Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol.51, No. 3, P. 149 - 154
Autumn 2008

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۱، شماره ۳
پائیز ۸۷، صفحه. ۱۴۹ - ۱۵۴

مقاله اصلی

ارزیابی سایتوکاینهای مترشحه از سلولهای Th 1 و Th2 در مبتلایان به لیشمانیوز پوستی حساس و مقاوم به درمان با گلوکانتیم

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۲۹

[1]مسعود مهاجری*
[2]سید علی اکبر شمسیان
[3]حسین نهروانیان
[4]محمود محمودی
[5]محمد جواد یزدان‌پناه
[6]مریم شاهی

۱ - دانشیار و مدیر گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲ - استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳ - استادیار بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران
۴ - استاد گروه ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۵ - دانشیار گروه پوست دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۶ - کارشناس ارشد انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

* مشهد - بیمارستان قائم (عج)، گروه انگل شناسی - نویسنده رابط
تلفن: ۸۴۰۳۱۴۱ - ۰۵۱۱،
email:Mohajery83@yahoo.com

خلاصه

مقدمه

لیشمانیوز پوستی در بسیاری از نقاط ایران از جمله شهر مشهد به صورت اندمیک مشاهده می‌شود. در سالهای اخیر مواردی از عدم پاسخ به درمانهای رایج (ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان) ازجمله گلوکانتیم مشاهده‌شده‌است. پاسخ ایمنی سلولی که به وسیله سلول‌های T-helper type1(Th1) ایجاد می‌شود، نقش مهمی در محافظت در برابر بیماری لیشمانیوز ایفا می‌کند درحالی که فعالیت سلولهای T-helper type2 (Th2) باعث پیشرفت بیماری می‌شود. هدف این مطالعه ارزیابی سایتوکین‌های مترشحه از سلول‌های مونونوکلئر خون محیطی (PBMC)[1] در مبتلایان به لیشمانیوز پوستی حساس و مقاوم به درمان با گلوکانتیم و گروه کنترل، جهت یافتن روشی برای درمان بیماران مقاوم به درمان می‌باشد.

روش کار

این مطالعه توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۸۵ درمورد ۶۰ نفر از بیماران درمانگاه شماره یک آب و برق و بیمارستان قائم انجام شد. ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی در گروههای حساس و مقاوم به درمان لیشمانیوز پوستی و گروه کنترل با اندازه گیری سایتوکین‌های آزاد شده از سلول‌های PBMC پس از تحریک با آنتی‌ژن لیشمانیا ماژور و میتوژن به مدت ۴۸ ساعت توسط روش الیزا انجام گردید. اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۲ و آزمون های آنالیز واریانس، کروسکال والیس و من ویتینی تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

سلول‌های PBMC افراد حساس به درمان، سایتوکین IFN-γ را با $p<۰/۰۵$ بیش از بیماران مقاوم به درمان ترشح کردند درحالی که در بیماران مقاوم به درمان IL-4 با $p<۰/۰۰۵$ بیش از بیماران حساس به درمان ترشح شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترشح سایتوکین‌هایی که باعث فعالیت پاسخ‌های Th2 می‌شوند، مثل IL-4 در بیماران مقاوم به درمان بیش از موارد حساس به درمان ترشح می‌شوند و ترشح سایتوکین‌هایی که پاسخ‌های Th1 را فعال می‌کنند مثل IFN-γ در موارد حساس به درمان بیش از بیماران مقاوم به درمان ترشح می‌شوند.

کلمات کلیدی: سایتوکین، لیشمانیوز پوستی، گلوکانتیم

[1] Peripheral blood mononuclear cells

مقدمه

لیشمانیازیس به گروهی از بیماریها گفته می‌شود که توسط تک‌یاخته‌های داخل سلولی اجباری جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و بسته به گونه‌ی انگل عامل بیماری و واکنش میزبان طیف گسترده‌ای از تظاهرات بالینی را نشان می‌دهد که از ضایعات پوستی خود بهبودیابنده تا عفونت احشایی کشنده متغیر است (۱-۳). حدود ۳۵۰ میلیون نفر در جهان در معرض خطر ابتلا به اشکال مختلف این بیماری می‌باشند. میزان بروز سالانه این بیماری حدود ۲ میلیون نفر است که از این تعداد حدود ۱/۵ میلیون نفر به نوع پوستی این بیماری مبتلا می‌شوند (۴، ۵). استان خراسان بخصوص شهر مشهد یکی از کانونهای بیماری در کشور ما است. ترکیبات پنج‌ظرفیتی آنتی‌موان به‌طور معمول جهت درمان لیشمانیازیس انسانی استفاده می‌شود (۶). در سالهای اخیر موارد مقاومت به این دسته از داروها مشاهده شده‌است (۷). مطالعات نشان داده‌اند که درمان موفق علاوه بر کاهش تعداد انگل شامل توسعه پاسخ ایمنی سلولی مؤثر نیز می‌باشد(۶). ازآنجا که در لیشمانیازیس پاسخ سلولهای T-helper type1 (Th1) در ارتباط با محافظت در برابر آلودگی با انگل‌های لیشمانیاست و فعالیت سلولهای T-helper type2 (Th2) منجر به پیشرفت بیماری می‌شود، این مطالعه با هدف بررسی پاسخ‌های ایمنی افراد حساس و مقاوم به درمان از نظر ترشح سایتوکاین‌هایی که فعالیت سلولهای Th1 را افزایش داده مثل IFN-γ و همچنین سایتوکاینهایی موجب افزایش فعالیت سلولهای Th2 نظیر IL-4 شده اند، انجام شد تا روشی مناسب جهت درمان بیماران مقاوم به درمان به دست آید.

روش کار

این مطالعه توصیفی - مقطعی در فاصله زمانی آذر ۱۳۸۵ تا اسفند ۱۳۸۵ در شهر مشهد انجام شده‌است. افراد مورد مطالعه ۶۰ بیمار مراجعه کننده به درمانگاه پوست بیمارستان قائم و درمانگاه شماره یک آب و برق مشهد بودند. کلیه بیماران قبل از ورود به مطالعه در جریان سیر پژوهش قرار گرفتند و از ایشان رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. در این بررسی معاهده هلسینکی در مورد رعایت اخلاق پزشکی در تحقیقات، رعایت گردید. آزمایشات در بخش انگل شناسی بیمارستان قائم و پژوهشکده بوعلی انجام شد.

گروه‌های داوطلب مورد مطالعه: اولین گروه شامل ۲۰ نفر از بیماران حساس به درمان لیشمانیوز پوستی بودند که به اولین دوره درمان پاسخ مثبت داده بودند (گروه۱). گروه دوم شامل ۲۰ نفر از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی مقاوم به درمان بودند که حداقل پس از سه دوره درمانی بهبودی در آنها مشاهده نشده بود (گروه۲) و گروه سوم شامل ۲۰ نفر از افرادی بودند که تا آن زمان به بیماری لیشمانیوز مبتلا نشده بودند و این افراد با نتیجه تست لیشمانین منفی انتخاب شدند (گروه۳). سعی شده‌است افراد انتخاب شده از نظر وضعیت اقتصادی- اجتماعی تقریباً یکسان باشند.

در این بررسی از روش نمونه‌گیری غیراحتمالی آسان استفاده گردید. همه افراد مورد مطالعه از نظر HIV[1]، HTLV-1[2] و مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، کرم های انگلی روده‌ای که القاءکننده پاسخ‌های Th2 هستند و دیابت، بررسی شدند و برای هر بیمار فرم معاینه فیزیکی و پرسشنامه تکمیل گردید.

جداسازی سلول‌های مونونوکلئر: ۱۰ میلی لیتر از خون هر یک از افراد مورد مطالعه در لوله حاوی EDTA جمع‌آوری شد. سلولهای PBMC توسط فایکول (بیوژن[3]) و سانتریفوژ با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه جدا شدند. سلولهای PBMC توسط فسفات بافر سالین (PBS)[4] (مرک[5]) ۲ بار جهت خالص سازی شستشو داده شدند.

کشت سلولهای PBMC و جداسازی سوپرناتانت[6]: سلولهای PBMC در محیط RPMI-1640 (یوروکلون[7]) حاوی ٪۱۰ سرم جنین گوساله غیر فعال شده و ٪۱ محلول پنی‌سیلین استرپتومایسین (بایوسرا[8]) در پلیت‌های کشت ۱۲

[1] Human immunodeficiency virus
[2] Human T-Cell ymphptropic virus type 1
[3] Biogene
[4] Phosphate buffered saline
[5] Merc
[6] Supernatant
[7] Uroclone
[8] Biosera

خانه‌ای (نانک[1]) کشت شدند. هر خانه کشت شامل 10^6 سلول در حجم ۱ ml بود. با توجه به روش انجام شده و تنظیم مراحل آزمایش در ابتدای کار سلول‌ها توسط ۱۰ μg/ml فیتوهماگلوتینین (PHA)[2] (گیبکو[3]) و ۴۱/۵ μg/ml آنتی‌ژن لیشمانیا (L. major MRHO/IR/75/ER) تهیه شده از بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران، تحریک شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت دی‌اکسیدکربن ٪۵ کشت شدند. توسط سانتریفوژ با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سوپرناتانت از محیط کشت جدا و در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری داخل فریزر °۷۰- تا زمان جمع آوری همه نمونه‌ها نگهداری شد.

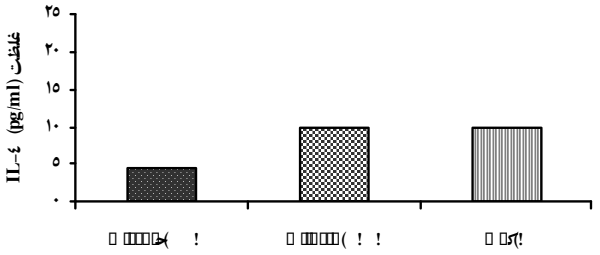
انجام آزمایشات الیزا و اندازه‌گیری سایتوکین‌ها: IL-4 و IFN-γ در سوپرناتانت توسط روش الیزا توسط کیت‌های بیوسورس[4] (بلژیک) و بندرمد[5] (اتریش) اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی آماری: اطلاعات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۲، ارزیابی شدند. با استفاده از آزمونهای آنالیز واریانس، کروسکال والیس[6] و من‌ویتنی[7] تجزیه و تحلیل اطلاعات انجام شد. در بررسی‌های انجام شده کلیه آزمونها با $p<0/05$ معنی‌دار تلقی شده‌است.

نتایج

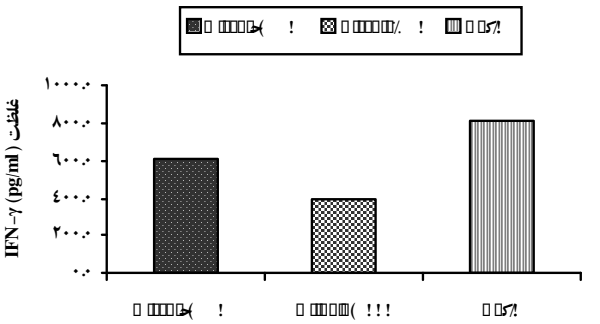
در مورد بیمارانی که تعداد زخم‌های آنان بیش از ۳ عدد بود بر حسب اندازه ضایعه و محل ضایعه از درمان سیستمیک (۲۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن از راه تزریق عضلانی روزانه به مدت ۲۰ روز) استفاده شده‌است. در بیمارانی که تعداد زخم‌های آنها کمتر از ۳ عدد بود از درمان موضعی (۲- ۰/۵) میلی لیتر گلوکانتیم بر حسب اندازه زخم در داخل ضایعه، یک بار در هفته به مدت ۸ هفته استفاده شده‌است. توزیع فراوانی بیماران بر حسب نوع درمان کاملاً همگن بود. آزمون χ^2 نیز با $p=1/00$ تفاوتی از نظر ترشح سایتوکین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه بر حسب نوع درمان نشان نداد.

ارزیابی سایتوکین‌های ترشح شده در افراد مورد مطالعه: با انجام آزمایشات الیزا بر روی سوپرناتانت جداشده از محیط کشت سلول‌های PBMC پس از تحریک با آنتی‌ژن اختصاصی و میتوژن (PHA) به مدت ۴۸ ساعت، سطح سایتوکاین‌های ترشح شده در هر بیمار ارزیابی و نتایج آن در سه گروه مورد مطالعه مقایسه شد. IL-4 در گروه حساس به درمان نسبت به گروه مقاوم به درمان با $p<0/0001$ کمتر ترشح شده بود. تفاوت بین گروه مقاوم به درمان و گروه کنترل در میزان ترشح IL-4 معنی‌دار نبود و در گروه کنترل نسبت به گروه حساس به درمان با $p=0/019$ افزایش نشان‌داد (نمودار۱).



نمودار ۱- مقایسه میانگین غلظت IL-4 ترشح شده (pg/ml) در مبتلایان به لیشمانیوز پوستی حساس و مقاوم به درمان با گلوکانتیم و گروه کنترل مورد مطالعه

IFN-γ در گروه حساس به درمان نسبت به گروه مقاوم به درمان با $p=0/033$ بیشتر ترشح شده بود. در گروه کنترل نیز نسبت به گروه مقاوم به درمان با $p<0/001$ افزایش نشان‌داد اما بین گروه حساس به درمان و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده‌نشد (نمودار ۲).



نمودار۲- مقایسه میانگین غلظت IFN-γ ترشح شده (pg/ml) در مبتلایان به لیشمانیوز پوستی حساس و مقاوم به درمان با گلوکانتیم و گروه کنترل مورد مطالعه

---

[1] Nunc
[2] Phytohemaglutinin
[3] Gibco
[4] Biosource
[5] BenderMed
[6] Kruskal-Wallis
[7] Mann-Whitney

بحث

درمان لیشمانیوز به میزان زیادی به توسعه پاسخ ایمنی مؤثر میزبان که ماکروفاژها را جهت تولید نیتروژن توکسیک و واسطه های اکسیژن برای از بین بردن آماستیگوت فعال می کند، بستگی دارد. سلول‌های TCD_4^+ به عنوان فاکتور مهمی در پیشرفت بیماری و یا محدود شدن بیماری شناخته شده‌اند، که این نقش را می‌توانند توسط سایتوکینهای مختلفی که ترشح می‌کنند مانند IL-4 و IFN-γ، ایفا نمایند (۸).

آزمایشهای متعدد در فرم عفونت بهبود یافته لیشمانیا ماژور در مدل موشی نشان می‌دهد که این بهبودی وابسته به رشد ایمنی سلولی می‌باشد و ایمنی همورال اثر کمی بر آن دارد (۹).

در مدل‌های آزمایشی پاسخ‌های سلولی نوع Th_1 در ارتباط با محافظت در برابر آلودگی با انگل لیشمانیا است در حالی که فعالیت پاسخ Th_2 در ارتباط با پیشرفت بیماری می‌باشد (۱۰). IL-4 در افزایش حساسیت به عفونت با انگل لیشمانیا نقش مهمی دارد و IFN-γ فعال کننده قوی ماکروفاژهاست و منجر به مقاومت میزبان در برابر عفونت با انگل لیشمانیا می‌شود (۱۰، ۱۱).

در این مطالعه مشخص شد که پاسخ ایمنی افراد در گروه‌های مورد مطالعه خصوصاً گروه مقاوم به درمان و حساس به درمان تفاوت عمده‌ای با هم دارد.

ترشح IFN-γ که تمایز سلول‌های $TCD4^+$ بکر را به زیر گروه Th1 تحریک می‌کند، در گروه حساس به درمان نسبت به گروه مقاوم به درمان با p=۰/۰۳۳ افزایش نشان داد. در گروه کنترل نیز نسبت به گروه مقاوم به درمان با p<۰/۰۰۰۱ بیشتر ترشح‌شد اما در گروه حساس به درمان و گروه کنترل از نظر ترشح IFN-γ تفاوت معنی‌داری مشاهده‌نشد. گفته شده‌است وقتی که سلول‌های Th2 به همراه IFN-γ و IL-12 کشت شوند، تولید IFN-γ افزایش می‌یابد (۱۲). این نشان‌می‌دهد که زیر گروه‌های Th می‌توانند سایتوکین‌های مخالف فنوتیپ خودشان را در محیط کشت ترشح کنند. با استفاده از این خصوصیت می‌توان جهت درمان بیماریها با توجه به زیرگروه Th مؤثر در بهبود بیماری از سایتوکین‌ها استفاده نمود (۱۲). با توجه به تحقیق حاضر مشخص شد سایتوکین IFN-γ که فعال کننده قوی پاسخ سلولی نوع Th1 می‌باشد در بهبود بیماری نقش عمده‌ای دارد.

در مطالعه مهاجری و همکاران در سال ۱۳۸۴ در بیمارستان قائم مشهد نیز نشان داده‌شد که IFN-γ در بهبود بیماران لیشمانیوز پوستی نقش دارد و نتایجی مشابه این مطالعه به دست آوردند (۱۳).

در مطالعه اژدری و همکاران در سال ۲۰۰۰ در انستیتو پاستور ایران در مقایسه پاسخ ایمنی افراد حساس و مقاوم به درمان و همین‌طور آنهایی که زخم فعال داشتند نیز نشان داده‌شد که درصد ترشح IFN-γ بعد از تحریک لنفوسیت‌ها با آنتی‌ژن محلول لیشمانیا در بیمارانی که زخم فعال داشتند و گروهی که بهبود یافته بودند نسبت به گروه مقاوم به درمان و گروه کنترل با p<۰/۰۰۰۵ افزایش نشان‌داد (۱۰).

IL-4 سایتوکین شاخص زیر گروه Th2 است و به عنوان محرک این سلولها عمل‌می‌کند (۱۴). در مطالعه حاضر ترشح IL-4 در گروه مقاوم به درمان نسبت به گروه حساس به درمان با p<۰/۰۰۰۱ ترشح بیشتری نشان‌داد. در گروه کنترل نیز نسبت به گروه حساس به درمان با p=۰/۰۱۹ افزایش نشان‌داد. ترشح IL-4 در گروه مقاوم به درمان و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان‌نداد.

در مطالعه‌ای که حبیبی و همکاران در سال ۲۰۰۱ در انستیتو رازی ایران بر لنفوسیتهای بیماران مقاوم و حساس به درمان لیشمانیوز پوستی پس از تحریک با آنتی‌ژن نوترکیب gp63 و آنتی‌ژن محلول لیشمانیا با روش RT-PCR انجام دادند، نشان‌داده‌شد که افزایش بیان ژن IL-4 و کاهش بیان ژن IL-12 و IFN-γ در افراد مقاوم به درمان وجود دارد. و آنها هم به نتایجی مشابه نتایج مطالعه حاضر رسیدند (۳).

در مطالعه‌ای که راجرز و همکاران سال ۲۰۰۴ در آمریکا بر پاسخ‌های سایتوکینی انسان نسبت به لیشمانیا ماژور در مرحله اولیه مواجهه با انگل لیشمانیا در محیط in vivo انجام دادند، نشان‌داده‌شد IFN-γ اصلی‌ترین سایتوکینی است که در مرحله مقدماتی عفونت تولید می‌شود و ترشح آن با IL-10 و IL-12 تنظیم می‌شود ولی سطح پایینی از سایتوکین های زیر گروه Th2 مثل IL-5 ترشح می‌شود (۱۵).

در تحقیق حاضر که ترشح سایتوکین‌ها ۴۸ ساعت پس از مواجهه سلول‌های PBMC با آنتی‌ژن اختصاصی لیشمانیا و

میتوژن، ارزیابی شدند، بالاترین غلظت سایتوکین ترشح شده مربوط به IFN-γ بود و پایین ترین غلظت را IL-4 داشت.

در بررسی حاضر هر دو سایتوکین در سه گروه مورد مطالعه به میزان قابل اندازه‌گیری ترشح شدند، در حالیکه در مطالعه اژدری و همکاران، سطح IFN-γ در پاسخ به آنتی‌ژن محلول لیشمانیا در افراد مقاوم به درمان و افراد گروه کنترل قابل اندازه‌گیری نبود و یا مقدار آن خیلی کم بود.

نتیجه‌گیری

سایتوکین‌هایی که فعالیت پاسخ Th2 را تقویت می‌کنند مثل IL-4، در بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی مقاوم به درمان با گلوکانتیم بیش از گروه حساس به درمان ترشح می‌شود و سایتوکین‌هایی که باعث القاء و فعالیت پاسخهای Th1 می‌شوند مثل IFN-γ در افراد حساس به درمان بیش از بیماران مقاوم به درمان لیشمانیوز پوستی ترشح می‌شوند.

بهتر است جهت به دست آوردن اطلاعات جامع‌تر درباره تفاوت پاسخهای ایمنی در بیماران مقاوم و حساس به درمان لیشمانیوز پوستی مطالعات بیشتری در زمینه پاسخهای ایمنی با روشهای دیگر از قبیل PCR[1] و تعیین پلی‌مورفیسم ژن سایتوکینها صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از حمایتهای مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین نویسندگان مراتب سپاس خود را از پرسنل محترم درمانگاه شماره یک آب و برق و بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران ابراز می‌دارند.

References:

1- Sundar S, Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9:951-958.

2- Bottrel RLA, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, et al .Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble Leishmania Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. Infect Immun 2001; 69:3232-3239.

3- Habibi GR, Khamesipour A, McMaster WR, Mahboudi F. Cytokine gene expression in healing and non-healing cases of cutaneous leishmaniasis in response to in vitro stimulation with recombinant gp63 using semi-quantitative RT-PCR. Scand J Immunol 2001; 54:414-420.

4- Faber W, Oskam L, Gool T, Kroon N, Knegt-Junk K J, Hofwegen H,et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. J Am Acad Dermatol 2003; 49:70-74.

5- Compos-neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis indused by recombinant Antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. Infect and Immun 2001; 69:4103-4108.

6- Gary S. Swich from a type 2 to type 1 T helper cell response and cure of stablished leishmania major infection in mice is induced by combined therapy with IL12 and pentostam. Proc Natl Acad Sci 1995; 92:3142-3146.

7- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006 Jan 1; 19:111-26.

8- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. Indian J Med Res 2004; 119:238-258.

9-Abul.K.Abbas, Andrew H.Lichtman and Jordan S. Pober.Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. 2000 W.B.Saunders.

10-Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the Immune Profile of Nonhealing Cutaneous Leishmaniasis Patients with Those with Active Lesions and Those Who Have Recovered from Infection. Infect Immun 2000; 68:1760-4.

11- Constantinescu CS, Hondowicz BD, Elloso MM, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The role of IL-12 in the maintenance of an established Th1 immune response in experimental leishmaniasis. Eur J Immunol 1998 ; 28:2227-2233.

12- Mocci S, Coffman RL, Induction of a Th2 population from a polarized leishmania specific Th1 population by in vitro culture with IL-4. J Immunol 1995; 154:3779-3787.

13- Mohajeri M,Shamsian AK,Shakery MT,Raesolmohadesin M,MahmodiM.Role of TCD4+Cells and their Cytokines in response to treatment in cuataneous Leshmaniasis.Med J Mashad Uni Med Sci 2006;90:379-386.

[1] Polymerase chain reaction

14- Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4+CD25-Foxp3- Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. J Exp Med 2007; 204:285-297.

15- Rogers KA, Titus RG. The human cytokine response to Leishmania major early after exposure to the parasite in vitro. J Parasitol 2004; 90:557-563.