

## فناوتاپینگ لنفوسيت‌های T خاطره‌ای در گرددش در سالک

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

**روش اجرا:** بررسی فنوتیپی لنفوسيت‌ها با استفاده از مارکرهای سطحی مربوطه با روش فلوسایتمتری 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 دیابایی لنفوسيت‌های خاطره‌ای اختصاصی لیشمانيا صرفاً با مطالعه فنوتیپی امکان‌پذیر نیست. با تفکیک و سپس کشت رده‌های لنفوسيتی، روند تکثیر و سایتوکاین‌های ترشحی پس از تحریک با آنتی‌ژن اندازه‌گیری شدند. تکثیر سلولی به طور معنی‌داری در لنفوسيت‌های گروه بهبودیافته بیش از شاهد بود. میزان اینترفرون گاما در لنفوسيت‌های  $T_{em}$  گروه بهبودیافته به طور 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 لنفوسيت‌های  $T_{cm}$  تولیدکننده این سایتوکاین بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اینکه تکثیر سلولی و پاسخ سایتوکاینی لنفوسيت‌ها در برابر تحریک با آنتی‌ژن انگل حاصل شده‌است، این لنفوسيت‌ها به عنوان لنفوسيت‌های خاطره‌ای مرکزی و کارگزار اختصاصی لیشمانيا معرفی می‌شوند و به نظر می‌رسد در محافظت علیه لیشمانيوز در افراد بهبودیافته هر دو نوع لنفوسيت  $T_{cm}$  و  $T_{em}$  همراه با یکدیگر نقش دارند.

**کلید واژه‌ها:** لنفوسيت‌های T خاطره‌ای، لیشمانيوز جلدی، فلوسایتمتری

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

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

دکتر علی خامسی‌پور<sup>۱</sup>  
دکتر محمود ناطقی‌رستمی<sup>۲</sup>  
دکتر حسین کشاورز<sup>۲</sup>  
اکرم میرامین محمدی<sup>۱</sup>  
مینو تسبیحی<sup>۱</sup>  
سیده طاهره شهرستانی<sup>۴</sup>  
دکتر عبدالفتاح صراف‌نژاد<sup>۴</sup>

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

میلیون نفر در معرض خطر اکتساب بیماری می‌باشند و میزان بروز سالانه لیشمانيوز تقریباً ۲ میلیون مورد است که بخش عمده آن از نوع جلدی (سالک) می‌باشد<sup>۱۰</sup>. در ایران، لیشمانيوز احشایی به صورت پراکنده تقریباً از همه ایران گزارش می‌شود و سالک در حداقل ۱۵ استان کشور اندemic می‌باشد که شامل دو نوع روسستایی Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) با عامل *L. major* و شهری (ACL)

### مقدمه

لیشمانيوز 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 میکرووارگانیسم‌ها به محل‌های عفونت مهاجرت می‌کنند. بخشی از این سلول‌های کارگزار تبدیل به لنفوسيت‌های T خاطره‌ای می‌شوند و مسئولیت خاطره اینمی را به‌عهده دارند<sup>۱۱،۱۲</sup>. 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<sup>۱۳</sup>. براساس شاخص‌های سطحی، لنفوسيت‌های 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 (Effector Memory T cell) معرفی کارگزار (CD62L) گردد<sup>۱۴،۱۵</sup>. سلول‌های T<sub>cm</sub> با بیان گیرنده کموکاینی CCR7 و گیرنده لانه‌گزینی CD62L مشخص می‌شوند در صورتی که سلول‌های T<sub>em</sub> قادر گیرنده‌های CCR7 و CD62L هستند. لنفوسيت‌های CD4+ T<sub>cm</sub> در خون محیطی گردش کرده، در اعضا لنفي ثانويه مستقر می‌شوند و سایتوکاین عمدت آنها IL-2 است. در حالی که لنفوسيت‌های CD4+ T<sub>em</sub> در بافت‌های غيرلنفي و محل‌های عفونت مستقر می‌شوند و پس از تحريك آنتيژنيکي سایتوکاین‌هاي گروه Th1 يا Th2 را توليد می‌کنند<sup>۱۶</sup>.

عملکردهای متفاوت رده‌های مختلف سلول‌های خاطره‌ای CD4+ یا CD8+ در برخی از مطالعات بر روی موش<sup>۱۷</sup>، انسان سالم<sup>۱۸</sup> و بیماران مبتلا به برخی از بیماری‌های ویروسی<sup>۱۹-۲۱</sup> گزارش شده است. تحريك سلول خاطره‌ای مرکزی (CD62L+ CCR7+) منجر به تولید IL-2 می‌شود ولی در عوض تحريك سلول‌های خاطره‌ای کارگزار (CD62L- CCR7-) (Naive T cells) در سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4 و IL-5 و مقداری ناچیزی IL-2 می‌گردد و این سلول‌ها می‌توانند به سرعت نقش سلول‌های کارگزار را ایفا نمایند<sup>۲۲</sup>. در لیشمانيوز مدل موشی نقش اين دو جمعیت از لنفوسيت‌های خاطره‌ای

Anthropontic Cutaneous Leishmaniasis با عامل *L. tropica* می‌باشد. به علت مشکلات فراوان در کنترل لیشمانيوز، از جمله انتشار وسیع مخازن (جوندگان) و مشکل مبارزه با آنها، دشواری درمان و بروز مقاومت دارویی، و نیز گزارش عفونت‌های همراه HIV-*Leishmania* معرض بهداشتی نیاز به توجه ویژه مسئولین امور بهداشتی دارد<sup>۲۳-۲۴</sup>.

در همین راستا، سال‌هاست که در سطح جهان مطالعات مختلفی به منظور یافتن واکسنی مؤثر علیه لیشمانيوز آغاز گردیده است<sup>۲۵</sup> اما تا کنون ماحصل این تلاش‌ها منجر به دستیابی به واکسنی علیه هیچ‌یک از انواع لیشمانيوز نشده است<sup>۷</sup>. پیچیدگی پاسخ‌های اینمی به‌ویژه در لیشمانيوز انسانی و عدم شناخت کافی زوایای این پیچیدگی از علل مهم عدم دستیابی به واکسن مؤثر علیه لیشمانيوز بوده است<sup>۲۶</sup>. تقریباً همه نژادهای موش‌های آزمایشگاهی به عفونت *Leishmania major* به اصطلاح مقاوم هستند. عفونت در این نژادهای موش باعث ایجاد پاسخ اینمی از نوع IL-2 می‌گردد و ضایعاتی Th1 همراه با ترشح γ-IFN، IL-2، IL-4 می‌باشند. خودبخود بهبود یابنده شبیه سالک ایجاد می‌کند و بهبود با مصنوبیت کامل در مقابل عفونت بعدی همراه است. ولی عفونت *L. major* در موش‌های حساس Balb/c باعث ایجاد پاسخ اینمی از نوع Th2 و ترشح IL-4 و IL-5 می‌گردد که در این حالت عفونت پیشرونده بوده و سرانجام مرگ و میر صدرصد موش‌ها را باعث می‌شود<sup>۲۷</sup>.

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

در این مطالعه ما فنوتیپ و عملکرد لنفوسيت‌های T خاطره‌ای را در افراد بهبودیافته از سالک مورد بررسی قراردادهایم.

### 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 آگاهانه‌آخذ و سپس آزمون لیشمانین برروی آنها انجام شد و مشخصات بیماران در فرم‌های مخصوص ثبت شد. از بیماران یک نمونه ۲۰ میلی لیتر خون هپارینه (PBMC) گرفته و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (T cell) با سانتریفوژ برروی محلول فایکول جداسازی شد.

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

در این مطالعه از انگل لیشمانیا مژور 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.<sup>۲۳</sup> پس از بهبودی از عفونت *L.major* هر دو نوع لنفوسيت‌های خاطره‌ای ظاهر می‌شوند: لنفوسيت‌های T کارگزار وابسته به وجود انگل (آنٹیژن) با عمر کوتاه و لنفوسيت‌های T خاطره‌ای مرکزی مستقل از آنتیژن با عمر طولانی. این محققین با استفاده از یک موتانت ناپایدار لیشمانیا مژور (*dhfr-ts*) نشان داده‌اند که فعالیت سلول‌های کارگزار در غیاب انگل (آنٹیژن) از بین می‌رود. اما بدون حضور پایدار آنتیژن، این می‌حافظت کننده 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 مژور محافظت می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که توسعه جمعیت سلول‌های *T<sub>cm</sub>* به جای سلول‌های کم عمر effector *T cell* می‌تواند یکی از اهداف تولید واکسن‌های لیشمانیوز باشد.<sup>۲۴ و ۲۵</sup> علی‌رغم برخی مطالعات در عفونت‌های انسانی، ماهیت سلول‌های خاطره‌ای و الگوی تغییرات آنها در لیشمانیوز انسانی تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است.<sup>۲۶</sup>

طراحی واکسنی که باعث گسترش جمعیت مناسبی از سلول‌های خاطره‌ای با عمر طولانی شود نیاز به شناخت وضعیت سلول‌های T خاطره‌ای، عملکرد ایمونولوژیک و الگوی تغییرات آنها در بیماران بهبودیافته از سالک دارد، که معمولاً در مقابل عفونت مجدد مصنون هستند. به عبارت دیگر، با توجه به این که شاخص مصنونیت (surrogate marker) (یعنی معیاری قابل اندازه‌گیری که بتوان بین افراد مصنون 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 لنفوسيت‌های خاطره‌ای در افراد مصنون، واکسن‌ها به گونه‌ای طراحی شوند که باعث بروز پاسخ ایمنی شبیه افراد مصنون شود.

می‌شوند. سلول‌های تفکیک شده برای بررسی پاسخ به آنتیژن لیشمانیا به طور مجزا کشت داده شدند.

### کشت سلولی لنفوسيت‌های خاطره‌ای

محیط کشت مورد استفاده در تمام مراحل آزمایش  $2\text{ mM L-glutamine}$ ,  $1640\text{ RPMI}$  غنی شده با  $100\text{ }\mu\text{g/ml streptomycin}$ ,  $100\text{ U/ml penicillin G AB serum}$ ,  $5\times 10^{-5}\text{ M/L 2-ME}$ ,  $10\text{ mM/L Hepes}$  است. مقدار  $2\times 10^4$  از سلول‌های تفکیک شده در محیط کشت RPMI همراه با  $/\text{well}$   $2\times 10^5$  از مونوцит‌های اتلولوگ که با میتومایسین غیرفعال شده بودند، در حجم نهایی  $2\text{ ml}$  به صورت سه‌تایی در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. مقدار  $10\text{ }\mu\text{g/ml SLA}$  همراه با کنترل مثبت Phytohemagglutinin (PHA) سلول‌ها به کار گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد در حضور  $5\% \text{ CO}_2$  نگهداری شدند.

### سنجهش تکثیر سلولی لنفوسيت‌های خاطره‌ای با روش رنگ‌آمیزی Carboxy Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE)

به منظور بررسی پرولیفراسیون، لنفوسيت‌ها با رنگ فلورسان CFSE به میزان  $5\text{ }\mu\text{M}$  در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو، سلول‌ها به مدت ۵ روز در حضور آنتیژن کشت داده شدند. سپس از سلول‌ها با فلوسايتومتر قرائت شدند. بررسی میزان تکثیر سلولی با استفاده از نرمافزار Modfit LT آنالیز شد.<sup>۲۷</sup> 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، لنفوسيت‌ها به مدت ۵ ساعت در حضور Pohrbol Mirystic Acetate (PMA)

برای تهیه SLA، پس از شستشوی پروماستیگوت‌های فاز ایستا با PBS، به مقدار  $1\times 10^9$  انگل در میلی‌لیتر آنزیم آنتی‌پروتئاز افزوده شد و مدت کوتاهی در  $4^\circ\text{C}$  درجه نگهداری شد. سپس با روش Sonication انگلها خرد شد و سوسپانسیون حاصله ابتدا در دور  $30/000\text{ }\times\text{g}$  به مدت ۲۰ دقیقه و سپس در دور  $100/000\text{ }\times\text{g}$  به مدت ۴ ساعت سانتریفیوژ شدند. محلول رویی فیلتر شده و تا زمان استفاده در  $70^\circ\text{C}$  درجه نگهداری گردید.<sup>۲۷</sup>

### فوتاپینگ با روش فلوسايتومتری

به منظور بررسی فراوانی سلول‌های خاطره‌ای، بخشی از سلول‌های تک‌هسته‌ای با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد شاخص‌های CD62L، CD45RA و CCR7 کونژوگه شده با FITC-, PE-, PE-Cy-5 با روش فلوسايتومتری بررسی شدند. از کنترل‌های ایزوتاپ به منظور تعیین حدود فلورسان مثبت استفاده شد. در این روش سلول‌ها با PBS شستشو و با آنتی‌بادی‌های یاد شده رنگ‌آمیزی شدند. پس از انکوباسیون در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه، سلول‌ها با بافر یا محیط کشت  $1640\text{ RPMI}$  به تعداد معینی در حجم  $2\text{ ml}$  لیتر سوسپانسیون شد و توسط دستگاه قرائت شد.

### جداسازی لنفوسيت‌های خاطره‌ای با روش

#### Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

به منظور بررسی عملکرد، رده‌های مختلف لنفوسيت‌ها با استفاده از سوسپانسیون PBMC تفکیک شدند. برای جداسازی لنفوسيت‌های 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 به کارش شدند.

### یافته‌ها

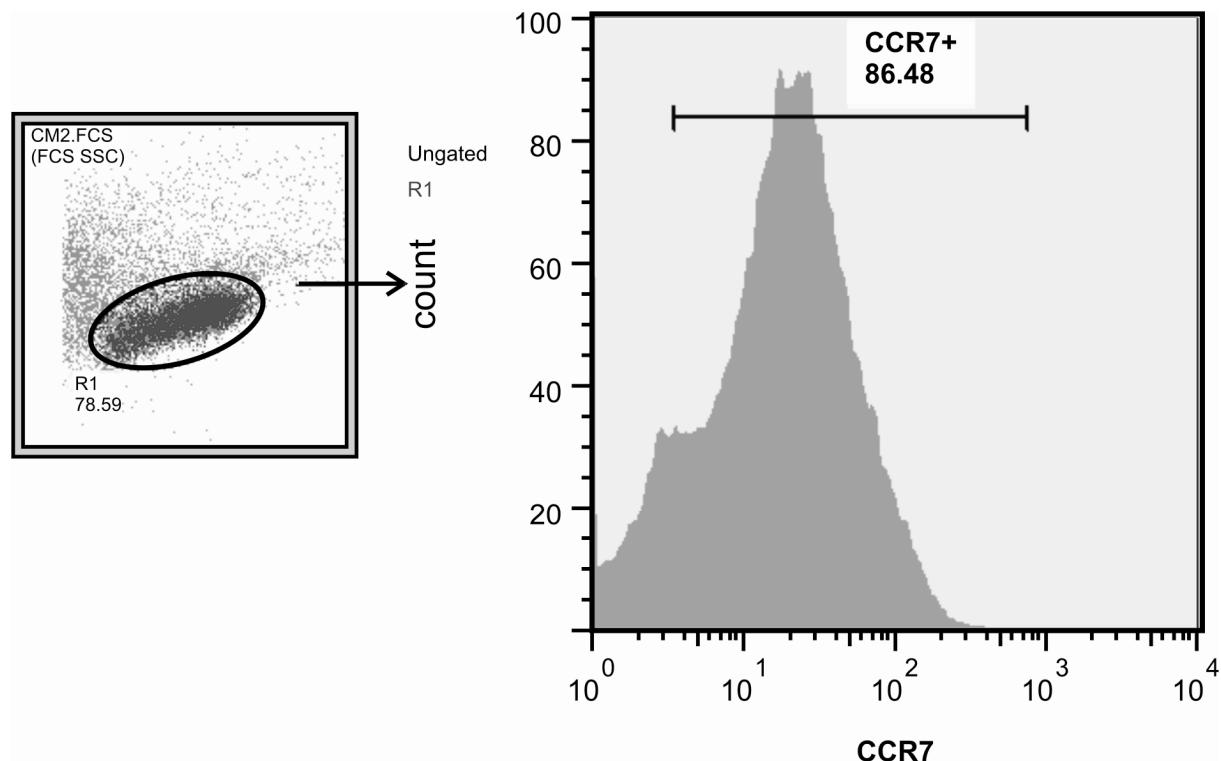
#### فنتایپینگ لنفوسيت‌های خاطره‌ای با روش فلوسايتومتری

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

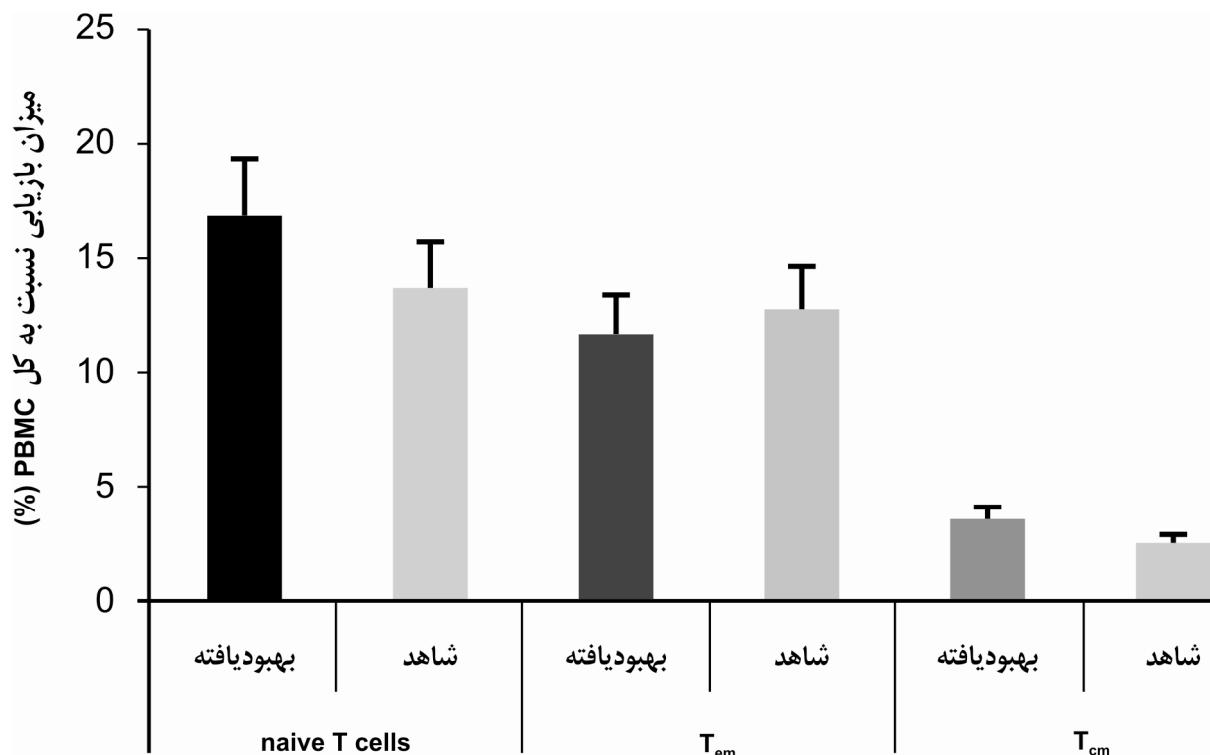
يونومایسین (ionomycin) در محیط کشت تحریک شدند. موننزین سدیم (sodium monensin) به منظور بلوک کردن ترشح سلولی در ۴ ساعت آخر کشت اضافه شد و سپس غشاء سلول‌ها با بافر ساپونین نفوذپذیر گردید. آنتی‌بادی کونژوگه ضد- $\gamma$  IFN- $\gamma$  و IL-2 به سلول‌ها اضافه شد و پس از انکوباسیون سلول‌ها با دستگاه فلوسايتومتری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

#### بررسی سایتوکاین‌ها به روش الایزا

روش الایزا ساندویچ 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 موردنظر 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: لنفوسيت‌های خاطره‌ای مرکزی ( $T_{cm}$ ) پس از تفکیک مارکر سطحی CCR7 را بیان می‌کنند



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

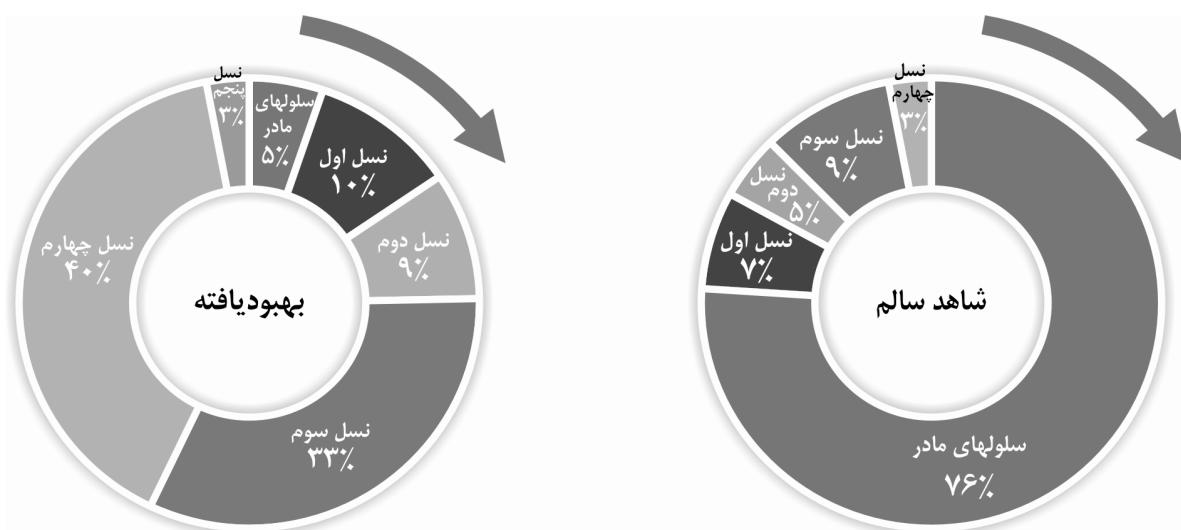
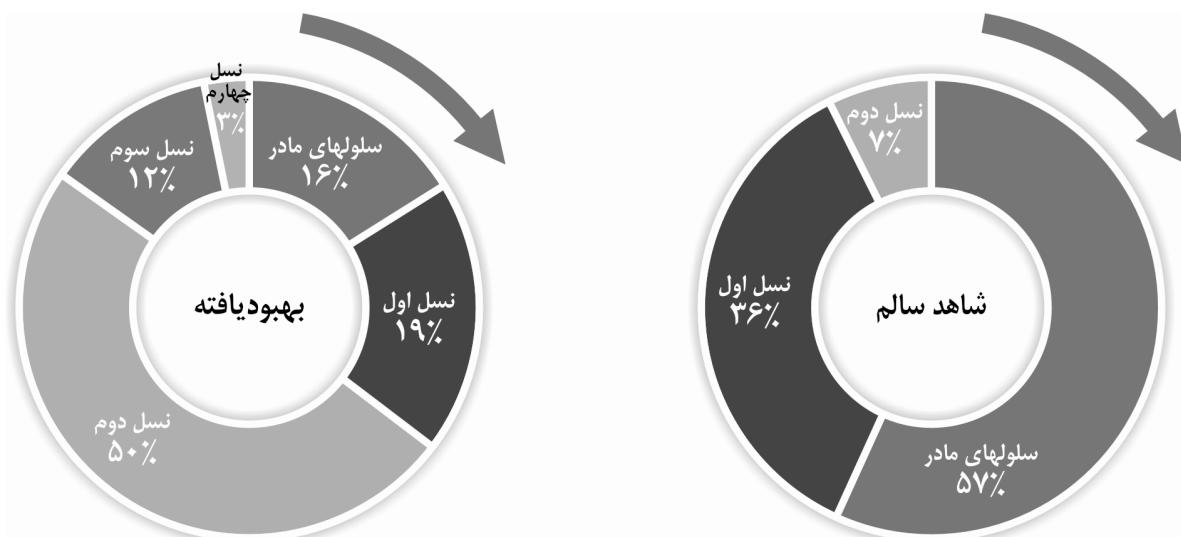
در آنالیز لنفوسيت‌های  $T_{cm}$  در نسل سوم و چهارم تکثیر شده از سلول مادر، درصد سلول‌ها در گروه بهبودیافته بیش از گروه شاهد بود ( $P<0.05$ ). همچنین در آنالیز لنفوسيت‌های  $T_{em}$  در نسل دوم از تکثیر، درصد سلول‌ها در گروه بهبودیافته بیش از گروه شاهد بود ( $P<0.05$ ).

**سنحش سایتوکاین‌ها در کشت رده‌های لنفوسيتی**  
میزان متوسط ترشح اينترفرون 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  $T_{cm}$  و سلول‌های native T اختلاف معنی‌داری بین گروه بهبودیافته و شاهد مشاهده نشد.

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

#### تکثیر لنفوسيت‌های خاطره‌ای پس از تحریک با آنتیژن

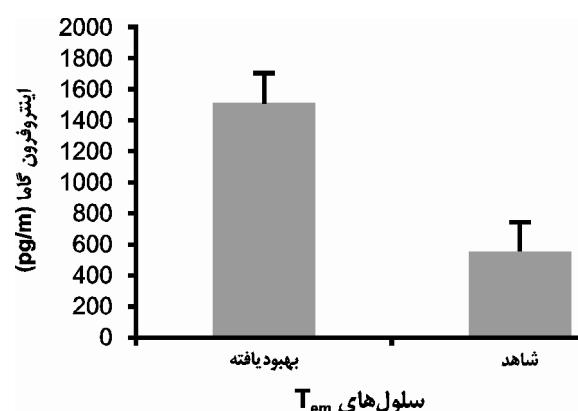
سنحش تکثیر سلولی لنفوسيت‌های خاطره‌ای با اندازه‌گیری شدت رنگ CFSE انجام شده و به شکل درصد سلول‌های مختلف در هر نسل تکثیر شده از سلول‌های مادر نشان داده شده است (اشکال ۳ و ۴). در لنفوسيت‌های CD4+ native T اختلاف معنی‌داری بین گروه بهبودیافته و گروه شاهد در درصد سلول‌های نسل‌های مختلف تکثیر شده مشاهده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

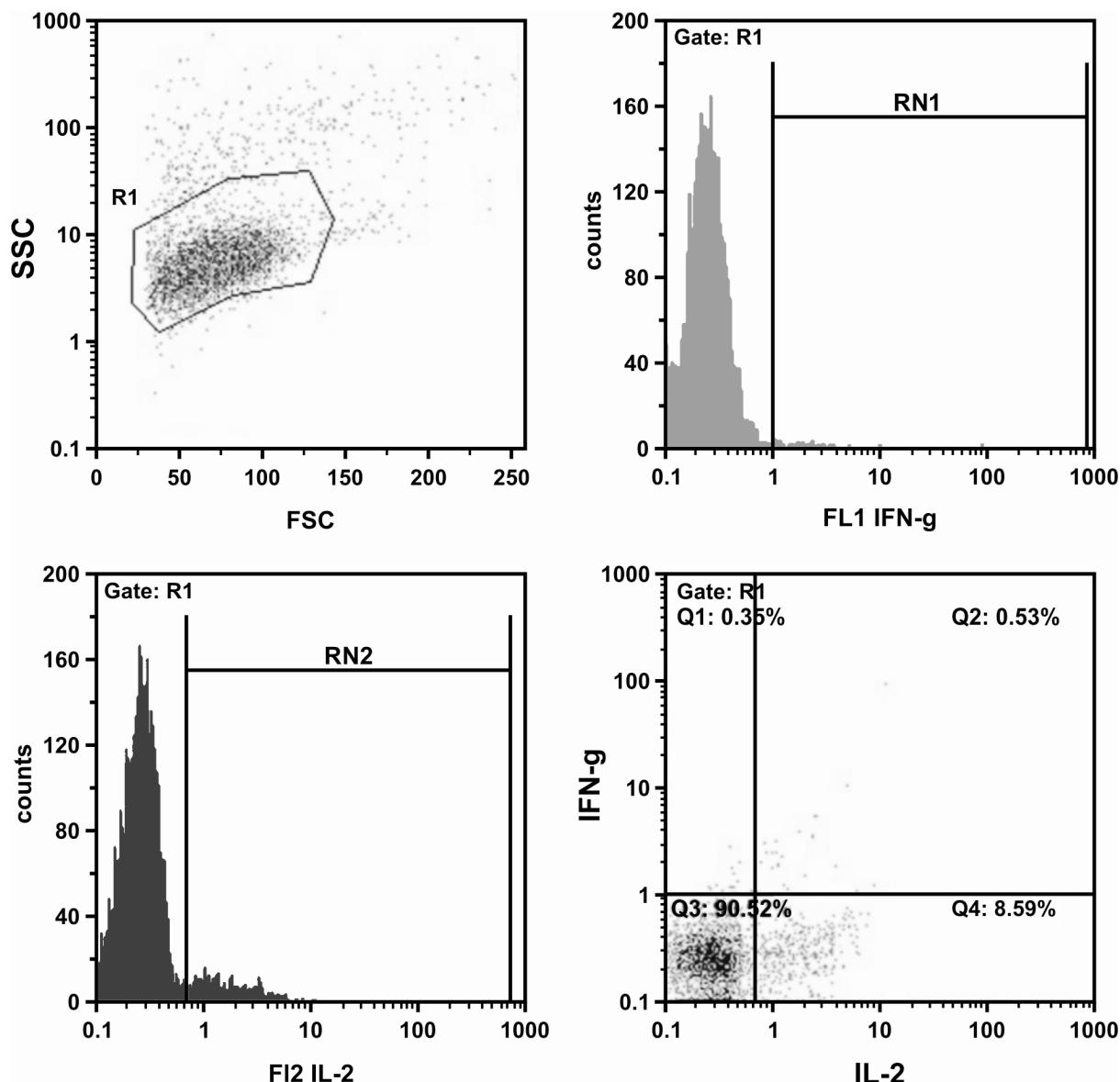
شکل ۳: روند تکثیر لنفوسيت‌های  $T_{em}$  پس از کشت در حضور آنتی‌ژن ليشمانياشکل ۴: روند تکثیر لنفوسيت‌های  $T_{em}$  پس از کشت در حضور آنتی‌ژن ليشمانيا

در اندازه‌گیری میزان سایتوکاين IL-10 و IL-13 در کشت سلولی لنفوسيت‌های 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-10 و IL-13 نشان نداد.

#### رنگ‌آمیزی داخل سلولی برای سایتوکاين‌ها

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

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



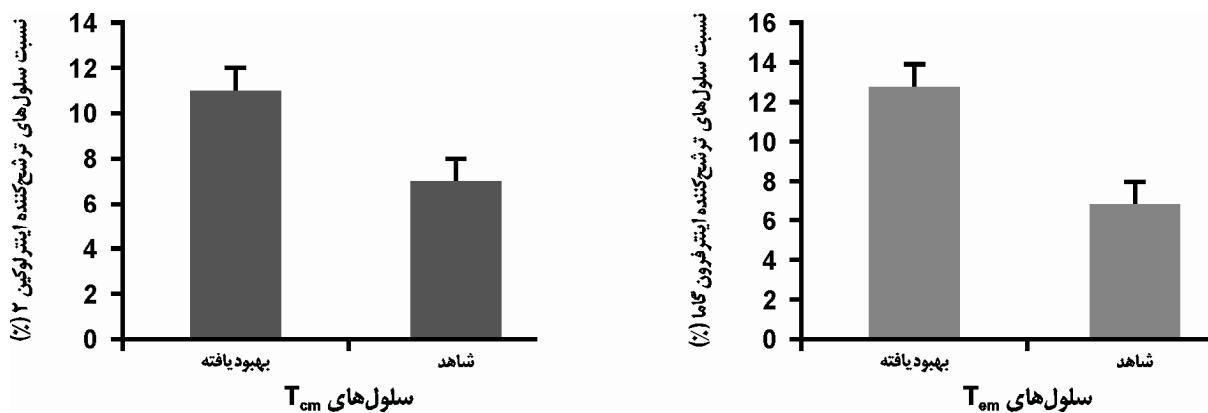
شکل ۶: نمونه‌ای از پلات فلوسایتومتری نشان‌دهنده فراوانی لنفوسيت‌های  $T_{cm}$  و  $\gamma$ -IFN دارای سلولی را ترشح می‌کند.

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

### بحث

تاکنون خاطره ایمونولوژیک و لنفوسيت‌های T خاطره‌ای CD4+/CD8+ در عفونت‌های مختلف در مدل موشی<sup>۲۸-۳۱</sup> و انسان<sup>۲۱،۳۲-۳۵</sup> بررسی شده است. از سال‌ها پیش، ناهمگون‌بودن لنفوسيت‌های T خاطره‌ای در مطالعات مختلف گزارش شده بود<sup>۳۶-۳۹</sup>. در یکی از

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



شکل ۷: فراوانی لنفوسيت‌های  $T_{cm}$  ترشح‌کننده IL-2 و لنفوسيت‌های  $T_{cm}$  ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  نسبت به کل رده سلولی مربوطه

ساير زيرگروهها بهدست آمد. ميزان پايين اين رده سلولی در برخی مطالعات نشان داده شده است که در عين حال با برخی از گزارش‌های ديگر در انسان همخوانی ندارد.<sup>۳۲</sup>

ممکن است پايين بودن فراوانی  $T_{cm}$  در اين بررسی به علت حساس بودن گيرنده کموکايني CCR7 و نيز CD62L به شرایط فيزيکي و ريزش آن از سطح سلول در حين ردیابي باشد.<sup>۳۲</sup> گزارش‌های ديگري وجود دارد که  $T_{cm}$  در لنفوسيت‌های گروه  $CD4^+$  و  $T_{cm}$  در گروه  $CD8^+$  نسبت بالايی دارند.<sup>۴۱-۴۵</sup> در اين مطالعه الگوي فنوتيبی رده‌های مختلف لنفوسيت‌های خاطره‌ای در گروه بهبود‌یافته با گروه شاهد تفاوتی نداشته است.

با توجه به تماس مداوم افراد با آنتىژن‌های محيطی در طول زندگی، نگهداری حجم زيادي از سلول‌های خاطره‌ای برای هر کدام از آنتىژن‌ها برای موجود زنده مقرن به صرفه و منطقی به نظر نمی‌رسد.<sup>۴۳</sup> در عين حال، فنوتيب لنفوسيت‌های خون محيطی از جمله لنفوسيت‌های خاطره‌ای (بدون تفكیك رده‌های مختلف) در بيماري ليشمانيوز احشائي ناشي از ليشمانيا دونووانی بررسی و نشان داده شده است که لنفوسيت‌های  $T$  خاطره‌ای در بيماران در مرحله فعالیت بيماري کاهش معنی‌داری در مقایسه با افراد بهبود‌یافته یا بدون علامت نشان می‌دهند.<sup>۴۴</sup>

آخرین دسته‌بندی‌ها، دو گروه مجزا از اين لنفوسيت‌ها براساس بيان گيرنده‌های لانه‌گزینی گزارش شده است: لنفوسيت‌های  $T$  خاطره‌ای کارگزار و لنفوسيت‌های  $T$  خاطره‌ای مرکزي.<sup>۱۴</sup>

پيش از اين در مطالعه‌اي بر روی موش وجود اين دو گروه از لنفوسيت‌ها در عفونت با ليشمانيا ماژور نشان داده شده است.<sup>۲۵</sup> در عين حال، مطالعه جامع ديگري در لنفوسيت‌های خاطره‌ای در ليشمانيا ي sis در انسان گزارش نشده است.<sup>۲۶</sup>

در اين مطالعه از شاخص‌های سطحي CCR7، CD45RA و CD62L برای فنوتايپينگ رده‌های مختلف لنفوسيت‌های خاطره‌ای استفاده شد. اين شاخص‌ها عمدتاً به عنوان گيرنده‌های لانه‌گزینی عمل می‌کنند و لنفوسيت‌ها را قادر می‌سازند تا در اعضاء لنفي ثانويه يا محل عفونت مستقر شوند.<sup>۴۰</sup>

در ابتداء فراوانی اين رده‌ها در خون محيطی داوتطلبان موردارزیابی و مقایسه قرار گرفت. فراوان ترين رده سلولی در گرديش در هر دو گروه بيمار بهبود‌یافته و شاهد سالم، لنفوسيت‌های  $T$  بكر بودند. پيش از اين هم در مطالعات ديگر در انسان گزارش شده که لنفوسيت‌های  $T$  بكر که اختصاصي آنتىژن نیستند، فراوان ترين رده لنفوسيتی را در خون محيطی تشکيل می‌دهند.<sup>۴۱-۴۳</sup> در اين مطالعه نسبت  $T_{cm}$  كمتر از

از الیزا را در خصوص ترشح اینترفرون گاما از  $T_{cm}$  در گروه بهبودیافته تأیید کرد. با توجه به تجمع و بازخوانی لنفوسيت‌های کارگزار به محل عفونت، ترشحات اين سلول‌ها شامل سایتوکاين‌های گروه Th1 نظير اینترفرون گاما و گروه Th2 نظير اینترلوکين<sup>۴</sup> می‌شود که به عنوان مکانیسم عملکرد اين سلول‌ها در مقابل عفونت نوعی ابزار ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به اينکه افراد مورد مطالعه بهبودیافته از سالک هستند، برتری سایتوکاين‌های گروه Th1 توسط سلول‌های کارگزار موردن تظاهر بود. كما اين که مطالعات قبلی بر روی کشت PBMC نشان‌دهنده افزایش ترشح اینترفرون گاما در بیماران بهبودیافته از سالک است.<sup>۴۷-۵۰</sup>

از طرفی لنفوسيت‌های  $T_{cm}$  که اينترلوکين ۲ ترشح می‌کنند، در گروه بهبودیافته بيش از گروه شاهد بود. قبل‌نشان داده شده است که ترشح اصلی رده  $T_{cm}$  اينترلوکين ۲ است.<sup>۱۴</sup> اين سایتوکاين اثر اتوکرین بر روی سلول‌های مترشحه دارد و بدین طریق باعث ابتدا و تزايد جمعیت سلولی تحت تأثیر می‌شود و نقش اين سایتوکاين در ابتداي لنفوسيت‌های T شناخته شده است.<sup>۱۲</sup>

مطالعه حاضر بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) انجام شده است که تنها منبع لنفوسيت‌های T برای مطالعه ايمني در افراد بهبودیافته از سالک به حساب می‌آيد. ممکن است اين نتایج بازتاب‌دهنده واقعی وضعیت فنوتیپ لنفوسيت‌های ارتراح یافته در اطراف زخم نباشد و شواهدی وجود دارد که اين ایده را محتمل می‌کند. مطالعه لنفوسيت‌های T در خون محیطی در بیماران دچار آذوکارسینوما نشان داده است که بين بیماران و شاهد سالم از نظر فنوتیپ رده‌های مختلف لنفوسيت‌های خاطره‌ای، کارگزار و بکر  $CD8^+$  اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما در مایع پلور بیماران نسبت بالايی از لنفوسيت‌های خاطره‌ای مشاهده شد.<sup>۵۱</sup>

وجود اختلاف معنی‌داری در تعداد لنفوسيت‌های خاطره‌ای در خون محیطی در بیماری مالاریا نیز گزارش شده است. در يك بررسی، افزایش معنی‌دار لنفوسيت‌های T  $CD4^+$  خاطره‌ای در عفونت حاد با پلاسمودیوم ویواکس در مقایسه با افراد سالم گزارش شده است.<sup>۳۳</sup>

در گام بعدی به منظور بررسی عملکرد سلول‌ها به طور مجزا، رده‌های لنفوسيتی با روش MACS تفکیک شدند و در حضور آنتی‌ژن کشت داده شدند. ارزیابی‌ها نشان دادند که بين سلول‌های گروه بهبودیافته با گروه شاهد از نظر میزان تکثیر سلولی، میزان ترشح سایتوکاين‌ها و تعداد لنفوسيت‌های ترشح‌کننده سایتوکاين داخل سلولی اختلافات معنی‌داری وجود دارد.

در اين بررسی مشخص شد اگر چه هر دو رده  $T_{cm}$  و  $T_{em}$  حاصل از داوطلبان بهبودیافته در پاسخ به آنتی‌ژن تکثیر می‌يانند اما میزان تکثیر  $T_{cm}$  به طور معنی‌داری بالاتر از رده‌های ديگر است؛ اين مشاهده مطابق گزارش‌های قبلی در مورد ويژگی‌های  $T_{cm}$  است.<sup>۱۴-۴۵</sup>

لنفوسيت‌های  $T_{cm}$  به عنوان جمعیت پشتیبان در زمان عفونت مجدد با آنتی‌ژن قابلیت تبدیل به لنفوسيت‌های کارگزار را دارند.<sup>۴۶</sup> بررسی با فلووسيتومتری در اين مطالعه نیز نشان داد که فنوتیپ  $T_{cm}$  پس از تحريك با آنتی‌ژن به  $T_{em}$  تبدیل می‌شود. توان بالاي  $T_{cm}$  در تکثیر، باعث ابتداي جمعیت اين سلول‌ها در خون محیطی و مراکز لنفي ثانويه می‌شود که اين مسئله با توجه به پتانسیل تبدیل منظم اين جمعیت به سلول‌های  $T_{cm}$  در موقع عفونت مجدد ليشمانيا، ازنظر تئوريک حائز اهميت است.

میزان انترفرون گاما در کشت سلول‌های  $T_{cm}$  در پاسخ به آنتی‌ژن انگل در گروه بهبودیافته به طور معنی‌داری بيش از گروه شاهد سالم به دست آمد. بررسی بيشتر با رنگ‌آمیزی داخل سلولی نتایج حاصل

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

در مطالعه‌ای بر روی موش، نشان داده شده است که جمعیت‌های متمايزی از لنفوسيت‌های خاطره‌ای  $CD4^+$  از نظر فنتوپ و عملکرد در بافت‌های لنفی و غیر لنفی وجود دارند.<sup>۵۲</sup>

در این مطالعه سلول‌های  $T_{em}$  اختصاصی لیشمانیا ترشح‌کننده اینترفرون گاما و سلول‌های  $T_{cm}$  اختصاصی لیشمانیا ترشح‌کننده اینترلوکین ۲ در بیماران بهبود یافته از سالک تشخیص داده شدند. این دو فنتوپ به عنوان رده‌های اصلی لنفوسيت‌های

## References

- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:239-243.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:581-96.
- Hadighi R, Mohebali 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.
- Wolday D, Berhe N, Akuffo H, et al. Emerging *Leishmania/HIV* co-infection in Africa. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190:65-67.
- Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, et al. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 2006; 123:423-38.
- Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, et al. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* 2008; 26:6759-67.
- 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.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:845-58.
- Locksley RM, Heinzel 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.
- Locksley RM, Heinzel FP, Holaday BJ, et al. Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine *Leishmania major* infection. *Res Immunol* 1991; 142:28-32.
- Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Ann Rev Immunol* 2002; 551-79.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:251-62.
- Farber DL. T cell memory: heterogeneity and mechanisms. *Clin Immunol* 2000; 95:173-81.
- 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.
- 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 Immun* 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. Jangpatrapongsa 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, PhD<sup>1</sup>  
Mahmoud Nateghi Rostami, PhD<sup>2,3</sup>  
Hossein Keshavarz, PhD<sup>2</sup>  
Akram Miramin Mohammadi, Sc<sup>1</sup>  
Minoo Tasbihi, MSc<sup>1</sup>  
Tahereh Shahrestani, MSc<sup>4</sup>  
Abdolfattah Sarrafnejad, MD,  
PhD<sup>4</sup>

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

**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- $\gamma$  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 stimulated 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

## Corresponding author

Hossein Keshavarz, PhD

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