

فوتوتایپینگ لنفوسیت‌های T خاطره‌ای در گردش در سالک

زمینه و هدف: در سال‌های گذشته وجود دو دسته لنفوسیت خاطره‌ای تحت عنوان لنفوسیت‌های T خاطره‌ای مرکزی (T_{cm}) و لنفوسیت‌های T خاطره‌ای کارگزار (T_{em}) براساس بیان شاخص‌های سطحی CCR7 و CD45RA معرفی شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی فنوتیپ و عملکرد این لنفوسیت‌ها در افراد بهبودیافته از سالک بود.

روش اجرا: بررسی فنوتیپی لنفوسیت‌ها با استفاده از مارکرهای سطحی مربوطه با روش فلوسایتومتری بر نمونه خون ۱۳ بیمار بهبود یافته از سالک و ۶ نفر داوطلب سالم به عنوان شاهد انجام شد.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری از نظر فراوانی رده‌ها در خون محیطی بین گروه بهبودیافته و گروه شاهد وجود نداشت؛ بنابراین ردیابی لنفوسیت‌های خاطره‌ای اختصاصی لیشمانیا صرفاً با مطالعه فنوتیپی امکان‌پذیر نیست. با تفکیک و سپس کشت رده‌های لنفوسیتی، روند تکثیر و سایتوکاین‌های ترشحی پس از تحریک با آنتی‌ژن اندازه‌گیری شدند. تکثیر سلولی به‌طور معنی‌داری در لنفوسیت‌های گروه بهبودیافته بیش از شاهد بود. میزان اینترفرون گاما در لنفوسیت‌های T_{em} گروه بهبودیافته به‌طور معنی‌داری بیش از گروه شاهد بود. این نتایج با بررسی فراوانی سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین با رنگ‌آمیزی داخل سلولی نیز تأیید شدند. از طرف دیگر، نتایج بررسی IL-2 با روش رنگ‌آمیزی داخل سلولی حاکی از افزایش معنی‌دار تعداد لنفوسیت‌های T_{cm} تولیدکننده این سایتوکاین بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه تکثیر سلولی و پاسخ سایتوکاینی لنفوسیت‌ها در برابر تحریک با آنتی‌ژن انگل حاصل شده‌است، این لنفوسیت‌ها به‌عنوان لنفوسیت‌های خاطره‌ای مرکزی و کارگزار اختصاصی لیشمانیا معرفی می‌شوند و به نظر می‌رسد در محافظت علیه لیشمانیوز در افراد بهبودیافته هر دو نوع لنفوسیت T_{em} و T_{cm} همراه با یکدیگر نقش دارند.

کلید واژه‌ها: لنفوسیت‌های T خاطره‌ای، لیشمانیوز جلدی، فلوسایتومتری

دریافت مقاله: ۸۹/۶/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۲۴

پوست و زیبایی؛ پاییز ۱۳۸۹، دوره ۱ (۳): ۹۹-۱۱۱

دکتر علی خامسی پور^۱
دکتر محمود ناطقی‌رستمی^{۲،۳}
دکتر حسین کشاورز^۲
اکرم میرامین محمدی^۱
مینو تسبیحی^۱
سیده‌طاهره شهرستانی^۴
دکتر عبدالفتاح صراف‌نژاد^۴

۱. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران
۴. گروه ایمونولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول:

دکتر حسین کشاورز

تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، طبقه سوم، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، پست الکترونیک:

hkeshavarz@tums.ac.ir

مقدمه

میلیون نفر در معرض خطر اکتساب بیماری می‌باشند و میزان بروز سالانه لیشمانیوز تقریباً ۲ میلیون مورد است که بخش عمده آن از نوع جلدی (سالک) می‌باشد^{۱،۲}. در ایران، لیشمانیوز احشایی به‌صورت پراکنده تقریباً از همه ایران گزارش می‌شود و سالک در حداقل ۱۵ استان کشور اندمیک می‌باشد که شامل دو نوع روستایی Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) با عامل *L. major* و شهری (ACL)

لیشمانیوز به گروهی از بیماری‌های انگلی ناشی از گونه‌های مختلف جنس *Leishmania* اطلاق می‌شود که بسته به پاسخ ایمنی میزبان و گونه انگل عامل بیماری، اشکال بالینی آن از ضایعات پوستی خودبه‌خود بهبودیابنده تا بیماری احشایی کشنده متفاوت است. بنابر تخمین سازمان جهانی بهداشت حدود ۳۵۰

می‌شود که برای مقابله با میکروارگانیزم‌ها به محل‌های عفونت مهاجرت می‌کنند. بخشی از این سلول‌های کارگزار تبدیل به لنفوسیت‌های T خاطره‌ای می‌شوند و مسئولیت خاطره ایمنی را به‌عهده دارند^{۱۱،۱۲}. این سلول‌ها قادرند با سرعت و شدت بیشتری در برخورد مجدد با آنتی‌ژن واکنش نشان دهند که این واکنش با تکثیر سلولی و ترشح سایتوکاین‌ها بروز می‌کند^{۱۳}. براساس شاخص‌های سطحی، لنفوسیت‌های T خاطره‌ای را به رده‌های مختلف تقسیم می‌کنند. از جمله در سال‌های اخیر وجود دو دسته سلول خاطره‌ای تحت عنوان: سلول‌های T خاطره‌ای مرکزی (Central Memory T cell) و سلول‌های T خاطره‌ای کارگزار (Effector Memory T cell) معرفی شده‌است^{۱۴،۱۵}. سلول‌های T_{cm} با بیان گیرنده CD62L کموکاینی CCR7 و گیرنده لانه‌گزینی CD62L مشخص می‌شوند در صورتی که سلول‌های T_{em} فاقد گیرنده‌های CCR7 و CD62L هستند. لنفوسیت‌های CD4+ T_{cm} در خون محیطی گردش کرده، در اعضا لنفی ثانویه مستقر می‌شوند و سایتوکاین عمده آنها IL-2 است. در حالی که لنفوسیت‌های CD4+ T_{em} در بافت‌های غیرلنفی و محل‌های عفونت مستقر می‌شوند و پس از تحریک آنتی‌ژنیکی سایتوکاین‌های گروه Th1 یا Th2 را تولید می‌کنند^{۱۱}.

عملکردهای متفاوت رده‌های مختلف سلول‌های خاطره‌ای CD4+ یا CD8+ در برخی از مطالعات بر روی موش^{۱۶}، انسان سالم^{۱۷} و بیماران مبتلا به برخی از بیماری‌های ویروسی^{۱۸-۲۱} گزارش شده‌است. تحریک سلول خاطره‌ای مرکزی (CD62L+ CCR7+) منجر به تولید IL-2 می‌شود ولی در عوض تحریک سلول‌های خاطره‌ای کارگزار (CD62L- CCR7-) باعث تولید زیاد سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-4 و IL-5 و مقادیر ناچیزی IL-2 می‌گردد و این سلول‌ها می‌توانند به سرعت نقش سلول‌های کارگزار را ایفا نمایند^{۲۲}. در لیشمانیوز مدل موشی نقش این دو جمعیت از لنفوسیت‌های خاطره‌ای

Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis با عامل *L. tropica* می‌باشد. به‌علت مشکلات فراوان در کنترل لیشمانیوز، از جمله انتشار وسیع مخازن (جوندگان) و مشکل مبارزه با آنها، دشواری درمان و بروز مقاومت دارویی، و نیز گزارش عفونت‌های همراه HIV-*Leishmania* در بیش از ۳۵ کشور جهان این معضل بهداشتی نیاز به توجه ویژه مسئولین امور بهداشتی دارد^{۳-۴}.

در همین راستا، سال‌هاست که در سطح جهان مطالعات مختلفی به‌منظور یافتن واکنشی مؤثر علیه لیشمانیوز آغاز گردیده است^{۵،۶} اما تا کنون ماحصل این تلاش‌ها منجر به دستیابی به واکنشی علیه هیچ‌یک از انواع لیشمانیوز نشده‌است^۷. پیچیدگی پاسخ‌های ایمنی به‌ویژه در لیشمانیوز انسانی و عدم شناخت کافی زوایای این پیچیدگی از علل مهم عدم دستیابی به واکسن مؤثر علیه لیشمانیوز بوده‌است^{۸،۹}. تقریباً همه نژادهای موش‌های آزمایشگاهی به عفونت *Leishmania major* به اصطلاح مقاوم هستند. عفونت در این نژادهای موش باعث ایجاد پاسخ ایمنی از نوع Th1 همراه با ترشح IFN- γ ، IL-2 می‌گردد و ضایعاتی خودبخود بهبودیابنده شبیه سالک ایجاد می‌کند و بهبود با مصونیت کامل در مقابل عفونت بعدی همراه است. ولی عفونت *L. major* در موش‌های حساس Balb/c باعث ایجاد پاسخ ایمنی از نوع Th2 و ترشح IL-4 و IL-5 می‌گردد که در این حالت عفونت پیشرونده بوده و سرانجام مرگ و میر صددرصد موش‌ها را باعث می‌شود^{۱۰}.

برخلاف مدل حیوانی مکانیسم بهبود و بروز مصونیت در انسان بسیار پیچیده است. در فرآیند پاسخ ایمنی، لنفوسیت‌های T بکر (Naive T cells) در اعضای لنفاوی ثانویه با آنتی‌ژن‌های عرضه شده توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) Antigen Presenting Cells برخورد کرده و تکثیر می‌یابند که در نتیجه سلول‌های کارگزار (Effector T cells) تولید

در این مطالعه ما فنوتیپ و عملکرد لنفوسیت‌های T خاطره‌ای را در افراد بهبودیافته از سالک مورد بررسی قرار داده‌ایم.

روش اجرا

طراحی مطالعه، ملاحظات اخلاقی و نمونه‌گیری

در این مطالعه مجموعاً ۱۹ داوطلب شامل ۱۳ فرد بهبودیافته از سالک (با آزمون جلدی لیشمانین [Leishmanin Skin Test (LST)] مثبت) و ۶ شاهد سالم (با آزمون جلدی لیشمانین منفی) دارای شرایط وارد مطالعه شدند (جدول ۱). از تمامی افراد داوطلب دارای شرایط ورود به مطالعه پس از توضیحات لازم رضایت نامه آگاهانه اخذ و سپس آزمون لیشمانین بر روی آنها انجام شد و مشخصات بیماران در فرم‌های مخصوص ثبت شد. از بیماران یک نمونه ۲۰ میلی لیتر خون هپارینه گرفته و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) با سانتریفوژ بر روی محلول فایکول جداسازی شد.

کشت انگل و تهیه آنتی‌ژن محلول لیشمانیا (SLA) (Soluble Leishmania Antigen)

در این مطالعه از انگل لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER استفاده شد. کشت انگل در محیط RPMI 1640 غنی شده با ۱۰٪ FCS انجام شد.

جدول ۱: ویژگی‌های بیماران بهبودیافته از سالک و گروه شاهد

ویژگی	بیماران بهبودیافته	شاهد سالم
تعداد (%)	۱۳ نفر (۶۸/۴٪)	۶ نفر (۳۱/۶٪)
جنس: مرد / زن	۶/۷	۲/۴
سن (سال)	۳۱/۶±۷/۱	۳۷/۵±۸/۸
تعداد ضایعه	۱ (۱-۷)	—
دوره زخم (ماه)	۶۰ (۱-۱۳۲)	—
پاسخ به آزمون جلدی لیشمانین (میلی‌متر)	۸/۷±۳/۶۲	صفر

سن و آزمون جلدی: میانگین ± انحراف معیار، سایر ویژگی‌ها: میانه (طیف)

در مطالعه Scott و Zaph بررسی شده است^{۲۳}. پس از بهبودی از عفونت *L. major* هر دو نوع لنفوسیت‌های خاطره‌ای ظاهر می‌شوند: لنفوسیت‌های T کارگزار وابسته به وجود انگل (آنتی‌ژن) با عمر کوتاه و لنفوسیت‌های T خاطره‌ای مرکزی مستقل از آنتی‌ژن با عمر طولانی. این محققین با استفاده از یک موتانت ناپایدار لیشمانیا ماژور (*dhfr-ts-*) نشان داده‌اند که فعالیت سلول‌های کارگزار در غیاب انگل (آنتی‌ژن) از بین می‌رود. اما بدون حضور پایدار آنتی‌ژن، ایمنی محافظت‌کننده توسط سلول‌های T خاطره‌ای مرکزی باقی می‌ماند. بررسی‌های دقیق‌تر نشان داد که جمعیت سلول‌های خاطره‌ای مرکزی با تبدیل به سلول‌های T کارگزار حیوان را در مقابل چالش با لیشمانیا ماژور محافظت می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که توسعه جمعیت سلول‌های T_{cm} به جای سلول‌های کم عمر effector T cell می‌تواند یکی از اهداف تولید واکسن‌های لیشمانیوز باشد^{۲۴،۲۵}. علی‌رغم برخی مطالعات در عفونت‌های انسانی، ماهیت سلول‌های خاطره‌ای و الگوی تغییرات آنها در لیشمانیوز انسانی تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است^{۲۶}.

طراحی واکسنی که باعث گسترش جمعیت مناسبی از سلول‌های خاطره‌ای با عمر طولانی شود نیاز به شناخت وضعیت سلول‌های T خاطره‌ای، عملکرد ایمنولوژیک و الگوی تغییرات آنها در بیماران بهبودیافته از سالک دارد، که معمولاً در مقابل عفونت مجدد مصون هستند. به عبارت دیگر، با توجه به این که شاخص مصنوعیت (surrogate marker) یعنی معیاری قابل اندازه‌گیری که بتوان بین افراد مصون و حساس افتراق قائل شد، در لیشمانیوز تعریف نشده است، ممکن است بتوان این شاخص را براساس الگوی سلول‌های خاطره‌ای تعریف کرد. با در اختیار داشتن اطلاعات لازم در مورد الگوی لنفوسیت‌های خاطره‌ای در افراد مصون، واکسن‌ها به گونه‌ای طراحی شوند که باعث بروز پاسخ ایمنی شبیه افراد مصون شود.

می‌شوند. سلول‌های تفکیک‌شده برای بررسی پاسخ به آنتی‌ژن لیشمانیا به‌طور مجزا کشت داده شدند.

کشت سلولی لنفوسیت‌های خاطره‌ای

محیط کشت مورد استفاده در تمام مراحل آزمایش RPMI 1640 غنی شده با ۲ mM L-glutamine، ۱۰۰ μg/ml streptomycin، ۱۰۰ U/ml penicillin G AB serum، 5×10^{-5} M/L 2-ME، ۱۰ mM/L HEPES ۱۰٪ است. مقدار 2×10^4 /well از سلول‌های تفکیک‌شده در محیط کشت RPMI همراه با 2×10^5 /well از مونوسیت‌های اتولوگ که با میتوماپسین غیرفعال شده بودند، در حجم نهایی ۰/۲ ml به صورت سه‌تایی در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. مقدار ۱۰ μg/ml SLA همراه با کنترل مثبت Phytohemagglutinin (PHA) سلول‌ها به کار گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵٪ CO₂ نگهداری شدند.

سنجش تکثیر سلولی لنفوسیت‌های خاطره‌ای با روش رنگ‌آمیزی Carboxy Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE)

به منظور بررسی پرولیفراسیون، لنفوسیت‌ها با رنگ فلورسان CFSE به میزان ۵ μM در دمای ۳۷ درجه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شست‌وشو، سلول‌ها به مدت ۵ روز در حضور آنتی‌ژن کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با فلوسایتومتر قرائت شدند. بررسی میزان تکثیر سلولی با استفاده از نرم‌افزار Modfit LT آنالیز شد^{۲۷}. نتایج حاصله به شکل درصد سلول‌های مختلف در نسل‌های مختلف تکثیر شده از سلول‌های مادر گزارش شدند.

رنگ‌آمیزی داخل سلولی سایتوکاین‌ها

جهت بررسی درصد سلول‌های ترشح‌کننده سایتوکاین، لنفوسیت‌ها به مدت ۵ ساعت در حضور Pohrbol Mirystic Acetate (PMA) به همراه

برای تهیه SLA، پس از شست‌وشوی پروماستیگوت‌های فاز ایستا با PBS، به مقدار 1×10^9 انگل در میلی‌لیتر آنزیم آنتی‌پروتئاز افزوده شد و مدت کوتاهی در ۴ درجه نگهداری شد. سپس با روش Sonication انگل‌ها خرد شد و سوسپانسیون حاصله ابتدا در دور $30/000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه و سپس در دور $100/000 \times g$ به مدت ۴ ساعت سانتریفوژ شدند. محلول رویی فیلتر شده و تا زمان استفاده در ۷۰ درجه نگهداری گردید^{۲۷}.

فنوتایپینگ با روش فلوسایتومتری

به منظور بررسی فراوانی سلول‌های خاطره‌ای، بخشی از سلول‌های تک‌هسته‌ای با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد شاخص‌های CD45RA، CD62L و CCR7 کونژوگه شده با FITC-، PE-، PE-Cy-5 با روش فلوسایتومتری بررسی شدند. از کنترل‌های ایزوتایپ به منظور تعیین حدود فلورسان مثبت استفاده شد. در این روش سلول‌ها با PBS شست‌وشو و با آنتی‌بادی‌های یاد شده رنگ‌آمیزی شدند. پس از انکوباسیون در دمای ۴ درجه، سلول‌ها با بافر یا محیط کشت RPMI 1640 به تعداد معینی در حجم ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون شد و توسط دستگاه قرائت شد.

جداسازی لنفوسیت‌های خاطره‌ای با روش Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

به منظور بررسی عملکرد، رده‌های مختلف لنفوسیت‌ها با استفاده از سوسپانسیون PBMC تفکیک شدند. برای جداسازی لنفوسیت‌های خاطره‌ای از میکروبیدهای پوشیده شده با آنتی‌بادی اختصاصی مطابق دستورالعمل ذکر شده در کیت استفاده شد. سوسپانسیون سلول‌های کونژوگه شده با مونوکلونال آنتی‌بادی در بافر PBS در میدان مغناطیسی بر روی ستون‌های مخصوص مجزا شدند. که شامل

CD45A+ CCR7+ native T cells,
CD45RA- CCR7+ central memory T cells,
CD45RA- CCR7- effector memory T cells

شده با آویدین و سپس سوبسترا TMP اضافه و واکنش متوقف شد. پلیت‌ها با دستگاه ELISA-reader قرائت گردید. نتایج OD هر کدام از واکنش‌ها با استفاده از نمودار استاندارد به صورت غلظت براساس pg/ml گزارش شدند.

یافته‌ها

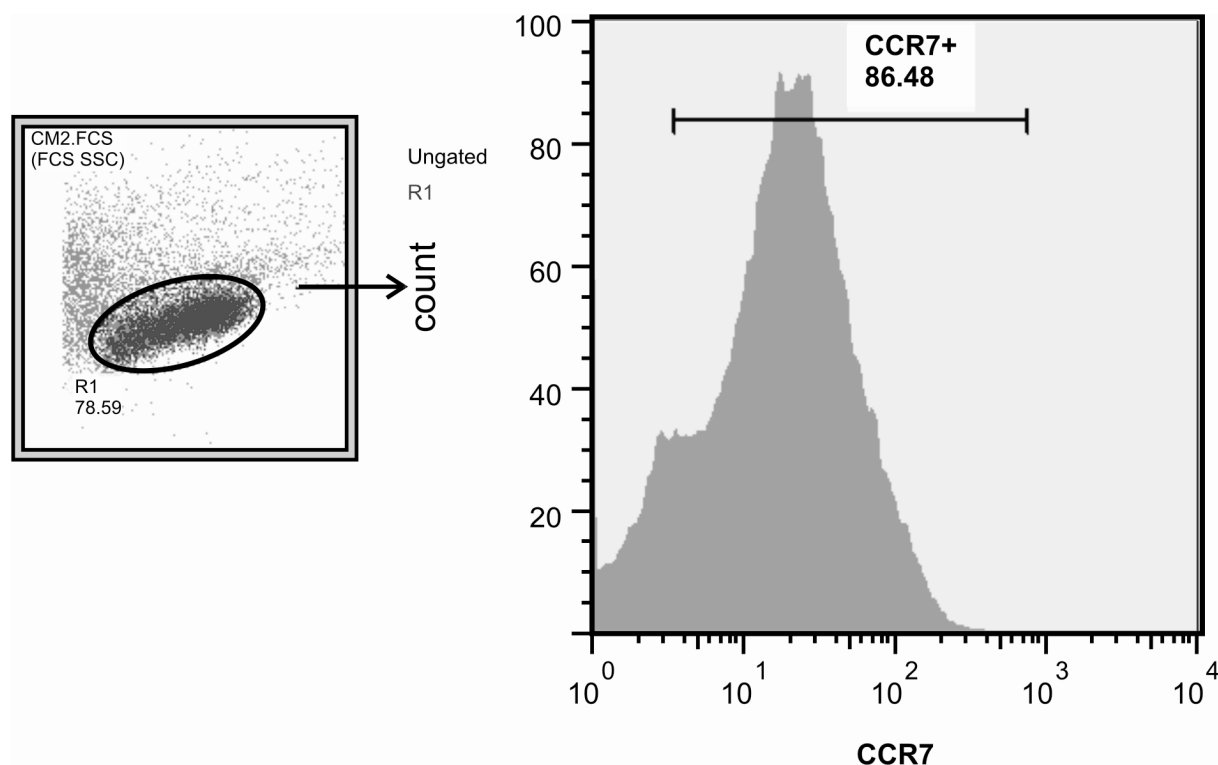
فوتوپیینگ لنفوسیت‌های خاطره‌ای با روش فلوسایتومتری

با استفاده از شاخص‌های سطحی رده‌های مختلف لنفوسیتی با روش MACS تفکیک شدند. لنفوسیت‌های T_{cm} با بیان بالای گیرنده CCR7 شناخته می‌شود (شکل ۱). در عین حال فنوتیپ لنفوسیت‌ها پس از کشت و تحریک با آنتی‌ژن تغییراتی نشان می‌دهد. برای هر داوطلب مجموعه‌ای از هیستوگرام‌های فلوسایتومتری وجود دارد که به منظور خلاصه‌تر شدن، نتایج حاصل از بررسی گیرنده‌های سلول به شکل

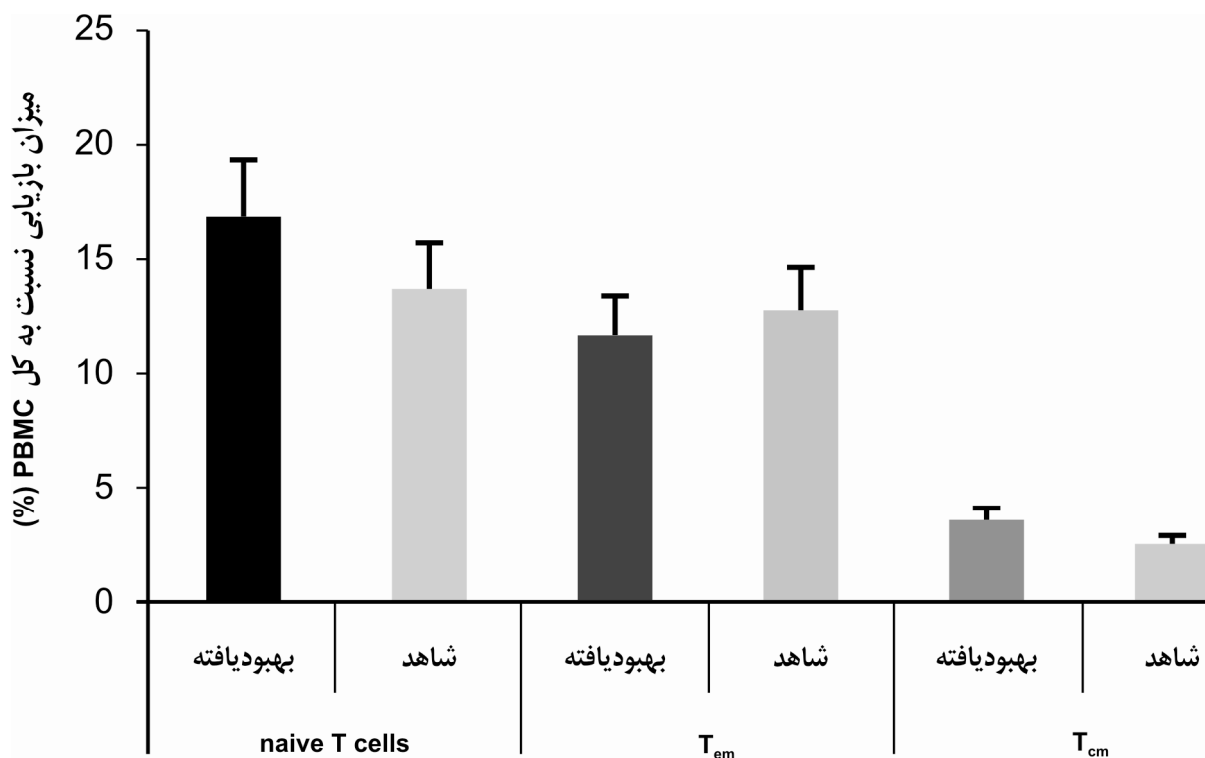
یونومایسین (ionomycin) در محیط کشت تحریک شدند. موننزین سدیم (sodium monensin) به منظور بلوک کردن ترشح سلولی در ۴ ساعت آخر کشت اضافه شد و سپس غشاء سلول‌ها با بافر ساپونین نفوذپذیر گردید. آنتی‌بادی کونژوگه ضد IFN- γ و IL-2 به سلول‌ها اضافه شد و پس از انکوباسیون سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردید.

بررسی سایتوکاین‌ها به روش الایزا

روش الایزا ساندریج به منظور اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها در محلول رویی حاصل از کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور مطابق دستورالعمل کیت در ابتدا کف چاهک‌ها با مونوکلونال آنتی‌بادی ضد سایتوکاین پوشیده شدند. سپس نمونه‌های مورد نظر به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک پلیت اضافه شده و پس از انکوباسیون، مونوکلونال آنتی‌بادی دوم کونژوگه شده با بیوتین به آنها افزوده شد. با اضافه کردن آنزیم HRP کونژوگه



شکل ۱: لنفوسیت‌های خاطره‌ای مرکزی (T_{cm}) پس از تفکیک مارکر سطحی CCR7 را بیان می‌کنند



شکل ۲: فراوانی زیرگروه‌های لنفوسیت خاطره‌ای حاصله از خون محیطی در داوطلبین مورد آزمایش

در آنالیز لنفوسیت‌های T_{cm} در نسل سوم و چهارم تکثیر شده از سلول مادر، درصد سلول‌ها در گروه بهبودیافته بیش از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). همچنین در آنالیز لنفوسیت‌های T_{em} در نسل دوم از تکثیر، درصد سلول‌ها در گروه بهبودیافته بیش از گروه شاهد بود ($P < 0.05$).

سنجش سایتوکاین‌ها در کشت رده‌های لنفوسیتی

میزان متوسط ترشح اینترفرون گاما در کشت سلول‌های T_{em} در پاسخ به تحریک با SLA در کشت نشان می‌دهد که میانگین این سایتوکاین در سلول‌های داوطلبین بهبودیافته در مقایسه با سلول‌های گروه شاهد افزایش معنی‌داری دارد ($P = 0.04$) (شکل ۵). در اندازه‌گیری میزان سایتوکاین اینترفرون گاما در کشت سلول‌های T_{em} و سلول‌های native T اختلاف معنی‌داری بین گروه بهبودیافته و شاهد مشاهده نشد.

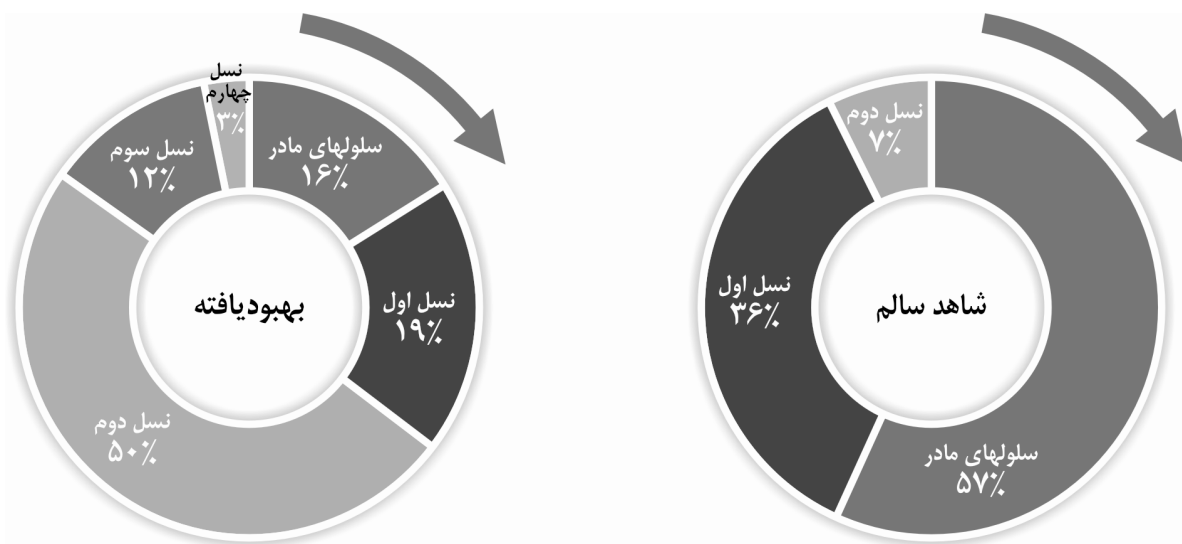
فراوانی زیرگروه‌های لنفوسیتی به‌صورت میانگین در بیماران و گروه کنترل نشان داده شده است (شکل ۲). به‌طور کلی در هر دو گروه بیماران و شاهد به ترتیب درصد زیرگروه‌های CD45RA+ CCR7+ naive T و CD45RA- CCR7- effector memory T cells بیش از سایر زیرگروه‌ها بوده است. در عین حال بین بیماران و گروه کنترل از نظر فراوانی این زیر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

تکثیر لنفوسیت‌های خاطره‌ای پس از تحریک با آنتی‌ژن

سنجش تکثیر سلولی لنفوسیت‌های خاطره‌ای با اندازه‌گیری شدت رنگ CFSE انجام شده و به شکل درصد سلول‌های مختلف در هر نسل تکثیر شده از سلول‌های مادر نشان داده شده است (اشکال ۳ و ۴). در لنفوسیت‌های CD4+ native T اختلاف معنی‌داری بین گروه بهبودیافته و گروه شاهد در درصد سلول‌های نسل‌های مختلف تکثیر شده مشاهده نشد.



شکل ۳: روند تکثیر لنفوسیت‌های T_{cm} پس از کشت در حضور آنتی ژن لیشمانیا

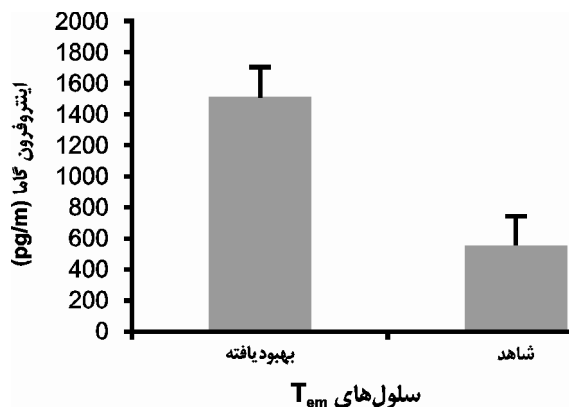


شکل ۴: روند تکثیر لنفوسیت‌های T_{em} پس از کشت در حضور آنتی ژن لیشمانیا

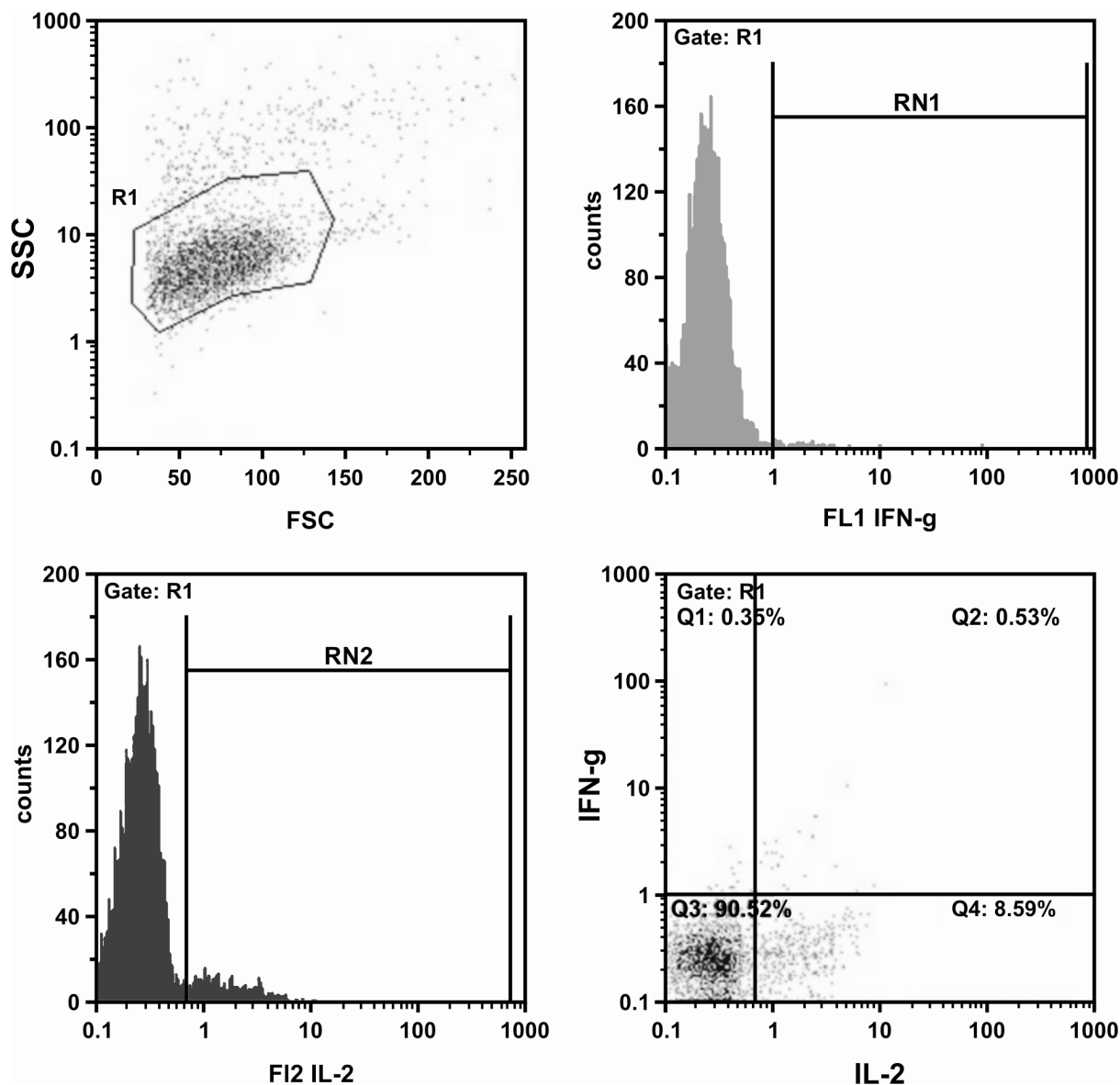
در اندازه‌گیری میزان سایتوکاین IL-13 و IL-10 در کشت سلولی لنفوسیت‌های رده‌های مختلف اختلاف معنی‌داری بین گروه بهبودیافته و شاهد مشاهده نشد. همچنین کشت PBMC حاصل از گروه بهبودیافته و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را در میزان IL-13 و IL-10 نشان نداد.

رنگ‌آمیزی داخل سلولی برای سایتوکاین‌ها

در آنالیز فراوانی سلول‌های ترشح‌کننده سایتوکاین‌های داخل سلولی برای هر بیمار نتایج



شکل ۵: میزان ترشح اینترفرون گاما در کشت لنفوسیت‌های T_{em}



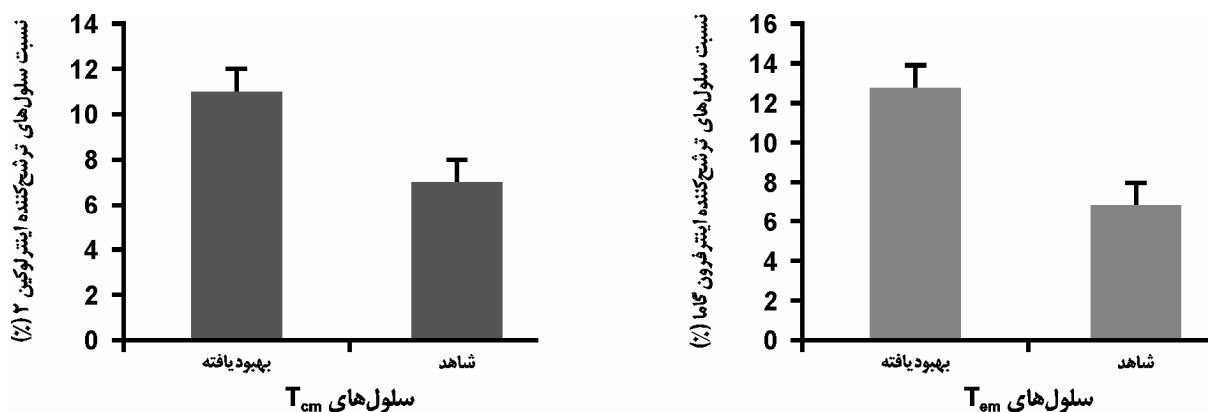
شکل ۶: نمونه‌ای از پلات فلوسایتومتری نشان‌دهنده فراوانی لنفوسیت‌های T_{cm} که IL-2 و IFN- γ داخل سلولی را ترشح می‌کنند.

positive در گروه بهبودیافته به‌طور معنی‌داری ($P < 0.032$) بیش از گروه شاهد بود (شکل ۷).

بحث

تاکنون خاطره ایمونولوژیک و لنفوسیت‌های T خاطره‌ای $CD4^+/CD8^+$ در عفونت‌های مختلف در مدل موشی^{۲۸-۳۱} و انسان^{۲۱،۲۲-۳۵} بررسی شده‌است. از سال‌ها پیش، ناهمگون بودن لنفوسیت‌های T خاطره‌ای در مطالعات مختلف گزارش شده بود^{۳۶-۳۹}. در یکی از

جداگانه‌ای از فلوسایتومتری به‌دست آمد که نمونه‌ای از آن در شکل ۶ نشان داده شده‌است و براساس آن درصد لنفوسیت‌های ترشح‌کننده سایتوکاین‌ها استخراج شدند. با تجمیع داده‌های تمام بیماران، میانگین درصدها در شکل ۷ نشان داده شده‌است. در بررسی فراوانی، درصد سلول‌های T_{cm} IL-2-positive در گروه بهبودیافته به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیش از گروه شاهد بود. همچنین درصد لنفوسیت‌های IFN- γ - T_{em}



شکل ۷: فراوانی لنفوسیت‌های T_{cm} ترشح‌کننده IL-2 و لنفوسیت‌های T_{cm} ترشح‌کننده IFN- γ نسبت به کل رده سلولی مربوطه

سایر زیرگروه‌ها به دست آمد. میزان پایین این رده سلولی در برخی مطالعات نشان داده شده است که در عین حال با برخی از گزارش‌های دیگر در انسان همخوانی ندارد.^{۳۲}

ممکن است پایین بودن فراوانی T_{cm} در این بررسی به علت حساس بودن گیرنده کموکاینی CCR7 و نیز CD62L به شرایط فیزیکی و ریزش آن از سطح سلول در حین ردیابی باشد.^{۴۲} گزارش‌های دیگری وجود دارد که T_{cm} در لنفوسیت‌های گروه CD4+ و T_{em} در گروه CD8+ نسبت بالایی دارند.^{۳۵،۴۱} در این مطالعه الگوی فنوتیپی رده‌های مختلف لنفوسیت‌های خاطره‌ای در گروه بهبودیافته با گروه شاهد تفاوتی نداشته است.

با توجه به تماس مداوم افراد با آنتی‌ژن‌های محیطی در طول زندگی، نگهداری حجم زیادی از سلول‌های خاطره‌ای برای هر کدام از آنتی‌ژن‌ها برای موجود زنده مقرون به صرفه و منطقی به نظر نمی‌رسد.^{۴۳} در عین حال، فنوتیپ لنفوسیت‌های خون محیطی از جمله لنفوسیت‌های خاطره‌ای (بدون تفکیک رده‌های مختلف) در بیماری لیشمانیوز احشایی ناشی از لیشمانیا دونووانی بررسی و نشان داده شده است که لنفوسیت‌های T خاطره‌ای در بیماران در مرحله فعالیت بیماری کاهش معنی‌داری در مقایسه با افراد بهبودیافته یا بدون علامت نشان می‌دهند.^{۴۴}

آخرین دسته‌بندی‌ها، دو گروه مجزا از این لنفوسیت‌ها براساس بیان گیرنده‌های لانه‌گزینی گزارش شده است: لنفوسیت‌های T خاطره‌ای کارگزار و لنفوسیت‌های T خاطره‌ای مرکزی.^{۱۴}

پیش از این در مطالعه‌ای بر روی موش وجود این دو گروه از لنفوسیت‌ها در عفونت با لیشمانیا مازور نشان داده شده است.^{۲۵} در عین حال، مطالعه جامع دیگری در لنفوسیت‌های خاطره‌ای در لیشمانیازیس در انسان گزارش نشده است.^{۲۶}

در این مطالعه از شاخص‌های سطحی CCR7، CD62L و CD45RA برای فنوتایپینگ رده‌های مختلف لنفوسیت‌های خاطره‌ای استفاده شد. این شاخص‌ها عمدتاً به عنوان گیرنده‌های لانه‌گزینی عمل می‌کنند و لنفوسیت‌ها را قادر می‌سازند تا در اعضاء لنفی ثانویه یا محل عفونت مستقر شوند.^{۴۰}

در ابتدا فراوانی این رده‌ها در خون محیطی داوطلبان مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. فراوان‌ترین رده سلولی در گردش در هر دو گروه بیمار بهبود یافته و شاهد سالم، لنفوسیت‌های T بکر بودند. پیش از این هم در مطالعات دیگر در انسان گزارش شده که لنفوسیت‌های T بکر که اختصاصی آنتی‌ژن نیستند، فراوان‌ترین رده لنفوسیتی را در خون محیطی تشکیل می‌دهند.^{۳۳-۳۴،۴۱} در این مطالعه نسبت T_{cm} کمتر از

از الیزا را در خصوص ترشح اینترفرون گاما از T_{em} در گروه بهبودیافته تأیید کرد.

با توجه به تجمع و بازخوانی لنفوسیت‌های کارگزار به محل عفونت، ترشحات این سلول‌ها شامل سایتوکاین‌های گروه Th1 نظیر اینترفرون گاما و گروه Th2 نظیر اینترلوکین ۴ می‌شود که به‌عنوان مکانیسم عملکرد این سلول‌ها در مقابل عفونت نوعی ابزار ضروری به‌نظر می‌رسد.

با توجه به اینکه افراد مورد مطالعه بهبودیافته از سالک هستند، برتری سایتوکاین‌های گروه Th1 توسط سلول‌های کارگزار مورد انتظار بود. کما این که مطالعات قبلی بر روی کشت PBMC نشان‌دهنده افزایش ترشح اینترفرون گاما در بیماران بهبودیافته از سالک است.^{۴۷-۵۰} از طرفی لنفوسیت‌های T_{em} که اینترلوکین ۲ ترشح می‌کنند، در گروه بهبودیافته بیش از گروه شاهد بود. قبلاً نشان داده شده‌است که ترشح اصلی رده T_{em} اینترلوکین ۲ است.^{۱۴} این سایتوکاین اثر اتوکراین بر روی سلول‌های مترشحه دارد و بدین طریق باعث ابقا و تزیاد جمعیت سلولی تحت تأثیر می‌شود و نقش این سایتوکاین در ابقای لنفوسیت‌های T شناخته شده‌است.^{۱۲}

مطالعه حاضر بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) انجام شده‌است که تنها منبع لنفوسیت‌های T برای مطالعه ایمنی در افراد بهبودیافته از سالک به‌حساب می‌آید. ممکن است این نتایج بازتاب‌دهنده واقعی وضعیت فنوتیپ لنفوسیت‌های ارتشاح یافته در اطراف زخم نباشد و شواهدی وجود دارد که این ایده را محتمل می‌کند. مطالعه لنفوسیت‌های T در خون محیطی در بیماران دچار آدنوکارسینوما نشان داده‌است که بین بیماران شاهد سالم از نظر فنوتیپ رده‌های مختلف لنفوسیت‌های خاطره‌ای، کارگزار و بکر $CD8^+$ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما در مایع پلور بیماران نسبت بالایی از لنفوسیت‌های خاطره‌ای مشاهده شد.^{۵۱}

وجود اختلاف معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌های خاطره‌ای در خون محیطی در بیماری مالاریا نیز گزارش شده‌است. در یک بررسی، افزایش معنی‌دار لنفوسیت‌های $CD4^+$ T خاطره‌ای در عفونت حاد با پلاسمودیوم ویواکس در مقایسه با افراد سالم گزارش شده‌است.^{۳۳}

در گام بعدی به‌منظور بررسی عملکرد سلول‌ها به‌طور مجزا، رده‌های لنفوسیتی با روش MACS تفکیک شدند و در حضور آنتی‌ژن کشت داده شدند. ارزیابی‌ها نشان دادند که بین سلول‌های گروه بهبودیافته با گروه شاهد از نظر میزان تکثیر سلولی، میزان ترشح سایتوکاین‌ها و تعداد لنفوسیت‌های ترشح‌کننده سایتوکاین داخل سلولی اختلافات معنی‌داری وجود دارد.

در این بررسی مشخص شد اگر چه هر دو رده T_{em} و T_{cm} حاصل از داوطلبان بهبودیافته در پاسخ به آنتی‌ژن تکثیر می‌یابند اما میزان تکثیر T_{em} به‌طور معنی‌داری بالاتر از رده‌های دیگر است؛ این مشاهده مطابق گزارش‌های قبلی در مورد ویژگی‌های T_{cm} است.^{۱۴،۴۵}

لنفوسیت‌های T_{cm} به‌عنوان جمعیت پشتیبان در زمان عفونت مجدد با آنتی‌ژن قابلیت تبدیل به لنفوسیت‌های کارگزار را دارند.^{۴۶} بررسی با فلوسیتومتری در این مطالعه نیز نشان داد که فنوتیپ T_{cm} پس از تحریک با آنتی‌ژن به T_{em} تبدیل می‌شود. توان بالای T_{cm} در تکثیر، باعث ابقای جمعیت این سلول‌ها در خون محیطی و مراکز لنفی ثانویه می‌شود که این مسأله با توجه به پتانسیل تبدیل منظم این جمعیت به سلول‌های T_{em} در مواقع عفونت مجدد لیشمانیا، از نظر تئوریک حائز اهمیت است.

میزان اینترفرون گاما در کشت سلول‌های T_{em} در پاسخ به آنتی‌ژن انگل در گروه بهبودیافته به‌طور معنی‌داری بیش از گروه شاهد سالم به‌دست آمد. بررسی بیشتر با رنگ‌آمیزی داخل سلولی نتایج حاصل

خاطره‌ای در بیماران بهبودیافته از سالک در خون محیطی معرفی می‌شوند و به‌نظر می‌رسد با توجه به مصونیت داوطلبان مورد مطالعه در برابر عفونت مجدد، هر دوی این رده‌ها در مصونیت در برابر عفونت مجدد لیشمانیا نقش ایفا می‌کنند. در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود فنوتیپ و نقش این سلول‌ها در سایر اشکال لیشمانیوز و نیز در طی بروز و بهبود زخم سالک مورد بررسی قرار گیرد.

در مطالعه‌ای بر روی موش، نشان داده شده‌است که جمعیت‌های متمایزی از لنفوسیت‌های خاطره‌ای $CD4^+$ از نظر فنوتیپ و عملکرد در بافت‌های لنفی و غیرلنفی وجود دارند^{۵۲}.

در این مطالعه سلول‌های T_{em} اختصاصی لیشمانیا ترشح‌کننده اینترفرون گاما و سلول‌های T_{cm} اختصاصی لیشمانیا ترشح‌کننده اینترلوکین ۲ در بیماران بهبودیافته از سالک تشخیص داده شدند. این دو فنوتیپ به‌عنوان رده‌های اصلی لنفوسیت‌های

References

1. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:239-243.
2. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:581-96.
3. Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, et al. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med* 2006; 3:e162.
4. Wolday D, Berhe N, Akuffo H, et al. Emerging *Leishmania*/HIV co-infection in Africa. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190:65-67.
5. Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, et al. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 2006; 123:423-38.
6. Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, et al. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* 2008; 26:6759-67.
7. Noazin S, Khamesipour A, Moulton LH, et al. Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis: a meta-analysis. *Vaccine* 2009; 27:4747-53.
8. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:845-58.
9. Locksley RM, Heinzl FP, Sadick MD, et al. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1987; 138: 744-49.
10. Locksley RM, Heinzl FP, Holaday BJ, et al. Induction of Th1 and Th2 $CD4^+$ subsets during murine *Leishmania major* infection. *Res Immunol* 1991; 142:28-32.
11. Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Ann Rev Immunol* 2002; 551-79.
12. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:251-62.
13. Farber DL. T cell memory: heterogeneity and mechanisms. *Clin Immunol* 2000; 95:173-81.
14. Sallusto F, Langenkamp A, Geginat J, Lanzavecchia A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000:167-71.
15. Sallusto F, Lenig D, Forster R, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-12.

16. Rogers PR, Dubey C, Swain SL. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective, responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 2000; 164:2338-46.
17. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4+ T cells. *J Exp Med* 2001; 194:1711-19.
18. McMichael AJ, Ogg G, Wilson J, et al. Memory CD8+ T cells in HIV infection. *Philosophical Trans R Soc Biological Sciences* 2000; 355:363-67.
19. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 2004; 78:5535-5545.
20. Savarin C, Bergmann CC, Hinton DR, et al. Memory CD4+ T-cell-mediated protection from lethal coronavirus encephalomyelitis. *J Virol* 2008; 82:12432-40.
21. Tussey L, Speller S, Gallimore A, Vessey R. Functionally distinct CD8+ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur J Immunol* 2000; 30:1823-29.
22. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745-63.
23. Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 2004; 10:1104-10.
24. Gollob KJ, Antonelli LRV, Dutra WO. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 2005; 21:347-50.
25. Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol Rev* 2004; 201:318-38.
26. Scott P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 2005; 7:1707-13.
27. Nateghi Rostami M, Khamesipour A, Eskandari SE, et al. Flow cytometric analysis of *Leishmania* reactive CD4+/CD8+ lymphocyte proliferation in cutaneous leishmaniasis. *Iranian J Parasitol* 2008; 3:9-18.
28. Andersen P, Smedegaard B. CD4+ T-cell subsets that mediate immunological memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun* 2000; 68:621-29.
29. Belz GT, Wodarz D, Diaz G, et al. Compromised influenza virus-specific CD8+ T-cell memory in CD4+ T-cell-deficient mice. *J Virol* 2002; 76:12388-93.
30. Ostler T, Hussell T, Surh CD, et al. Long-term persistence and reactivation of T cell memory in the lung of mice infected with respiratory syncytial virus. *Eur J Immunol* 2001; 31:2574-82.
31. Selin LK, Cornberg M, Brehm MA, et al. CD8 memory T cells: Cross-reactivity and heterologous immunity. *Semin Immunol* 2004; 16:335-47.
32. Bozzi A, Reis BS, Goulart MI, et al. Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. *Immunol Letters* 2007; 114:23-30.
33. Jangpatarapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, et al. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microb Infect* 2006; 8:680-86.
34. Mitra DK, De Rosa SC, Luke A, et al. Differential representations of memory T cell subsets is characteristic of polarized immunity in leprosy and atopic diseases. *Int Immunol* 1999; 11:1801-10.

35. Caccamo N, Meraviglia S, La Mendola C, et al. Phenotypical and functional analysis of memory and effector human CD8 T cells specific for mycobacterial antigens. *J Immunol* 2006; 177:1780-85.
36. Ahmadzadeh M, Hussain SF, Farber DL. Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells. *J Immunol* 2001; 166:926-35.
37. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 2009; 39:2076-82.
38. Rocha B, Tanchot C. CD8 T cell memory. *Semin Immunol* 2004; 16:305-14.
39. Stockinger B, Kassiotis G, Bourgeois C. CD4 T-cell memory. *Semin Immunol* 2004; 16:295-303.
40. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:326-32.
41. Saule P, Trauet J, Dutriez V, et al. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8+ compartment. *Mech Ageing Dev* 2006; 127:274-81.
42. Berhanu D, Mortari F, De Rosa SC, Roederer M. Optimized lymphocyte isolation methods for analysis of chemokine receptor expression. *J Immunol Methods* 2003; 279:199-207.
43. Gray D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:60-65.
44. Hailu A, van Baarle D, Knol GJ, et al. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol* 2005; 117:182-91.
45. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, et al. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001; 410:101-05.
46. Schoenberger SP. T cell memory. *Semin Immunol* 2009; 21:51-52.
47. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, et al. 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; 68:1760-64.
48. 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; 54:414-20.
49. Mahmoodi M, Khamesipour A, Dowlati Y, et al. Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with low dose of BCG. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:303-08.
50. Nateghi Rostami M, Keshavarz Valian H, Eskandari SE, et al. Differential in vitro CD4+ /CD8+ T cell response to live vs. killed *Leishmania major*. *Parasite Immunol* 2010; 32:101-10.
51. Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Flores-Vergara H, et al. Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2005; 47:361-71.
52. Kassiotis G, Stockinger B. Anatomical heterogeneity of memory CD4+ T cells due to reversible adaptation to the microenvironment. *J Immunol* 2004; 173:7292-98.

Phenotyping of peripheral memory T cell subsets in cutaneous leishmaniasis

Ali Khamesipour, PhD¹
Mahmoud Nateghi Rostami, PhD^{2,3}
Hossein Keshavarz, PhD²
Akram Miramin Mohammadi, Sc¹
Minoo Tasbihi, MSc¹
Tahereh Shahrestani, MSc⁴
Abdolfattah Sarrafnejad, MD,
PhD⁴

1. Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy; Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health; Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
4. Department of Immunology, School of Public Health; Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding author
Hossein Keshavarz, PhD

Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: hkishavarz@tums.ac.ir

Background and Aim: The heterogenous population of memory T lymphocytes is distinguished based on surface markers and effector functions such as cytokine secretion. Recently, two subsets of memory T cells are defined by expression of chemokine receptor CCR7 and CD45RA designating as "central memory" T cells (T_{CM}) and "effector memory" T cells (T_{EM}). The objective of this study was to evaluate the phenotype and function of these lymphocytes in healed cases of cutaneous leishmaniasis.

Methods: The phenotype of lymphocytes were determined in blood samples of 13 volunteers with history of self healing cutaneous leishmaniasis (HCL) and in 6 healthy controls.

Results: No significant difference was found in memory T cell subsets between HCL volunteers and healthy controls using flow cytometry. However, following sorting of different memory subsets, a significantly higher proliferation was seen in cells of HCL volunteers comparing to the control group. A significantly higher IFN- γ response in T_{EM} and a significantly higher IL-2 response in T_{CM} were observed in cell culture of HCL volunteers comparing controls.

Conclusion: The responses were elicited when the cells were stimulate with SLA *in vitro*, it is concluded *Leishmania*-specific T_{EM} and *Leishmania*-specific T_{CM} subsets exist in HCL volunteers and since the volunteers with history of CL presumed to be protected against reinfection, it seems that both T_{CM} and T_{EM} play role in the protection against *Leishmania* infection in these individuals.

Keywords: memory T cells; cutaneous leishmaniasis; flow cytometry