

The Impacts of Cytokine IL22 on the Ulcer Originated from L- Major in BALB/c Mice

Hajar Ziaei Hezarjaribi¹,
Fatemeh Ghaffarifar²,
Abdolhossein Dalimi Asl²,
Zohreh Sharifi³

¹ PhD Student in Parasitology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

(Received January 17, 2011 ; Accepted February 28, 2012)

Abstract

Background and purpose: IL22 is the family member of IL10 created by Th17, Th22, NK cells and its role has been recently demonstrated in protection and innate defense mechanisms, control of bacterial and viral infection, homeostasis and tissue repair. This research investigated the impacts of IL22 treatment on lesion originated from L-major in BALB/c mice.

Materials and methods: Twenty four Iranian female BALB/c mice, 8 weeks old were challenged by 2×10^6 Promastigotes of L-Major MRHO/IR/75/ER by the dose of 100 microliters in stationary phase. They were infected percutaneously and then were divided into three groups each with eight recombinant mice IL-22 that received two different doses of 5ng/mg and 10ng/mg IM. Immune evaluation of cellular and humoral immunity was done by assessing IL-4 Cytokine, IFN- γ and culturing of spleen lymphocyte cells. Also, investigation of IgG2a, IgG total was carried out by Elisa method and MTT colorimetric assay. Furthermore, clinical investigations including measuring wound healing, life span of mice and recording of mortality rate was done.

Results: The results indicates that the growth of wound reduced in the group treated with IL22 and the most impact was seen in the group under treatment with IL22 (5ng). IL22 (5ng) increased the production of IFN- γ but decreased the production of IL4. Findings from LSD test showed that the rate of IFN- γ and IGg total in the group treated with IL22-5ng was significantly different from other groups. There was no significant difference between IL22-5ng and IL22-10ng regarding the rate of IL4 and the rate of IgG2a. Furthermore, MTT in the group treated with IL22-5ng was significantly different from other groups.

Conclusion: IL22-5ng leads to Cytokine Th1 response through increasing the production of IFN- γ and decreasing the production of IL4, which result in protective response against L-major. Hence, it may have effective impacts in treatment if used with a combined anti leishmania drug.

Key words: *Leishmania major*, IL22, BALB/c mice

بررسی اثر درمانی سایتوکین IL22 بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

هاجر ضیایی هزار جریبی^۱

فاطمه غفاری فر^۲

عبدالحسین دلیمی اصل^۲

زهره شریفی^۳

چکیده

سابقه و هدف: IL22 یک سایتوکین عضو خانواده IL10 است که به وسیله سلول‌های NK و Th ۲۲ و Th ۱۷ ایجاد می‌شود و اخیراً نقش IL22 در ایجاد حفاظت و مکانیسم دفاع ذاتی، در کنترل عفونت‌های باکتریال، ویرال، هموستازی و ترمیم بافت ثابت شده است. لذا در این تحقیق اثر درمانی IL22 بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c بررسی شد.

مواد و روش‌ها: ۲۴ سرموش BALB/c ماده ۸ هفته را با تعداد حداقل ۲×۱۰۶ پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور L.major سویه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از طریق تلقیح زیرجلدی چالش نموده به سه گروه ۸ تایی موش‌ها IL22 نوترکیب موشی را در دو دوز مختلف ۵ ng/ml و ۱۰ ng/ml به صورت IM تزریق نمودیم. بررسی ایمنی سلولار و همومورال با سنجش سایتوکین‌های IL-4 و گاما اینترفرون و کشت سلول‌های لنفوسیت طحال و بررسی IgG2a، IgG Total با روش الایزا و انجام روش رنگ سنجی MTT و بررسی‌های بالینی با اندازه‌گیری روند زخم، و طول عمر موش‌ها و ثبت مرگ و میر انجام شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان می‌دهد که رشد زخم به صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL22 کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL22 (۵ ng) بوده است. IL22-۵ ng سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید اینترلوکین ۴ شده است. نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که میزان گاما اینترفرون و IgG total گروه تحت درمان با IL22-۵ ng با IL22-۵ ng نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL4 گروه تحت درمان با IL22-۵ ng با IL22-۵ ng $p < 0/05$ نسبت به IL22-۱۰ ng معنی‌دار نیست ولی با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IgG2a گروه تحت درمان با IL22-۵ ng با IL22-۱۰ ng $p < 0/05$ نسبت به IL22-۱۰ ng معنی‌دار نیست ولی با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار است. MTT در گروه دریافت‌کننده IL22-۵ ng با IL22-۱۰ ng $p < 0/05$ نسبت به سایر گروه‌های تحت درمان معنی‌دار است.

استنتاج: نتایج نشان می‌دهد که چون IL ۲۲-۵ ng با افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید اینترلوکین ۴ سبب ایجاد پاسخ‌های سایتوکین Th1 شده، سبب ایجاد پاسخ حفاظتی در مقابل انگل لیشمانیا می‌شود لذا اگر با داروهای ضدلیشمانیا توأماً تجویز شود شاید اثرات بهتری را در درمان بر علیه لیشمانیا فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین ۲۲، لیشمانیا ماژور، موش BALB/c

مقدمه

لیشمانیازیس بیماری ناشی از انگل داخل سلولی است که توسط گونه‌های مختلف لیشمانیا ایجاد می‌شود. ماهیت بالینی آن از زخم پوستی تا فرم سیستمیک کشنده است. اگرچه جزء بیماری‌های فراموش شده است ولی

E-mail: ghafarif@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: فاطمه غفاری فر - تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

۱. دانشجوی دکتری انگل شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

۲. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳. مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱۱/۱۹ تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۹

دومین عامل مرگ و میر و چهارمین عامل شیوع بیماری‌های عفونی در مناطق گرمسیری است (۲،۱). لیشمانیوز جلدی عمده‌ترین شکل بیماری لیشمانیازیس است که توسط حداقل ۱۲ گونه آن ایجاد می‌شود.

بیماری لیشمانیازیس در ۸۸ کشور اندمیک می‌باشد حدود ۱۵ میلیون نفر به آن مبتلا بوده ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر آلودگی هستند و تعداد موارد جدید سالانه حدود ۲ میلیون نفر می‌باشد، که ۱/۵ میلیون نفر مربوط به لیشمانیازیس جلدی و ۰/۵ میلیون نفر مربوط به لیشمانیازیس احشایی هستند. به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی بعد از مالاریا، لیشمانیازیس را در اولویت قراردادده است (۳). گرچه لیشمانیوز جلدی در بیش از ۸۰ کشور جهان گزارش شده ۹۰ درصد موارد آن در ۶ کشور جهان افغانستان، ایران، برزیل، پرو، عربستان و سوریه قرار گرفته است (۴،۲).

تغییر روند بیماری سالک در سال‌های اخیر، نمایان‌گر افزایش موارد بیماری می‌باشد. لیشمانیوز پوستی گرچه از لحاظ مرگ و میر مشکل زیادی به وجود نمی‌آورد ولی به دلیل طولانی بودن دوره زخم و هزینه‌های سنگین درمانی، وجود جوشگاه زخم، احتمال ایجاد عفونت‌های ثانویه و یا ایجاد عوارض و گاهی بدخیمی‌هایی در محل اسکار و عوارض ناشی از درمان با داروهای موجود مشکلات مختلفی را ایجاد می‌کند. هدف از درمان بیماری بهبود سریع زخم عدم ایجاد جوشگاه و جلوگیری از عفونت ثانویه است (۵،۶). استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان که از سال ۱۹۱۱ جهت درمان اشکال مختلف بالینی لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته است دارای عوارض جانبی متعدد می‌باشد و نیز در روش استفاده تزریقی از آن به دلیل دردناک بودن و طولانی بودن مدت استفاده، که موجب تزریقات مکرر دارو می‌شود سبب شده تا از روش‌های درمانی جایگزین استفاده شود (۷،۸).

IL۲۲ یک سایتوکین عضو خانواده IL۱۰ است و اعضای این خانواده سایتوکینی شامل IL۱۰، IL۱۹،

IL۲۰، (IL۲۴) MDA۷، IL(TIF) و IL۲۲ و IL۲۶ می‌باشد چنان‌که می‌دانیم IL۱۰ به‌عنوان سردسته این خانواده سایتوکین، یک مهارکننده مؤثر ایمنی سلولی و تقویت‌کننده قوی ایمنی هومورال است (۹). گرچه اعضای این خانواده مشترکات ساختمانی بسیار زیادی دارند ولی از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمونولوژیک تفاوت‌های فاحشی بین آن‌ها وجود دارد. لوکوس ژنی رسپتورهای این خانواده سایتوکینی نیز بر روی کروموزوم‌های مختلفی واقع شده‌اند و مشخص شده که پدیده پلئوتروپیسم (تأثیر چند سایتوکین بر روی رسپتور) و هم پوشانی Redundancy (تأثیر یک سایتوکین روی چند رسپتور) در مورد رسپتورهای این خانواده وجود دارد. این سایتوکین دارای خاصیت پلئوتروپیک هم در داخل سیستم ایمنی و هم در خارج آن می‌باشد. رسپتور هترودایمر IL۲۲ شامل گیرنده (۴-۲ CRF) IL۱۰ و زنجیره IL۲۲-R، IL۲۲ و IL۱۰ R۲ و IL۱۰ R۳ (۹-۲ CRF) است که علی‌رغم داشتن این رسپتور مشترک پاسخ IL۲۲ مستقل از IL۱۰ است (۱۲-۹). IL۲۲ که به آن IL-TIF، [IL۱۰ related Tcell-derived inducible factor] نیز گفته می‌شود توسط Th۱۷ خصوصاً NK Cells، Th۲۲، (CCR۰+) و TCells (Th۱) به محض فعال شدن به IL۴ و همچنین به وسیله ماست سل‌های تیموس و مغز پس از فعال شدن با ConA ترشح می‌شود و از محدود سایتوکین‌هایی است که وجودش حتی در غیر از پستانداران نظیر ماهی‌ها به اثبات رسیده است (۱۱،۱۳). CRF ۲-۴ بین IL۲۲ و IL۱۰ مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است؛ در حالی که CRF ۲-۹ مختص IL۲۲ است و دارای هومولوژی با دومین زنجیره گیرنده IL۱۰ است. وجود CRF ۲-۹ و CRF ۲-۴ یعنی دو زنجیره گیرنده این سایتوکین در سیگنالینگ مؤثر است و در مسیر سیگنالینگ این سایتوکین STAT شامل STAT۱ و STAT۳ و STAT۵ فعال شده متعاقب آن تولید پروتئین‌های فاز حاد از کبد افزایش می‌یابد و نقش این سایتوکین را به‌عنوان یک سایتوکین التهابی تثبیت می‌کند.

مواد و روش ها

آماده سازی و تزریقی سائتوکین IL ۲۲

IL۲۲ موشی از شرکت R&D با Cat.number 582-L براساس دستور برنامه در PBS استریل به صورت ۰/۱ درصد در BSA آماده شد. آماده سازی موش ها به تعداد ۲۴ سر موش سفید کوچک ماده خالص BALB/c inbred به دلیل حساس بودن به پروماستیگوت های لیثمانیا ماژور در سن ۸ هفتهگی از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج به عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی در این تحقیق انتخاب و خریداری و تحت شرایط استاندارد از لحاظ آب و غذا نگهداری شدند. گروه بندی موش ها بر اساس نوع ماده تزریقی انجام شد. روش آلوده سازی موش های BALB/c با انگل لیثمانیا ماژور صورت گرفت که کل موش ها با تعداد حداقل 2×10^6 پروماستیگوت انگل لیثمانیا ماژور L.major سوبه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا (stationary) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از طریق تلقیح زیرجلدی در قاعده دم چالش شده که بعد از ۳-۴ هفته بعد از تزریق در لمس ناحیه تزریق برجستگی و ندول احساس می شد و سپس زخم حاصل از رشد انگل در قاعده دم موش تشکیل شد. قبل از شروع درمان از تمامی زخم ها نمونه برداری شد و بعد از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۲۴ موش به سه گروه ۸ تایی، یک گروه ۸ تایی دریافت کننده PBS به عنوان گروه کنترل (۱۰۰ میکرو لیتر و ۱۶ موش دیگر در دو گروه ۸ تایی IL۲۲ را در دو دوز مختلف ۵ng/ml و ۱۰ng/ml به صورت داخل عضلانی و تک دوز در عضله چهار سر ران quadriceps در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سورنگ انسولین با سرسوزن ۳۰ gauge دریافت نمودند. تعداد ۴ موش در هر گروه برای بررسی ایمنی هومورال و سلولار و تعداد ۴ موش دیگر در هر گروه برای بررسی طول عمر و بررسی قطر زخم و وضعیت مرگ و میر آن ها چالش می شوند (۲۲).

IL۲۲ باعث فعال سازی JAK^۱، TYK^۲، STAT^۱،

STAT^۳ و STAT^۵ و مسیر MAP کیناز می شود.

امروزه ثابت شده که سلول های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سائتوکین هستند (۱۶-۱۱). IL۲۲ هم نقش مضر و هم نقش محافظتی دارد و اثر زیان آور آن در القاء هیپرپلازی اپی تلیال پوست در بیماری پسوریازیس انسانی است و یا IL۲۲ همراه با IL۱۷ سیتوکین های پیش التهابی را در سلول های برونشیل اپی تلیال و میوفیبروبلاست های کولون تحریک می کند و سبب ایجاد آلرژی و کویت می شود (۱۷، ۱۸). از طرفی اثر محافظتی IL۲۲ در باکتری گرم منفی عامل بیماری پنومونی که IL۲۲ ترشح عامل ضد میکروبی را در سلول های اپی تلیال ریوی افزایش می دهد (۱۸). IL۲۲ به تنهایی و بدون IL۱۷ در کبد مبتلا به هپاتیت با پیشگیری از آپتوزیس، هپاتوسیت ها را محافظت می کند (۱۹). در پوست IL۲۲ سبب القای پتیده های ضد میکروبی می شود و تکثیر کراتینوسیت ها را افزایش و تمایز آن ها را مهار می کند و نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد (۱۶). نقش IL۲۲ در اختلالات پوستی نظیر AE (Atopic eczema) درماتیت Allergic contact dermatitis (ACD) حساسیتی تماسی ناشناخته است (۱۶). IL۲۲ تولید شده به وسیله سلول های NK رشد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را با فعال کردن ماکروفاژها و افزایش فعالیت فاگولیزوم مهار می کند (۲۰). IL۲۲ یک اثر حفاظتی در بیماری کالازار انسانی دارد و لیثمانیا دونوانی تمایز سلول های Th۱۷، IL۲۲ و گاما اینترفرون را تحریک می کند (۲۱).

با توجه به این که هنوز عواملی که صد در صد در جهت بهبودی و در روند مشکلات ریشه کنی انگل و مشکلات مربوط به کنترل ناقلین بند پا باشد تعریف نشده است و اخیراً نیز نقش IL۲۲ در ایجاد حفاظت و مکانیسم دفاعی ذاتی خصوصاً اجرام داخل سلولی ثابت شده لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر درمانی IL۲۲ بر زخم ناشی از لیثمانیا ماژور در موش BALB/c می باشد.

بررسی ایمنی سلولار و هومورال

بررسی ایمنی سلولار و هومورال با سنجش سایتو کین های IL4 و گاما اینترفرون و بررسی TgG Total، IgG2a و MTT و بررسی های بالینی با اندازه گیری قطر زخم و ثبت مرگ و میر به طور هفتگی بررسی شدند. برای بررسی ایمنی هومورال ۷ هفته بعد از چالش با انگل به کمک لوله های موئنه از گوشه، چشم موش ها خونگیری انجام شد. سرم جدا شد. سپس سرم خون موش ها برای بررسی ایمنی هومورال جمع آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سرم های گرفته شده از موش های کنترل و موش های دریافت کننده IL22 با آزمایش الایزای مراحل مختلف زیر به انجام پذیرفت. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از آنتی ژن با غلظت های ۲۰ میکرو گرم در میلی لیتر بافر کربنات-بی کربنات ۰/۱ مولار به همه چاهک ها بجز چاهک های کنترل بلانک در پلیت های الایزا ریخته شد. به مدت یک شب در دمای ۴ درجه و یا یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند، تا آنتی ژن به کف پلیت کوت شود. پس از شستشو با بافر PBST، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از سرم رقیق شده (۱/۱۰) در بافر رقیق کننده (PBS) به حفرات اضافه شده پلیت ها ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از شستشو با بافر PBST، ۱۰۰ میکرو لیتر Anti mouse HRP conjugate با رقت ۱/۱۰۰۰۰ در PBS یا بافر رقیق کننده، رقیق و در حفرات ریخته شده، پلیت ها ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. شستشوی پلیت ها با بافر PBST، و با اضافه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر سوبسترای TMB به همه چاهک ها و پلیت ها ۳۰ دقیقه در محل تاریک و با ۳۷ درجه انکوبه شدند، برای توقف واکنش ۵۰ میکرو لیتر اسید سولفوریک ۲ مولار به همه چاهک های پلیت ها اضافه نموده بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای اندازه گیری میزان جذب نوری قرائت انجام شد. برای بررسی ایمنی سلولار ۷ هفته پس از چالش با انگل اندازه گیری سایتو کین های گاما اینترفرون و IL4 ایمنی سلولی مورد

بررسی قرار گرفت. ۷ هفته پس از چالش با انگل استخراج لنفوسیت از طحال موش های مورد و شاهد به صورت زیر انجام گرفت.

ابتدا موش ها کشته شده، از سلول های طحال موش در شرایط استریل در محلول PBS سوسپانسیون سلولی تهیه شد. رسوب سلول ها پس از شستشو و سانتریفیوژ با محیط RPMI 1640 که حاوی ۱۰ FCS درصد است، به ۱۰۰۰ میکرو لیتر رسانده شد و کشت سلول های لنفوسیت طحال موش جهت بررسی وجود سایتو کین های IFN- γ و IL4 در پلیت ۲۴ خانه ای به تعداد 2×10^6 کشت داده شد. از سوپ سلولی، لنفوسیت های طحالی موش های چالش شده و درمان شده پس از ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت جمع آوری شد و در ویال اپندورف جمع شده در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی در مقادیر ۳۰۰ میکرو لیتر در ویال ها تقسیم شد و تا زمان سنجش سایتو کین در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند (۲۳) و سپس جهت بررسی وجود سایتو کین های گاما اینترفرون و اینترلوکین ۴ از سوپ سلولی لنفوسیت های طحال موش های دریافت کننده IL22 و PBS که در ۷۰°C- نگهداری شده استفاده گردید و با روش الایزا و با استفاده از کیت شرکت U-cytech-biosciences استفاده شد.

روش MTT برای سنجش تکثیر لنفوسیت ها

از روش MTT برای بررسی پرولیفراسیون لنفوسیت ها به صورت زیر استفاده شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون لنفوسیتی استخراج شده به هر چاهک در میکرو پلیت های ۹۶ خانه ای مخصوص کشت سلول اضافه شد (یعنی ۳۰۰/۰۰۰ سلول به ازای هر چاهک). سوسپانسیون حاصل از طحال هر موش در ۳ چاهک کشت داده شد. به دو چاهک از هر گروه، ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر از آنتی ژن انگل لیشمانیا ماژور افزوده شد و به یک چاهک دیگر همان گروه هیچ آنتی ژنی اضافه نگردید. حجم نهایی هر چاهک با

وارد نرم افزار SPSS شد و از آزمون One way ANOVA و برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون‌های تعقیبی LSD و TUKEY استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج مطالعه نشان داد که اثر درمانی IL22 در دو دوز ۵ و ۱۰ نانو گرم نسبت به گروه کنترل PBS گسترش زخم را به تأخیر می‌اندازد و رشد زخم به صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL22-5ng کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL22-5ng بوده است و شروع بروز زخم در گروه تحت درمان با IL22-5ng، ۵۱ روز پس از درمان بوده در صورتی که در سایر گروه‌ها ۳۰ روز پس از درمان بوده است (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: میانگین و انحراف معیار اندازه زخم در روزهای مختلف بعد از درمان با دوزهای ۵ و ۱۰ نانو گرم IL22 در عفونت لیشمانیازور موش BALB/c

Group	IL22-5n		IL22-10n		PBS	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Day						
۳۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۵۰	۰/۵۸	۲/۴۴	۰/۶۳
۳۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۵۵	۰/۶۴	۳/۹۸	۱/۶۱
۴۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۷۲	۱/۴۵	۸/۰۵	۳/۲۹
۵۱	۰/۲۵	۰/۵۰	۱/۶۰	۰/۴۹	۱۱/۷۸	۲/۷۰
۵۸	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۱۰	۰/۲۰	۱۸/۴۹	۹/۵۵
۵۶	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۹۴	۰/۷۶	۲۰/۰۵	۱۱/۳۷
۷۲	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۳۹	۰/۸۱	۲۸/۶۲	۹/۳۳
۷۹	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۱۳	۱/۶۲	۳۰/۰۱	۸/۸۲
۸۶	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۴۲	۰/۶۸	۳۲/۸۰	۲/۹۰
۹۳	۰/۵۰	۰/۵۸	۲/۱۲	۱/۴۳	۳۲/۷۳	۴/۴۴
۱۰۰	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۴۸	۰/۶۳	۳۲/۴۳	۴/۳۵
۱۰۷	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۳۴	۰/۵۵	۳۲/۶۳	۴/۴۱
۱۱۴	۰/۵۰	۰/۵۸	۱/۳۴	۰/۵۹	۳۲/۴۴	۳/۸۲

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، IL22-10ng و IL22-5ng نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح $p=۰/۰۰۰۱$ در ۴ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. برای آشکار سازی این اختلاف‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که در گروه IL22-5ng با $p<۰/۰۵$ با دو گروه دیگر در روزهای ۳۰ و ۳۷

FBS ۱۰ درصد + RPMI به ۲۰۰ میکرولیتر رسید.

سپس از چاهک‌های هر گروه، ۲ چاهک به عنوان کنترل کشت داده شد که یکی از این چاهک‌ها با فیتوهمگلوتنین PHA به عنوان میتوزن تحریک و دیگری تحریک نمی‌شود. پلیت‌های کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور 37°C دارای ۵ درصد CO_2 قرار می‌گیرد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک حاوی 200λ لئوسیت مقدار (20λ) از محلول MTT (غلظت 5 mg/ml) اضافه گردید. پلیت مذکور مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد دارای ۵ درصد CO_2 انکوبه شد (تا بلورهای فورمازان نمایان شوند). سوپ سلولی به آرامی بدون هم زدن محتویات چاهک‌ها سانتریفوژ شده و محتویات رویی به‌طور کامل خارج شد. به هر چاهک به مقدار 100λ از DMSO اضافه گردید. میزان جذب حاصل در طول موج 450 nm توسط دستگاه Reader Elisa قرائت شد. نتایج آزمایش به صورت اندیکس تحریک SI محاسبه گردید (۲۴).

بررسی زخم موش‌های درمان شده و کنترل

برای بررسی میزان آلودگی در موش‌ها در شروع، یک، سه و چهار هفته بعد از درمان نمونه‌گیری و تهیه اسمیر از زخم و شمارش تعداد انگل (آماستیگوت) در ۱۰ شان انجام شد. اندازه‌گیری قطر زخم، پس از چالش و ظاهر شدن زخم در قاعده دم موش با استفاده از کولیس دیجیتال به‌طور هفتگی اندازه‌گیری شد. بدین‌نحو که حاصل جمع طول و عرض قطر زخم بر عدد ۲ تقسیم و به عنوان عدد مربوط به قطر زخم در نظر گرفته می‌شد. وزن موش‌ها طی درمان به‌صورت هفتگی با ترازو کشیده و یادداشت گردید.

آنالیز آماری

نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری گاما اینترفرون و IL4 و توتال IgG و MTT و IgG ۲a و بررسی قطر زخم و بقاء موش‌ها در گروه‌های کنترل و مورد اطلاعات

اختلاف معنی دار است (جدول شماره ۲). میانگین MTT در چهار گروه به صورت زیر است که گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با $p < 0/05$ اختلاف معنی داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد. میانگین (OD) MTT در گروه دریافت کننده IL۲۲-۵ng، IL۲۲-۱۰ng و PBS به ترتیب ۰/۷۹۴، ۰/۴۱ و ۰/۵۵۵ می باشد.

جدول شماره ۲: میانگین و انحراف معیار IFN γ ، IL۴، IgG total و IgG2a در هفته هفتم بعد از درمان عفونت لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

PBS		IL22-10ng		IL22-5ng		
SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	
۱۰/۸۹	۱۳۱	۴۶/۹۵	۲۷۱	۳۳/۰۳	۱۷۶۹/۵	IFN γ
۱۴/۳۳	۲۰۳/۷۵	۵/۱۲	۱۴/۲۵	۴/۵۰	۳/۷۵	IL4
۰/۰۲۶۷	۰/۱۳۷۲	۰/۰۶۲	۰/۱۷۵	۰/۰۱۵	۰/۰۴۹۲	IgGtotal
۰/۲۸۵	۰/۰۱۸۶۷	۰/۱۴۱	۱/۲۴۹	۰/۲۸۵	۱/۴۳۹	IgG2a

بحث

از آنجایی که درمان بیماری لیشمانیوز جلدی در بهترین شرایط تنها ۸۰ درصد موفقیت داشته است و برخی از درمان‌ها کارایی بسیار اندکی در بیماری دارند لذا مطالعه روش‌های درمانی جدید گریز ناپذیر است. نتایج اثر درمانی IL۲۲ در دو دوز ۵ و ۱۰ نانو گرم نسبت به PBS نشان رشد زخم به صورت مشخص در گروه تحت درمان با IL۲۲۵ng کاهش می یابد و بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL۲۲۵ng بوده است و شروع بروز زخم در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng ۵۱ روز پس از درمان بوده در صورتی که در سایر گروه‌ها ۳۰ روز پس از درمان بوده است. از آنجایی که نتایج روی موش‌های BALB/c ماده نشان داد که در هفته های پس از عفونت با لیشمانیا ماژور، روند افزایش قطر زخم در گروه‌هایی که IL۲۲-۵ng در یافت کردند کندتر از گروه دریافت کننده IL۲۲-۱۰ng و PBS است ولی روند افزایش قطر و اندازه زخم در گروه دریافت کننده IL۲۲-۱۰ng و PBS مشاهده شده است. امروزه ثابت شده که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سایتو کین هستند (۲۵). در پوست IL۲۲ سبب القای

اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ولی در سایر روزها فقط با گروه PBS اختلاف آماری معنی دار دیده شد ($p < 0/05$). جهت بررسی روند آلودگی پس از گذشت ۵۱ روز در گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng ندول بسیار کوچکی مشاهده شد و میانگین تعداد اماسیگوت این گروه در ۱۰ فیلد (۴۵) در مقایسه با میانگین تعداد اماسیگوت‌ها در گروه IL۲۲-۱۰ng (۵۰، ۱۱) و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است. با این که در پایان دوره درمان تعداد اماسیگوت‌های گروه‌های دریافت کننده IL۲۲ کاهش داشت ولی بیشترین کاهش تعداد اماسیگوت را در گروه IL۲۲-۵ng داشتیم. در مقایسه میزان مرگ و میر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ گونه مرگ و میر در گروه‌های تحت درمان با IL۲۲ نداشتیم در صورتی که در گروه PBS (۱) مرگ در هفته چهارم اتفاق افتاد. قبل از شروع درمان از لحاظ میانگین اندازه و وزن اختلاف معنی داری بین گروه‌ها دیده نشد. ولی بررسی میانگین وزن با انجام آزمون LSD در هفته‌های مختلف نشان می دهد که گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng از نظر افزایش وزن با $p < 0/05$ با دو گروه دیگر در روزهای ۱۱۴ و ۱۰۷ اختلاف معنی داری ندارد ولی در سایر روزها با گروه PBS اختلاف آماری معنی دار آماری دیده شد. نتایج بررسی‌های IFN- γ ، IgG total، IgG2a و IL۴ نشان می دهد که IL۲۲-۱۰ng به طور مشخص سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL۴ می شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، IL۲۲-۱۰ng و IL۲۲-۵ng نتایج آزمون LSD نشان می دهد که میزان گاما اینترفرون و IgG total گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با $p < 0/05$ نسبت به سایر گروه‌ها معنی دار است و میزان IL۴ گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با $p < 0/05$ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری است. میزان IgG2a گروه تحت درمان با IL۲۲-۵ng با $p < 0/04$ نسبت به IL۲۲-۱۰ng معنی دار نیست ولی با گروه کنترل

پپتیدهای ضد میکروبی می شود و تکثیر کراتینوسیت ها را افزایش و تمایز آن ها را مهار می کند و یک نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد (۲۵،۱۶).

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان با PBS، 10 ng - IL_{22} و $IL_{22} - 5\text{ ng}$ نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح $p=0/000$ در ۳ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی دار آماری در اندازه زخم وجود دارد. که با استفاده از آزمون LSD نشان می دهد که گروه $IL_{22} - 5\text{ ng}$ با $p<0/05$ با دو گروه دیگر در روزهای ۳۰ و ۳۷ اختلاف معنی دار آماری در اندازه زخم دارد ولی در روزهای ۴۶، ۵۱، ۱۰۷، ۱۱۴، ۱۲۱ و ۴۴ فقط با $IL_{22} - 10\text{ ng}$ اختلاف معنی دار نیست ولی در روزهای ۵۸، ۷۲، ۶۵ و ۷۹ با $p<0/05$ فقط با گروه PBS اختلاف آماری معنی دار دیده شد. نتایج روی موش های BALB/c ماده نشان داد که در هفته های پس از عفونت با لیشمانیا ماژور، روند افزایش قطر زخم در گروه هایی که $IL_{22} - 5\text{ ng}$ دریافت کردند کندتر از گروه دریافت کننده PBS است و در مجموع نتایج اندازه زخم در گروهی که $IL_{22} - 5\text{ ng}$ را دریافت کرده، به مقدار گروه $IL_{22} - 5\text{ ng}$ نزدیک است ولی روند افزایش قطر و اندازه زخم در گروه دریافت کننده PBS مشاهده شده است که شاید نمایانگر اثر بهتر سایتوکین IL_{22} باشد. امروزه ثابت شده که سلول های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سایتوکین هستند. در پوست IL_{22} سبب القای پپتیدهای ضد میکروبی می شود و تکثیر کراتینوسیت ها را افزایش و تمایز آن ها را مهار می کند و یک نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد (۱۶،۲۵). در موش هایی که گروه کنترل را تشکیل می دادند و فقط PBS را دریافت کرده بودند روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه ها نیز معنی دار بود. جهت بررسی روند آلودگی پس از گذشت ۵۱ روز در گروه تحت درمان با $IL_{22} - 5\text{ ng}$ ندول بسیار کوچکی مشاهده شد و میانگین تعداد اماستیکوت این گروه در ۱۰ فیلد $4/5$ در مقایسه با

میانگین تعداد اماستیکوت ها در گروه $10\text{ ng} - IL_{22}$ $11/5$ و در گروه PBS (۱۶۸) در روز ۵۱ بوده است. با این که در پایان دوره درمان تعداد اماستیکوت های گروه های دریافت کننده IL_{22} کاهش داشت ولی بیشترین کاهش تعداد اماستیکوت را در گروه $IL_{22} - 5\text{ ng}$ داشتیم. که شاید بتوان توجیه نمود که چون عفونت لیشمانیایی در موش بستگی به فعال شدن یکی از دو زیر گروه های سلولی $CD+4$ یعنی $Th1$ و $Th2$ دارد و پاسخ $Th1$ با بهبودی و پاسخ $Th2$ با عفونت منتشر ارتباط دارد و سلول های $Th1$ با ترشح سایتوکین هایی مانند: $TNF-\beta$ ، IL_{22} و $IFN-\gamma$ واسطه بهبودی می باشند و $IFN-\gamma$ حاصل از این سلول ها به عنوان قوی ترین سایتوکین فعال کننده ماکروفاژهاست و فعال شدن ماکروفاژها منجر به تولید نیتریک اکسید NO و سرانجام منجر به مرگ انگل می شود (۲۸-۲۶).

نتایج سایر تحقیقات زیر شاید تأیید یافته فوق باشد. IL_{22} با آن که یک سیتوکین عضو خانواده IL_{10} است و IL_{10} به عنوان سردسته خانواده سایتوکین، یک مهار کننده مؤثر ایمنی سلولی و تقویت کننده قوی ایمنی هومورال است. ولی علی رغم داشتن مشترکات ساختمانی بسیار زیاد این دو در این خانواده از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمنولوژیک، تفاوت های فاحشی بین آن ها وجود دارد. و رسپتورهای $CRF2-4$ بین IL_{22} و IL_{10} مشترک است و برای سیگنالینگ لازم است در حالی که $CRF2-9$ مختص IL_{22} است و دارای هومولوژی بادمین زنجیره گیرنده IL_{10} است.

وجود $CRF2-9$ و $CRF2-4$ یعنی دو زنجیره گیرنده این سایتوکاین در سیگنالینگ مؤثر هستند و در مسیر سیگنالینگ این سایتوکاین شامل $STAT1$ ، $STAT3$ و $STAT5$ فعال شده متعاقب آن تولید پروتئین های فاز حاد از کبد افزایش می یابد و نقش این سایتوکین را به عنوان یک سایتوکین التهابی تثبیت می کند. IL_{22} باعث فعال سازی $JAK1$ ، $TYK2$ ، $STAT1$ ، $STAT3$ ، $STAT5$ و مسیر MAP کیناز می شود (۱۶-۱۱).

مطالعات زیادی در لیشمانیوز تجربی ناشی از لیشمانیا ماژور انجام گرفته است که نشان از ارتباط قوی بین تولید اینترفرون گاما و توانایی محدود کردن عفونت و از سویی ارتباط بین اینترلوکین ۴ و عدم توانایی کنترل عفونت است به طوری که تجویز anti-IFN- γ به موش‌های مقاوم سبب بزرگ شدن زخم و تأثیر در بهبودی می‌شود و بر عکس تجویز IFN- γ به موش‌های حساس سبب کوچک شدن زخم‌ها شده است. افزایش مقدار اینترفرون گاما نسبت به اینترلوکین ۴ در گروه‌های دریافت‌کننده IL22 نشان‌دهنده این است که بیماری به سمت بهبودی می‌رود. زیرا ثابت شده که در مدل‌های موش‌های آزمایشگاهی که پاسخ‌های ایمنی به سمت TH1 و اینترفرون گاما می‌رود؛ بیماری به‌سوی خودبه‌خود بهبود شونده می‌رود. در زمانی که پاسخ ایمنی به سمت Th2 و اینترلوکین ۴ می‌رود بیماری شدت می‌یابد و وخیم می‌شود (۲۷، ۲۸).

IL22 یک اثر حفاظتی در برابر بیماری کالآزار انسانی دارد و لیشمانیا دونووانی تمایز سلول‌های Th17 را برای تولید IL17 و IL22 و گاما اینترفرون تحریک می‌کند (۲۱). در مقایسه میزان مرگ و میر موش‌ها ۱۳ هفته پس از درمان هیچ‌گونه مرگ و میر در گروه‌های تحت درمان با IL22 نداشتیم در صورتی که در گروه PBS (۱) مرگ در هفته چهارم اتفاق افتاد. قبل از شروع درمان از لحاظ میانگین اندازه وزن موش‌ها اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. از آنجایی که عامل زمان تأثیر قاطع بر روند بیماری، وزن و اندازه قطر زخم دارد بدیهی است که با گذشت زمان عفونت در حیوان تثبیت شده، بیماری بروز می‌کند. این مسأله منجر به بروز علائم در حیوان، کم‌خوراکی و از سویی تحلیل رفتن آن و در مجموع سبب کاهش وزن حیوان می‌شود. در موش‌هایی که گروه کنترل را تشکیل می‌دادند و فقط PBS را دریافت کرده بودند، روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بود. نتایج بررسی‌های IFN- γ ، IgG total، IgG2a و IL4 نشان می‌دهد که

IL22- Δ ng، به‌طور مشخص سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL4 می‌شود.

در مقایسه ۳ گروه تحت درمان IL22- Δ ng و IL22-10ng و PBS نتیجه تحلیل واریانس نشان داد در سطح $p=0/001$ در ۳ گروه حداقل در یک زوج گروه اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. که برای آشکار سازی این اختلاف‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آزمون LSD نشان می‌دهد که میزان گاما اینترفرون و IgG total گروه تحت درمان با IL22- Δ ng با $p<0/05$ نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار است و میزان IL4 گروه تحت درمان با IL22- Δ ng با $p<0/05$ نسبت به IL22-10ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است. میزان IgG2a گروه تحت درمان با IL22- Δ ng با $p<0/05$ نسبت به IL22-10ng معنی‌دار نیست ولی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار است. میانگین MTT در چهار گروه نشان داده است که گروه تحت درمان با IL22- Δ ng با $p<0/05$ اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد. در این روش رنگ سنجی MTT قادر به عبور از غشای سلول‌ها می‌باشد. آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی قادر است پس از ورود MTT به سلول‌های سالم، حلقه ترازولیوم آن را بشکند و آن را به فورمازان نامحلول و آبی رنگ تبدیل کند. در حالی که سلول‌های مرده از این عمل ناتوان هستند. که در این آزمایش حداکثر پرولیفراسیون و حداکثر تکثیر و تحریک لنفوسیت‌ها در مربوط به گروه دریافت‌کننده IL22- Δ ng می‌باشد (۲۴).

در مجموع نشان داده شده بیشترین تأثیر در گروه تحت درمان با IL22- Δ ng بوده است زیرا IL22- Δ ng سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL4 شده است و نمایانگر آن است که موش‌های تحت درمان با IL22 سبب ایجاد پاسخ‌های سایتوکین Th1 می‌شود از طرفی درصد بقاء بالا و کاهش مرگ و میر، افزایش چشمگیر وزن، کاهش قطر زخم، افزایش IgG2a، اینترفرون گاما و کاهش میزان IL4 نمایانگر کارایی

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دکترای انگل شناسی خانم هاجر ضیایی هزار جریبی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

این سایتوکین در درمان لیشمانیوز جلدی می باشد که باید در آینده همراه با واکسن های لیشمانیا مورد ارزیابی قرار گیرد.

References

- Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLOS Negl Trop Dis* 2008; 2(10): e313.
- Handman E. Leishmaniasis; current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2): 229-300.
- Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermat* 1996; 14: 425-431.
- Atlashewski MG. Leishmania infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190(1-2): 37-42.
- Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, et al. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterization of the causative organisms. *Int J Parasitol* 2004; 34(6): 655-664.
- Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1999; 17(3): 257-260.
- Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(Suppl 1): 3-15.
- Chang KP, Fong D, Bray RS. Biology of *leishmania* and leishmaniasis. In: Chang KP, Bray RS, eds. *Leishmaniasis: Human Parasitic Diseases*. Vol 1. Philadelphia: Elsevier; 1985. p. 1-30.
- Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol* 2001; 167(7): 3545-2549.
- Conti P, Kempuraj D, Frydas S, Kandere K, Boucher W, Letourneau R, et al. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol Lett* 2003; 88(3): 171-174.
- Igwa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL) 22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol Immunol* 2006; 43(7): 999-1009.
- Dumoutier L, Van RE, Ameye G, Michaux L, Renauld JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse gene. *Genes Immun* 2000; 1(8): 488-494.
- Pinto Nagem RA, Colau D, Dumoutier L, Renauld J-Ch, Ogata C, Polikarpov I. Structure of recombinant human interleukin-22. *Structure* 2002; 10(8): 1051-1062.
- Gurney AL. IL-22, a Th1 cytokine that target the pancreas and select other peripheral tissue. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(5): 669-677.
- Jones SA, Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology the agonistic prosperities of the s IL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592(3): 251-263.
- Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory

- gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174: 3695-3702.
17. Andoh A, Zhang Zh, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 129(3): 969-984.
 18. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; 14(3): 275-281.
 19. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection on hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007; 27(4): 647-659.
 20. Dhiman R, Indramohan M, Barnes PF, Nayak RC, Paidipally P, Rao LV, et al. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing phagolysosomal fusion. *J Immunol* 2009; 183(10): 6639-6645.
 21. Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with Protection against human Kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* 2009; 119(8): 2379-2387.
 22. Sasaki S, Takeshita F, Ke-qin X, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulation and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 2003; 31: 243-254.
 23. Farnandez-Botran R, Vetyickaz V. *Methods in Cellular Immunology*. 2nd ed. Portland: CRF Press LNC; 2001.
 24. Verma A, Prasad KN, Singh AK, Nyati KK, Gupta RK, Paliwal VK. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 81(2): 175-178.
 25. Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, Gurney AL, Lecron J-C, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174(6): 3695-3702.
 26. McSorley S, Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Immunology of murine Leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996; 14: 451-464.
 27. Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous Leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1989; 68: 369-372.
 28. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 1998; 66(7): 3279-3289.