده پلاریزاسیون ماکروفاژهای تحریک شده با سالمونلا تیفی در شرایط آزمایشگاهی است.

کلید واژه ها: سالمونلا تیفی، $IFN-\gamma$ ، $TNF-\alpha$ ، ماکروفاژ
کپی رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۶

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۴

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۹/۱۷

موضوع: میکروبی شناسی مولکولی

نویسنده مسئول:

رامک یحیی رعیت

گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی،
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران،
ایران

ایمیل:

ryahya@ut.ac.ir

مقدمه

سالمونلا تیفی یک پاتوژن با قابلیت کلونیزه شدن در چند ارگان انسان است که در بافت های لنفاوی روده کوچک، کبد، طحال و جریان خون انسان های آلوده حضور دارد. آلودگی در حیوانات شناخته شده نیست و بیشتر در کشورهای در حال توسعه با سیستم بهداشتی ضعیف و کمبود آنتی بیوتیک دیده می شود. تب تیفوئید هنوز در کشورهای در حال توسعه رایج است، جایی که هر ساله حدود ۲۱/۵ میلیون نفر را مبتلا می کند (۳، ۴).

سالمونلا یک پاتوژن روده بسیار موفق است، زیرا برای مقابله با بیشتر عوامل و مکانیسم های سیستم ایمنی بدن که در مراحل مختلف بیماری توسط میزبان استفاده می شود، استراتژی هایی ایجاد کرده است. مکانیسم های ایمنی ذاتی مخاط گوارشی یکی از

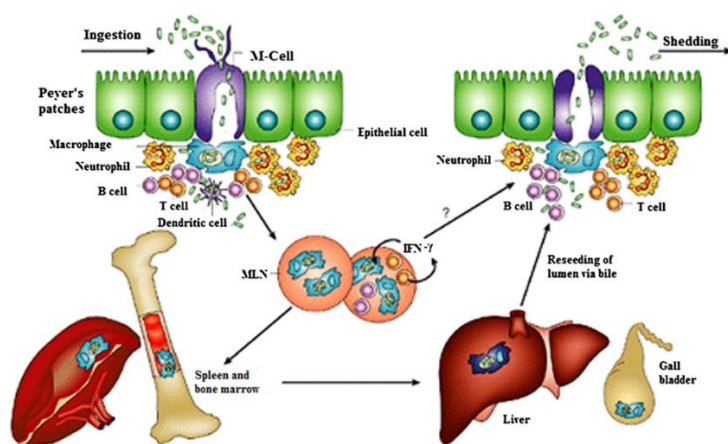
جنس سالمونلا شامل باکتری های روده ای میله ای شکل، گرم منفی، غیر تشکیل دهنده اسپور و عمدتاً متحرک است که ۰/۷ تا ۱/۵ میکرون قطر و ۲ تا ۵ میکرون طول دارند. این باکتری ها بی هوازی های اختیاری هستند که از بسترهای آلی و واکنش های کاهش اکسیداسیون برای انرژی استفاده می کنند. اکثر سروواهای سالمونلا سولفید هیدروژن تولید می کنند و قادر به تخمیر لاکتوز نیستند و با رشد در محیط حاوی سولفات آهن به راحتی قابل تشخیص هستند. بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ (سرووار) سالمونلا وجود دارد که بر اساس آنتی ژن های دیواره سلولی (آنتی ژن O)، آنتی ژن های تاژکی (آنتی ژن H) و آنتی ژن های سطحی یا پاکت دسته بندی می شوند (۱، ۲).

نتایج کلینیکی حاصل از پروفایل بیان ژنی در مطالعات مختلف، اعداد، ارقام و نتایج مختلفی را در پی داشته است که باعث شده قطعیت این نتایج و تکرارپذیری نتایج به دست آمده زیر سوال برود. البته به طور واضح مشخص است که این تفاوتها می توانند به دلیل تنوع طراحی های آزمایش شامل انواع بیماران، اندازه کوچک بافتها و عدم وجود نمونه کنترل در آزمایشها باشد. اگرچه مطالعات میکروآرای و ابزارهای آنالیزکننده دیگر باعث شده تا این اختلافها و نارضایتیها برای استفاده از این روشها به وجود آید، اما هنوز مطالعات اطلاعات خوبی به ما می دهد (۹-۱۱).

ماکروفازهایی که به صورت کلاسیک یا آلترناتیو فعال می شوند، سلولهای اثرگذار ایمنی هستند و حجم زیادی از لنفوکاین را تولید می کنند که با بیان ژنهایی مانند $IFN-\gamma$ ^۱، $tnf-\beta$ و $TNF-\alpha$ ^۳ همراه هستند. در جریان پاسخ ایمنی در مقابل عوامل عفونی مختلف ماکروفازهای M1 و ماکروفازهای M2 فعال می شوند (۱۲). در مکانیسمهای تنظیم ایمنی، پلاریزاسیون این جمعیت، اساس هومئوستاز را تشکیل می دهد. یکی از راههای تایید پلاریزاسیون، بیان سایتوکاینهای $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ برای فنوتیپ M1 و $TGF\beta$ برای فنوتیپ M2 است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سالمونلا تیفی بر فعالیت منوسیتهای شبه ماکروفاز خون انسان در شرایط برون تن است و بدین منظور از بیان سایتوکاینهای $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ در جهت تایید پلاریزاسیون ماکروفازهای تحریک شده با سالمونلا تیفی در شرایط آزمایشگاهی استفاده می شود (۱۳-۱۶).

اولین موانعی است که سالمونلا با آن روبروست و لایه ضخیمی از مخاط است که سطح اپیتلیوم روده را می پوشاند و یک مانع اولیه را ایجاد می کند، که برای تماس مستقیم با اپیتلیوم باید به آن نفوذ کرد. از دیگر موانع می توان به سلولهای ماکروفاز اشاره کرد. ماکروفازها سلولهای فاگوسیتی اختصاصی ایمنی ذاتی هستند که به یکی از انواع سلولهای موجود در بافتهای همبند تعلق دارند. آنها به عنوان سلولهای متحرک و ثابت تأثیرات مهمی در سیستم ایمنی ذاتی بدن دارند (۵). ماکروفازها در گروه فاگوسیتیکهای تک هسته ای طبقه بندی می شوند که علاوه بر ماکروفازها، مونوسیتها، پرومونوسیتها و سلولهای پیش ساز آنها را نیز شامل می شود. عملکرد اصلی سلولهای متعلق به این سیستم "پاک کردن" خون، لنف و سایر بافتها با بلع یا فاگوسیتوز ذرات مختلف است. ماکروفازها از مغز استخوان گرفته می شوند، در سراسر بدن توزیع می شوند و دارای اشکال و ویژگیهای مختلفی هستند که اغلب به بافتی که در آن یافت می شود، درجه تمایز آنها و سن یا زمان زندگی ارگانیسمی که در آن یافت می شود، بستگی دارد (شکل ۱) (۶).

طی چند سال گذشته آنالیز تغییرات بیان mRNA ها، در بسیاری از مطالعات مورد کاوش و تحقیق قرار گرفته است. بسیاری از mRNAها تغییرات بیانی چشمگیری را در بسیاری از عفونتها مانند عفونت حاصل از سالمونلا نشان دادند. پروفایل بیان mRNAها گویای این قضیه هستند که می توان از تغییرات بیان mRNAها در روندهای درمانی، پیشگیری و تشخیص افراد مبتلا به بیماری استفاده کرد (۷، ۸).



شکل ۱. شماتیکی از تعاملات و واکنشهای سلولهای ایمنی در عفونت سالمونلا تیفی (۱۴).

³ Tumor necrosis factor alpha

¹ Interferon gamma

² Tumor necrosis factor beta

مواد و روش‌ها

این پژوهش مقطعی-توصیفی با کد اخلاق IR.lums.REC.1399.023 در سال ۱۴۰۰ بر روی ۶۰ نمونه از مدفوع جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بخش‌های داخلی بیمارستان‌های آیت اله بروجردی، شهید دکتر چمران، امام خمینی(ره) و کوثر شهر بروجرد، ایران، با علایم بالینی گاستروآنتریت، به منظور جداسازی سویه *Salmonella* تیپیفی انجام گردید. لازم به ذکر است که به افراد داوطلب توضیحات اجمالی توسط متخصص ارائه شده و موافقت کتبی برای دریافت نمونه و بررسی‌های آزمایشگاهی ه اخذ شد و بیماران پرسش‌نامه‌ای که برای جمع‌آوری اطلاعات دموگرافیک آنها نیاز بود، و پرسش‌نامه تکمیل گردید. در این مطالعه افرادی که موافقت‌نامه کتبی را امضا نکردند و یا پیش از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک مصرف کرده بودند و همچنین سیستم ایمنی سرکوب شده داشتند، از مطالعه حذف شدند.

جمع‌آوری نمونه

نمونه مدفوع در ظرف پلاستیکی تمیز، دهان‌گشاد با درپوش محکم و فاقد نشستی جمع‌آوری شد. این ظرف عاری از مواد نگهدارنده، شوینده، یون‌های فلزی یا کاغذ توالیت بود. حداقل یک گرم مدفوع با قوام طبیعی (به اندازه یک فندق) یا ۵ میلی‌لیتر مدفوع اسهالی برای کشت استفاده شد. نمونه مدفوع تازه گرفته شد و در مدت ۳۰ دقیقه و حداکثر ۲ ساعت بعد از نمونه‌گیری کشت داده شد.

مردان و زنانی در این مطالعه وارد شدند که علائم مربوط به بیماری سالمونلا تیپیفی را داشتند و بعد از مشخص شدن این بیماری، بیماری دیگری نداشتند و پس از تایید این مرحله، پرسش و پاسخ مربوط به مصرف دارو و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده از آن‌ها انجام شد و بیمارانی که دارو و آنتی‌بیوتیک مصرف کردند، از مطالعه خارج شدند.

جداسازی و تشخیص سالمونلا

برای هر ۶۰ نمونه مدفوع بعد از کشت، تست‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، نیترات، تخمیر گلوکز و تولید گاز، TSI(H₂S+), لاکتوز-سوکروز-ONPG، IMViCC(++++)، انجام شد. نمونه استاندارد سالمونلا تیپیفی ATCC14028 به‌عنوان کنترل از مرکز پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران تهیه شد (۱۷).

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

ابتدا ۱۵ سی‌سی خون وریدی تازه حاوی هپارین از یک داوطلب سالم تهیه شد. سپس در شرایط استریل و زیر هود به میزان برابر با فسفات بافر سالین مخلوط شد. در یک فالکون ۱۵ سی‌سی به اندازه ۵ میلی‌لیتر فایکول (Inno-train, Germany) و سپس ۵ میلی‌لیتر خون مخلوط شده با فسفات بافر سالین اضافه شد. خون به آرامی از دیواره اضافه شد و در نهایت دو فاز مجزا تشکیل شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور 2000 rpm سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ هاله سفید رنگ و ابری در وسط شکل گرفت که سلول‌های PBMC هستند. پلاکت‌ها و پلاسما بالاتر قرار گرفتند و گلبول قرمز و گرانولوسیت‌ها رسوب کردند. در نهایت PBMC‌ها با پیپت پاستور به آرامی برداشته شدند و با تریپان بلو شمارش و درصد حیات تعیین شد. سپس PBMC‌ها در فلاسک کشت با محیط کشت RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, USA) و FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) به مقدار ۱۰ درصد و در نهایت آنتی‌بیوتیک پن استرپ ۱ درصد کشت داده شدند. فلاسک در انکوباتور با دمای ۳۷°C و جریان ۵ درصد CO₂ انکوبه شد. جمعیت مونوسیتی با تکنیک چسبندگی از سلول‌های شناور در محیط کامل کشت سلول تفکیک شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای به بستر کشت متصل و به سلول‌های منوسیت‌های شبه ماکروفاژی تبدیل شدند که با به‌کارگیری میکروسکوپ فاز کنتراست، مورفولوژی منوسیت‌های شبه ماکروفاژی تایید گردید. پس از ۳ روز کشت، تعویض محیط کشت صورت گرفت و سپس سلول‌ها در سه فلاسک به طور جداگانه پاساژ داده شدند و هر فلاسک تحت تیمار قرار گرفت (۱۸).

لازم به ذکر است که غلظت محرک‌های مورد تیمار با سلول‌ها پیش از این با انجام تست تعیین سمیت سلولی به کمک تریپان بلو تعیین شد. نتایج تست سمیت سلولی، استفاده از غلظت‌های سالمونلا تیپیفی را برای تیمار در محیط کشت مجاز نشان داد که از غلظت 4×10^3 cfu/ml استفاده شد. انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷°C و جریان ۵ درصد CO₂ انجام گرفت. در شرایط کاملاً استریل منوسیت‌های شبه ماکروفاژی متصل به بستر کشت توسط اسکرابر از فلاسک جدا شدند و پس از شستشو با محیط بدون سرم (سانتریفیوژ دور ۲۰۰۰ به مدت پنج دقیقه) ته

ماکرولیتر RNase inhibitor و در نهایت ۰/۰۵ ماکرولیتر آنزیم RT اضافه شد. همه میکروتیوبها به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سلسیوس در دستگاه PCR انکوبه شدند.

بررسی بیان ژن های $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ و $GAPDH$ به عنوان ژن رفرانس با استفاده از تکنیک Real Time PCR
برای انجام Real-time PCR از مستر میکس Amplicon استفاده شده است و رنگ مورد استفاده در این مستر میکس SYBR Green است که حاوی فلورسانس است و پس از اتصال به DNA دورشته‌ای از خود نور فلورسانس ساطع می‌کند و در نهایت این نور به وسیله دستگاه Real-time اندازه‌گیری می‌شود. در این واکنش‌ها، template، cDNA ساخته شده در مراحل قبل بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

آنالیز داده‌ها

تمام داده‌های حاصل از Real Time که به صورت Ct است با استفاده از برنامه Excel و Graphpad prism مورد آنالیز و در انتها نتایج با استفاده از آزمون One way Anova مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آماری کمتر از ۰/۰۵ مورد قبول و معنادار تلقی شده است.

نشین سلولی برای انجام تمهیدات بررسی بیان ژن در مرحله بعدی استفاده شد.

استخراج RNA با ترايزول

برای استخراج RNA از فلاسک از ترايزول TRIzol™ (Thermo Cat Reagent ۱۸ سی سی 155960) استفاده شد. علاوه بر این برای جلوگیری از آلودگی DNA و حذف RNA استخراج شده توسط آنزیم RNase (Fisher Scientific, Inc. Yekta Tajhiz, Iran) از میکروتیوب‌های RNase/ DNase free و سرسمپله‌های فیلتردار و آب عاری از نوکلئاز استفاده شد.

ساخت cDNA

کیت مورد استفاده برای سنتز cDNA، Smobio (Taiwan) بود. مراحل سنتز طبق دستورالعمل کیت انجام شد. از هر نمونه ۵۰۰ نانوگرم RNA برداشته شد و با آب به حجم ۴ میکرولیتر رسید. سپس ۰/۵ ماکرولیتر dNTPs و ۰/۵ ماکرولیتر پرایمرهای Oligo dt و Random hexamer اضافه شد و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه در دستگاه PCR انکوبه شد. سپس به هر میکروتیوب ۲ میکرولیتر DTT، ۲ میکرولیتر آب DEPC، ۰/۵

جدول ۱. پرایمرهای ژن‌ها برای Real time PCR (۳۷)

نام پرایمر	توالی	وزن مولکولی محصول
IFN- γ F	TTGGGGTCTCTGGCTGTTA	151bp
IFN- γ R	TTCTGTCACTCTCCTCCTCCA	
TNF- α F	TTGGGGTCTCTGGCTGTTA	251bp
TNF- α R	TTCTGTCACTCTCCTCCTCCA	
GAPDH-F	TGCTGTCTCCCTGTTTGATGTATCT	86 bp
GAPDH-R	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	

یافته‌ها

میان نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۶۰ نمونه کشت مثبت سالمونلا داشتند. تعداد ۳ نمونه جمع‌آوری شده سالمونلا تیفی گزارش شد. نتایج تست های بیوشیمیایی نمونه های مدفوع در جدول ۲ آمده است.

نتایج جمع آوری نمونه‌ها

۶۰ بیمار مبتلا با علائم بالینی گاستروانتریت شامل ۳۹ مرد و ۲۱ زن با میانگین سنی 4 ± 55 مورد بررسی قرار گرفتند. از

جدول ۲. نتایج تست‌های بیوشیمیایی نمونه‌های مدفوع

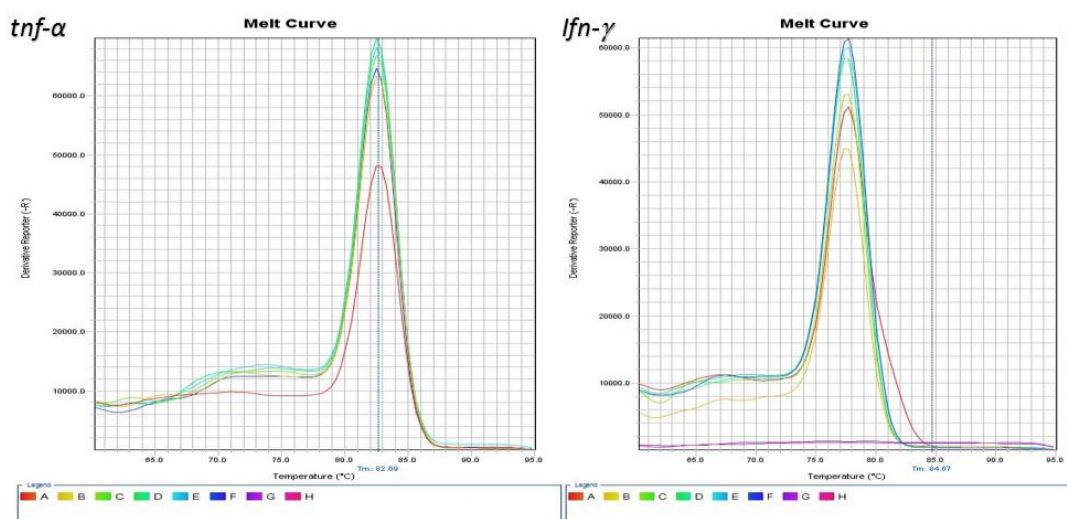
organism	kIA	H ₂ S	Gas	MR	VP	citrate	LDC	Urease	Arabinose	Ornithin decarboxylase	Rhamnose	Trehalose
Genus: Salmonella Typhi	ALK/A	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+

بررسی تکثیر اختصاصی محصولات Real time PCR

محصولات نهایی حاصل از Real time PCR جهت حصول اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و پرایمر دایمر، روی ژل آگارز ۰.۵٪ بارگذاری و الکتروفورز شد. علاوه بر این از منحنی ذوب نیز استفاده شد (شکل ۱).

نتایج اختصاصیت و حساسیت پرایمرها

به منظور طراحی پرایمرها با این روش ابتدا توالی mRNA از سایت <http://www.NCBI.org> استخراج شد، سپس به روش ذکر شده در Gene runner مورد نظر برای ژن‌های هدف طراحی گردید و در نهایت در سایت BLAST نواحی به طور اختصاصی تایید گردید.



شکل ۱. منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه از قبیل TNF- α و IFN- γ که نشان دهنده اختصاصی بودن تکثیر آنهاست.

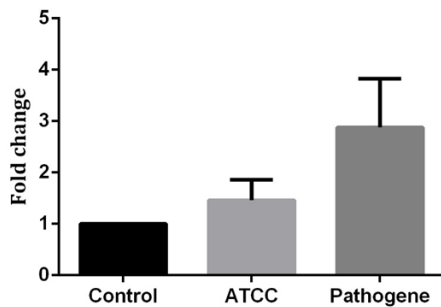
PBMC‌های تیمار شده با سویه پاتوژن و سویه ی ATCC هر دو افزایش معناداری ($P < 0.05$ ، $P < 0.0198$) نسبت به نمونه کنترل داشت. همچنین با استفاده از تست One way Anova و تست مقایسه ای Tukey's multiple comparisons test گروه‌ها با یکدیگر مقایسه شدند و معناداری هر کدام در جدول ۳ آمده است. افزایش بیان ژن TNF- α در گروه پاتوژن نسبت به کنترل از گروه ATCC 14028 با کنترل بیشتر است و این افزایش از نظر آماری معنادار است.

نتایج بیان ژن TNF- α

میزان بیان کمی ژن TNF- α در نمونه کنترل و ۶۰ محیط کشت سلول رشد کرده در محیط حاوی سالمونلا تیفی و سویه استاندارد ATCC14028 با غلظت 4×10^3 cfu/mL بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA از این سلول‌ها، توسط تکنیک Real-Time PCR و توسط پرایمر GAPDH به عنوان کنترل داخلی، اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد تغییرات نسبی بیان ژن TNF- α در

جدول ۳. مقایسه بیان ژن TNF- α در گروههای هدف

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Control vs. ATCC	-0.4589	-1.948 to 1.030	No
Control vs. Pathogen	-1.875	-3.364 to -0.3861	Yes
ATCC vs. Pathogen	-1.416	-2.905 to 0.07280	No



شکل ۲. تغییرات بیان ژن TNF- α در سویه های کنترل، ATCC و پاتوژن

جدول ۴. جدول بیان چند برابری ژن TNF- α

نوع نمونه	Fold Change
control	1
ATTC	1.45
Pathogen	2.87

نتایج کمی حاصل از تغییرات بیان ژن TNF- α در نمونه های کنترل و در PBMC های تیمار شده با سویه پاتوژن و سویه ATCC14028 در شکل ۲ مشاهده می شود و میزان چند برابری این ژن (فولد) در هر نمونه در جدول ۴ آمده است.

نتایج بیان ژن IFN- γ

میزان بیان کمی ژن IFN- γ در نمونه کنترل، نمونه تیمار شده با سویه پاتوژن و سویه ATCC1609 بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA از این سلول ها، توسط تکنیک Real time PCR و توسط پرایمر GAPDH به عنوان کنترل داخلی، اندازه گیری شد. نتایج نشان داد تغییرات نسبی بیان ژن IFN- γ در PBMC های تیمار شده با سویه پاتوژن و سویه ATCC 14028 هر دو افزایش معناداری ($P < 0.05$, $P < 0.001$) نسبت به نمونه کنترل داشت (نمودار ۲). همچنین با استفاده از تست One way Anova و تست مقایسه ای Tukey's multiple comparisons test گروه ها با یکدیگر مقایسه شدند و معناداری هر کدام در زیر آمده است (جدول ۵). افزایش بیان ژن IFN- γ در گروه پاتوژن نسبت به کنترل از گروه ATCC 14028 با کنترل بیشتر است و این افزایش از نظر آماری معنادار است.

جدول ۵. مقایسه بیان ژن IFN- γ در کنترل، ATCC 14028 و پاتوژن

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Control vs. ATCC 14028	-0.1777	-1.103 to 0.7475	No
Control vs. pathogen	-2.010	-2.935 to -1.084	Yes
ATCC vs. pathogen	-1.832	-2.757 to -0.9067	Yes

جدول ۶. جدول بیان چند برابری ژن INF- γ

نوع نمونه	Fold Change
control	1
ATCC 14028	1.17
Pathogen	۳

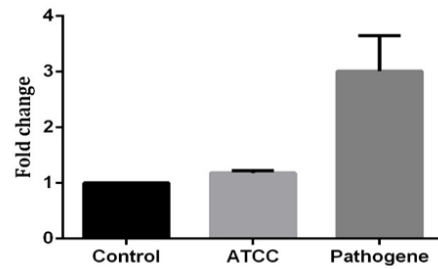
نتایج کمی حاصل از تغییرات بیان ژن IFN- γ در نمونه های کنترل و در PBMC های تحت سویه پاتوژن و سویه ATCC 14028 در شکل ۳ مشاهده می شود و میزان چند برابری این ژن در هر نمونه در جدول ۶ آمده است.

ماکروفاژها را به عنوان M1 یا M2 پیشنهاد کردند. این اصطلاحات از مشاهده متابولیسم آرژنین ماکروفاژ در سویه‌های مختلف موش با کار بر روی T helper نوع ۱ (Th1) و T helper نوع ۲ (Th2) سرچشمه گرفته است (۲۴، ۲۵).

Th1 با سلول‌های T که بیشتر IFN- γ تولید می‌کنند، فعال سازی ماکروفاژ را نشان می‌دهند که در آن اکسید نیتریک (NO) از آرژنین تولید می‌شود، و در مقابل تولید اورنیتین از Th2 با سلول‌های T تولید کننده IL-4 و TGF β 1، انجام می‌شود. این یافته منجر به اتفاق نظر در جامعه علمی شد که ماکروفاژهای M1 (فعال کلاسیک) عملکردهای التهابی از خود نشان می‌دهند، در حالی که ماکروفاژهای M2 (فعال شده آلترناتیو) عملکردهای ضد التهابی دارند (۲۶). در سال ۲۰۰۴، Orecchioni و همکاران بیشتر ماکروفاژهای M2 را بر اساس محرک‌های اعمال شده و تغییرات رونویسی ناشی از آن به زیرگروه‌های M2a، M2b، M2c و M2d تقسیم کردند. طبقه‌بندی ماکروفاژهای M1 / M2 در حال حاضر یک روش کاملاً ساده در نظر گرفته شده است که طیف جمعیت ماکروفاژها را به اندازه کافی توصیف نمی‌کند (۲۷).

به‌عنوان مثال، شناسایی ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAM)، که به خوبی در معیارهای ماکروفاژهای M1 یا M2 نمی‌گنجد، این سیستم را پیچیده می‌کند. علاوه بر این، ماکروفاژهای بیان کننده گیرنده‌های سلول T و CD169 نیز شناسایی شده‌اند. فنوتیپ زیرمجموعه‌های ماکروفاژ M1 و M2 و عملکرد ماکروفاژهای مشتق شده از پیش‌سازهای مونوسیت بسته به محیط بافت محلی، تحت تمایز خاصی قرار می‌گیرند (۲۸). آنها به نشانه‌های محیطی در بافت‌ها مانند سلول‌های آسیب دیده، لنفوسیت‌های فعال شده یا محصولات میکروبی پاسخ می‌دهند تا به فنوتیپ‌های عملکردی مجزا متمایز شوند. فنوتیپ ماکروفاژ M1 با تولید سطوح بالای سیتوکین‌های پیش التهابی، توانایی ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، خواص میکروب‌کشی قوی، تولید زیاد نیتروژن واکنش‌پذیر و واسطه‌های اکسیژن و ارتقای پاسخ‌های Th1 مشخص می‌شود. در مقابل، ماکروفاژهای M2 با دخالتشان در کنترل آلودگی انگلی، بازسازی بافت، تنظیم سیستم ایمنی، ارتقای تومور و فعالیت فاگوسیتیک کارآمد مشخص می‌شوند (۲۵). لذا در این مطالعه بیان ژن‌های مرتبط با سایتوکاین‌های TNF- α و IFN- γ در اولویت قرار گرفت.

LPS، اینترفرون گاما و فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت ماکروفاژ (GM-CSF)، ماکروفاژها را به سمت فنوتیپ M1 پلاریزه



شکل ۳. تغییرات بیان ژن IFN- γ در سویه‌های کنترل، ATCC و پاتوژن

بحث

مطالعات نشان داده است که پیشرفت بیماری‌ها در افراد با تغییرات بیان در سطح ژنوم همراه است. اگرچه مکانیسم مولکولی درگیر بواسطه این تغییرات ژنتیکی هنوز به طور کامل شناخته شده نیست، اما تحقیقات فعال شدن چند ژن در مسیرهای مختلف سلولی را گزارش کرده است. طیف تغییرات بیان این ژن‌ها و مسیرهای درگیر در عفونت باکتریایی بسیار متنوع و گسترده است. به عبارتی ایجاد بیماری یک فرآیند بسیار پیچیده است که با بیان غیرطبیعی چند ژن ارتباط دارد و در نتیجه می‌توان از تغییرات بیان ژن‌ها به‌عنوان بیومارکر در تشخیص بیماری استفاده کنیم (۱۹، ۲۰). بنابر این از این تغییرات در تشخیص عفونت‌های سالمونلایی و بررسی مکانیسم عمل سیستم ایمنی و باکتری در برابر یکدیگر نیز می‌توان استفاده کرد.

بیماری‌زایی *S.typhi* مانند دیگر سالمونلاها، پیچیده و چند عاملی است. این میکروارگانیسم مجموعه گسترده و متنوعی از عوامل بیماری‌زا را در ایجاد عفونت و بیماری ایجاد می‌کند (۲۱). بیماری‌زایی *S.typhi* به توانایی آن در حمله به سلول‌ها و تشکیل پوشش محافظ لیپوپولی‌ساکارید (LPS)، وجود آنتی‌ژن Vi و تولید و دفع اینوازین (ژن‌های *inv*)، پروتئینی که به سلول‌های غیر فاگوسیت حمله می‌کند، بستگی دارد. جایی که باکتری قادر به زنده ماندن و تکثیر درون سلولی است (۲۲، ۲۳). این فاکتورها در میزبان، باعث واکنش‌های سیستم ایمنی می‌شود.

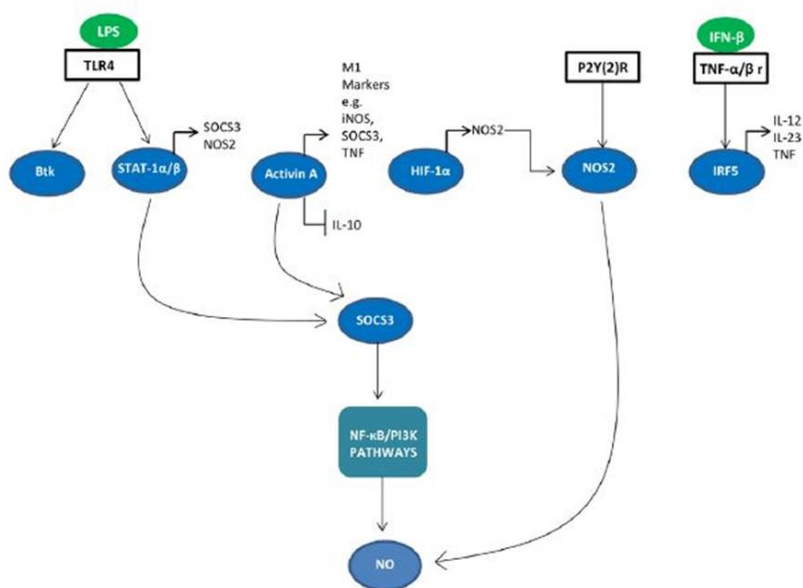
در دهه ۱۹۹۰ کشف شد که Cytokine Interleukin-4 اثرات متفاوتی در بیان ژن ماکروفاژ در مقایسه با اینترفرون گاما و لیپوپولی‌ساکارید (LPS) ایجاد می‌کند. در مقابل فعال سازی کلاسیک ماکروفاژها توسط اینترفرون گاما، بیان ژن ماکروفاژهای القا شده توسط IL-4 به‌عنوان "فعال سازی جایگزین" توصیف شد. چند سال بعد، در سال ۲۰۰۰، میلز و همکاران طبقه بندی جدیدی از

داده شده است که در شرایط آزمایشگاهی، ماکروفاژها قادر به پلاریزاسیون مجدد از M2 به M1 هستند و بسته به محیط کموکاین می‌توانند پلاریزاسیون را معکوس کنند.

مولکول‌های سیگنالینگ در پلاریزاسیون M1 / M2 نقش دارند شبکه‌ای از عوامل رونویسی و تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی در پلاریزاسیون M1 / M2 نقش دارند (شکل ۲). عامل تنظیمی اینترفرون (IRF) STAT و SOCS همگی در انحراف عملکرد ماکروفاژ به سمت فنوتیپ M1 یا M2 نقش دارند (۳۱). مسیره‌های IRF / STAT که توسط IFNها و سیگنالینگ TLR فعال می‌شوند، ماکروفاژها را از طریق STAT1 به حالت فعال سازی M1 پلاریزه می‌کنند (۳۳). نشان داده شده است که ماکروفاژهای M1، IRF5 را تنظیم می‌کنند، که برای پلاریزاسیون M1 و کل STAT1-alpha / beta به روشی مستقل و از طریق MyD88 در پلاریزاسیون M1 نقش دارد (۲۷).

می‌کنند، که باعث ترشح مقدار زیادی سیتوکین مانند IL-1-β، فاکتور نکروز تومور (TNF)، IL-12، IL-18 و IL-23 می‌شوند. این عمل کمک می‌کند تا پاسخ‌های التهابی سلول‌های Th1 و Th17 مخصوص آنتی ژن‌ها به درستی انجام شود (۲۹). به طور معمول، ماکروفاژهای M1 سطح بالایی از کمپلکس سازگاری بافتی کلاس II، نشانگر CD68 و مولکول‌های CD80 و CD86 را تحریک می‌کنند. همچنین نشان داده شده است که ماکروفاژهای M1 بیان SOCS3 را تنظیم می‌کنند و NOS2 را فعال می‌کنند تا NO از L-آرژنین تولید شود. در زمینه بیماری، ماکروفاژهای M1 در شروع و حفظ التهاب نقش دارند، بنابراین می‌توانند برای سلامتی مضر باشند (۳۰).

ماکروفاژهای M1 و M2 دارای پروفایل‌های گیرنده کموکاین و کموکین متفاوتی هستند، که M1 با ترشح کموکاین‌های جذب‌کننده سلول Th1 مانند CXCL9 و CXCL10 و M2 با ترشح CCL17، CCL22 و CCL24 عمل می‌کند. اخیراً نشان



شکل ۲. مولکول‌های سیگنالینگ درگیر در پلاریزاسیون M1

دادند، این افزایش بیان در سویه بالینی سالمونلا تیفی معنادار بوده و نسبت به سویه استاندارد نیز بیشتر بوده است.

در مطالعه ای که توسط Ami Febriza در سال ۲۰۲۰ برای سنجش TNF-α روی نمونه‌های خونی موش‌های الوده به *S. Typhi* با استفاده از متد ELISA انجام گرفت، مشخص گردید که میزان TNF-α در نمونه‌های آلوده افزایش یافته و تیمار موش‌ها با

در مطالعه حاضر، بیان ژن سایتوکاین‌های IFN-γ و TNF-α برای تایید پلاریزاسیون ماکروفاژهای تحریک شده با سالمونلا تیفی در شرایط آزمایشگاهی در دو سویه استاندارد سالمونلا و سویه بالینی سالمونلا تیفی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آنالیز بیان ژن نشان داد هر دو این ژن‌ها، افزایش بیان را در دو سویه استاندارد سالمونلا و سویه بالینی سالمونلا تیفی نسبت به گروه کنترل نشان

نتیجه‌گیری

بیان افزایش یافته $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ در دو سویه استاندارد سالمونلا و سویه پاتوژن وحشی *سالمونلا تیفی* نسبت به گروه کنترل، تایید کننده نقش آنها در پلاریزاسیون ماکروفاژهاست و از این رو می‌توانیم از تغییرات بیانی آنها به‌عنوان بیومارکر مولکولی در تشخیص عفونت‌های مربوط به سالمونلا استفاده کنیم.

سپاسگزاری

بضمن تشکر از تمام دوستانی که ما را در مراحل مختلف این پژوهش یاری کردند، از گروه دامپزشکی دانشگاه تهران برای تامین مکان و مواد آزمایش و نیز گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد تقدیر می‌شود.

تعارض در منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع مالی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع دکتری تخصصی (Ph.D) باکتری‌شناسی است که با همکاری دانشگاه تهران صورت گرفت و منابع مربوطه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تهران تامین شد.

آنتی‌بیوتیک منجر به کاهش آن می‌گردد (۳۴). علاوه بر این مشخص گردیده است که $IFN-\gamma$ نقش حیاتی در مقاومت علیه عفونت *S. Typhi* با افزایش فعالیت ضدباکتریایی ماکروفاژها ایفا می‌کند. همچنین اخیراً مشخص گردیده که $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ با فعالسازی مسیر JAK/STAT1/IRF در موش‌های آلوده به عفونت COVID-19 منجر به شوک سیتوکینی کشنده می‌شود و بدین دلیل استفاده از آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه این دو، می‌تواند از مرگ ناشی از COVID-19 جلوگیری کرد (۱۶). ضمناً در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۹ انجام گرفت به ارتباط بین پروفایل سلول‌های تولید کننده $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ و آسیب‌های کبدی و کلیوی در عفونت ویروس هپاتیت B پی برده شد (۳۵). در نتیجه با توجه به مطالعات انجام شده می‌توان از تغییرات بیان سایتوکاین‌های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ در شناسایی عفونت‌های مرتبط با *S. Typhi* استفاده کرد (۳۶).

البته این نکته قابل ذکر است که با توجه به مطالب گفته شده در بالا، مطالعه حاضر نتوانسته تمام جنبه‌های مولکولی پلاریزاسیون ماکروفاژها و سیتوکین‌های مطالعه را بررسی کند و پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، برای درک بهتر مسیرهای مولکولی، آزمایش‌های بیشتر و تخصصی‌تری به همراه فاکتورهای بیشتر بررسی گردد