

Evaluation of Interferon-gamma Application for Recognition of Patients Afflicted by Non-healing Cutaneous Leishmaniasis

Mohammad Moafi

PhD Student of Immunology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, mohammoafi@yahoo.com

Hossein Rezvan*

PhD in Immunoparasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, hosseinrezvanbas@gmail.com

Roya Sherkat

Associate Professor of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Acquired Immunodeficiency Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, sherkat@med.mui.ac.ir

Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani

Associate Professor of Immunology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran, s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

Roya Taleban

Community Medicine Specialist, Acquired Immunodeficiency Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, royataleban@yahoo.com

Ali Asilian

Professor of Dermatology, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan Iran, asilian@med.mui.ac.ir

Mohammad Ali Nilfroushzadeh

Professor of Dermatology, Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, nilfroushzadeh@mui.ac.ir

Fariba Jaffary

Professor of Pharmacology, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, Jaffary@pharm.mui.ac.ir

Marjan Mansourian

Associate Professor of Biostatistics, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, jmansourian@gmail.com

Fateme Sokhanvari

General Physician, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, dr_f_sokhanvari@yahoo.com

Nazli Ansari

General Physician, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, nazli_md@hotmail.com

Abstract

Introduction: Different studies undertaken in the animal modeling show that Interferon-gamma deficiency impairs healing process of *Leishmania* infection. It seems that the level of Interferon-gamma production could also affect the healing duration of *Leishmania* lesion in humans. The current study aims to investigate the possibility of Interferon-gamma application for recognition of cases afflicted by non-healing Leishmaniasis.

Materials and methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 32 patients, who were afflicted by healing or non-healing Leishmaniasis, were isolated and the levels of interferon-gamma were determined, using ELISA method. Afterwards, the cut-off point of interferon-gamma to identify patients afflicted by non-healing Leishmaniasis was calculated through ROC-Curve analysis. Furthermore, Leishmanin Skin Test (LST) was performed for every patient.

Results: Levels of Interferon-gamma produced by PBMCs stimulated with Soluble *Leishmania* Antigen (SLA) or Phytohemagglutinine were significantly higher in healing patients, compared with non-healing individuals ($p < 0.01$). Interferon-gamma cut-off point in the optimized sensitivity (87.5%) and specificity (100%) was 1208 pg/ml. In addition, Levels of induration resulted from Lesihmanin Skin Test (LST) was significantly higher in healing patients, compared with healing individuals ($p=0.023$).

Discussion and conclusion: Interferon-gamma deficiency could be considered as one of the causative factors in non-healing Leishmaniasis in humans. In fact, Interferon-gamma deficiency can identify some patients afflicted by non-healing Leishmaniasis.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis, Interferon-gamma, Leishmanin

* Corresponding author

Received: October 5, 2015/ **Accepted:** July 3, 2016

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۱۰۱-۱۱۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳

بررسی کاربرد اینترفرون گاما برای تشخیص بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر

محمد معافی: دانشجوی دکترای تخصصی ایمنی‌شناسی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، mohammoafi@yahoo.com
حسین رضوان*: دکترای تخصصی ایمنوپارازیتولوژی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، hosseinrezvanbas@gmail.com
رویا شرکت: دانشیار بیماری‌های عفونی و گرمسیری، مرکز تحقیقات نقض ایمنی اکسایبی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، sherkat@med.mui.ac.ir
سید حمید زرکش اصفهانی: دانشیار ایمنونولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk
رویا طالبان: متخصص پزشکی اجتماعی، مرکز تحقیقات نقض ایمنی اکسایبی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، royataleban@yahoo.com
علی اصیلان: استاد بیماری‌های پوست و مو، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، asilian@med.mui.ac.ir
محمدعلی نیلفروش زاده: استاد بیماری‌های پوست و مو، مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، nilfroushzadeh@mui.ac.ir
فریبا جعفری: استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، Jaffary@pharm.mui.ac.ir
مرجان منصوریان: دانشیار آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، jmansourian@gmail.com
فاطمه سخنوری: پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، dr_f_sokhanvari@yahoo.com
نازلی انصاری: پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، nazli_md@hotmail.com

چکیده

مقدمه: مطالعات انجام شده روی الگوهای حیوانی نشان می‌دهند که کمبود اینترفرون گاما باعث اختلال در روند التیام عفونت لیشمانیا می‌شود. به نظر می‌رسد که سطح تولید اینترفرون گاما می‌تواند در مدت زمان التیام زخم لیشمانیا در انسان نیز مؤثر باشد. هدف این مطالعه، بررسی امکان استفاده از اینترفرون گاما برای تشخیص بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۳۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوز التیام‌ناپذیر یا التیام‌پذیر جدا و میزان تولید اینترفرون گاما آنها با روش الایزا اندازه‌گیری شد. سپس نقطه برش (Cut-Off Point) تولید اینترفرون برای تعیین بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر با استفاده از آنالیز منحنی راک (ROC-Curve) محاسبه شد. همچنین برای هر یک از بیماران، آزمون جلدی لیشمانین انجام شد.

نتایج: سطح اینترفرون گامایی که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با آنتی‌ژن محلول لیشمانیا و یا میتوژن فیتوهمگلوتینین تولید می‌کنند در گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر به شکل معناداری از بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر بیشتر بود ($p < 0/001$). نقطه برش (Cut-Off Point) اینترفرون گاما در مناسب‌ترین حساسیت (۸۷/۵ درصد) و ویژگی (۱۰۰ درصد) برابر ۱۲۰۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین سطح اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی لیشمانین در بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر به شکل معناداری از افراد مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر بیشتر بود ($p = 0/023$).

بحث و نتیجه‌گیری: کمبود تولید اینترفرون گاما می‌تواند یکی از عوامل لیشمانیوز التیام‌ناپذیر در انسان باشد؛ در واقع، از کمبود اینترفرون گاما می‌توان برخی از بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر را شناسایی کرد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، اینترفرون گاما، لیشمانین

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

برخی بیماران به‌ویژه بیماران مبتلا به لیشمانیوز مزمن کارایی کمی دارند (۹ و ۱۰).

به‌طور معمول، ضایعات ناشی از لیشمانیوز جلدی یا سالک در مدت زمان کمتر از دو سال و خودبه‌خود بهبود می‌یابند؛ هرچند گاهی زخم فعال حاصل از سالک می‌تواند برای سال‌های طولانی باقی بماند (۳). براساس مطالعات فراوان انجام‌شده روی الگوهای حیوانی، مشخص شده است که پیش‌آگهی عفونت‌های ایجادشده از انگل‌های جنس *لیشمانیا* وابسته به فعال شدن یکی از دو زیرگروه لئوسیت‌های TH1^{۱۵} و یا TH2^{۱۶} است؛ برای مثال، عفونت حاصل از تک‌یاخته *لیشمانیا* در موش‌های نژاد C57BL/6 به ایجاد پاسخ‌های TH1 و اینترفرون گاما^{۱۷} حاصل از آن منجر می‌شود. تزریق انگل *لیشمانیا* در این نژاد می‌تواند ضایعات مختصر پوستی مانند سالک را ایجاد کرده و ایمنی مؤثری در برابر تک‌یاخته *لیشمانیا* ایجاد کند. در مقابل، تزریق انگل *لیشمانیا* به موش‌های نژاد BALB/c به برانگیخته شدن پاسخ‌های TH2 و مرگ ۱۰۰ درصدی موش‌های آلوده منجر می‌شود (۱۱).

درباره ارتباط اینترفرون گاما با طول دوره بیماری سالک در انسان مطالعات محدودی انجام شده و نتایج آنها متفاوت و گاهی متناقض است. برای مثال، برخی از یافته‌ها تولید مقادیر کمی از اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر را نشان داده و برخی دیگر از مطالعات بر تولید مقادیر فراوانی از اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک مزمن دلالت می‌کنند (۱۲-۱۵). هدف از انجام مطالعه حاضر، تبیین دقیق ارتباط بیماری سالک التیام‌ناپذیر با اینترفرون گاما و تعیین نقطه برش^{۱۸} مناسب برای شناسایی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی التیام‌ناپذیر است.

لیشمانیوز، بیماری تک‌یاخته‌ای منتقل‌شونده از طریق پشه خاکی ماده است که پس از بیماری مالاریا بیشترین شیوع را در جهان دارد (۱). ایران یکی از شایع‌ترین کانون‌های بیماری لیشمانیوز جلدی است و میزان بروز این بیماری در سال ۱۳۹۲، ۲۲ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر گزارش شده است. استان‌های ایلام، فارس، خراسان رضوی و اصفهان به ترتیب بیشترین موارد جدید این بیماری را در ایران دارند. تک‌یاخته *لیشمانیا ماژور*^۱ بیشتر موارد این بیماری را در ایران ایجاد می‌کند و *لیشمانیا تروپیکا*^۲ تنها حدود ۳۳/۴ درصد موارد جدید سالک را ایجاد می‌کند (۲). دوره کمون بیماری سالک شهری حاصل از *لیشمانیا تروپیکا* ۲ تا ۸ ماه و دوره کمون سالک روستایی ایجادشده در اثر *لیشمانیا ماژور* کمتر از ۴ ماه است (۳ و ۴).

تشخیص بیماری لیشمانیوز براساس تظاهرات بالینی، شواهد هیستوپاتولوژیک زخم *لیشمانیا*، جدا و مشاهده انگل موجود در زخم و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۳ انجام می‌شود. تشخیص *لیشمانیا* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و ریل تایم پی‌سی‌آر^۴ نسبت به سایر روش‌ها حساسیت^۵ و ویژگی^۶ قبول‌پذیری دارد و بر نواحی مختلفی مانند ژن *اینترنال ترانسکرایب اسپیسر*^۷، توالی‌های *اسیددزوکسی ریبونوکلیک کیتوپلاست*^۸، ژن پروتئین شوک حرارتی *هفتاد*^۹ و ژن *تریاردوکسین پراکسیداز*^{۱۰} انجام می‌شود (۱، ۵-۸).

امروزه از آلپورینول^{۱۱} و داروهای آنتی‌موان پنج‌ظرفیتی^{۱۲} مانند گلوکانتیم^{۱۳} و پنتوستام^{۱۴} برای درمان بیماران مبتلا به لیشمانیوز استفاده می‌شود. این داروها ممکن است عوارض جانبی شدیدی مانند آسیب شدید کلیوی در فرد ایجاد کنند؛ همچنین این درمان‌ها در

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه، ملاحظات اخلاقی و نمونه‌گیری:

برای برآورد حجم نمونه، تمام افراد در دسترسی که بیماری نادر مدنظر را داشتند در مطالعه شرکت داده شدند و برای افزایش قدرت مطالعه، به ازای هر بیمار مبتلا به بیماری نادر لیشمانيوز التیام‌ناپذیر، ۳ نفر بیمار شاهد (دارای زخم فعال سالک التیام‌پذیر) در نظر گرفته شد (۱۶). براین اساس، در مجموع ۳۲ بیمار شامل ۲۴ بیمار مبتلا به سالک التیام‌پذیر و ۸ بیمار مبتلا به زخم سالک التیام‌ناپذیر بررسی شدند. افراد مبتلا به سالک التیام‌پذیر، زخم فعال سالک را داشتند و زخم آنها در مدت کمتر از یک سال بهبود یافته بود؛ این افراد مدت ۹ ماه پس از بهبودی برای تأیید ایجادنشدن زخم مشکوک به سالک در آنها پیگیری^{۱۹} شدند (۱۷). در گروه بیماران مبتلا به لیشمانيوز التیام‌ناپذیر، پرونده پزشکی بیماران بررسی شد و اگر بیش از ۲ سال به زخم فعال و مزمن سالک مبتلا بودند در گروه بیماران سالک التیام‌ناپذیر طبقه‌بندی شدند (۳). این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان بررسی و تأیید شد. پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی از داوطلبانی که مایل به شرکت در مطالعه بودند، نمونه‌گیری از زخم با تیغ بیستوری و در شرایط استریل انجام و بیماری سالک در تمام بیماران با روش لام مستقیم (رنگ آمیزی گیمسا) یا کشت انگل در محیط دوفازی^{۲۰} N.N.N تأیید شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر خون محیطی هپارینه از هر بیمار مبتلا به سالک گرفته شد و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی^{۲۱} روی فایکول^{۲۲} جدا شدند. همچنین، طی این مطالعه اطلاعات دموگرافیک شامل سن و جنس و سوابق بالینی مرتبط با سالک برای هر یک از بیماران ثبت شد.

آزمون پوستی لیشمانيین^{۲۳}: برای انجام آزمون پوستی

لیشمانيین از ویال‌های تست و شاهد تولیدی مؤسسه پاستور ایران استفاده شد. هر یک از ویال‌های تست شامل 6×10^6 عدد پروماستیگوت‌های کشته‌شده لیشمانيا مازور بودند که در محلول تیومرسال ۰/۰۱ درصد موجود در بافر فسفات‌سالیین^{۲۴} قرار داشتند. ترکیب ویال‌های شاهد دقیقاً مانند ویال‌های تست بود ولی آنتی‌ژن لیشمانيا را نداشت. آزمون پوستی لیشمانيین با تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون دارای آنتی‌ژن در ناحیه ولار^{۲۵} ساعد دست راست انجام شد؛ عمل تزریق با سوزن گیج^{۲۶} و داخل پوستی^{۲۶} انجام شد. همچنین ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ویال‌های شاهد در ناحیه پشتی^{۲۷} ساعد دست راست تزریق شد. پس از ۴۸ ساعت تورم حاصل از تزریق با کولیس اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از آزمون پوستی لیشمانيین در یکی از سه گروه منفی (تورم صفر تا ۵ میلی‌متر)، مثبت (تورم ۶ تا ۱۴ میلی‌متر)، و مثبت قوی^{۲۸} (بیش از ۱۵ میلی‌متر) طبقه‌بندی شدند (۱۸).

تهیه آنتی‌ژن محلول لیشمانيا^{۲۹}: برای تهیه آنتی‌ژن

لیشمانيا، از سویه استاندارد لیشمانيا مازور استفاده شد (MRHO/IR/75/ER). سویه یادشده در محیط RPMI 1640 غنی‌شده با سرم جنین گوساله^{۳۰} ۱۰ درصد و حاوی ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر^{۳۱} پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد کشت شد. سپس پروماستیگوت‌های فاز ایستا برداشت و چهار بار در محلول بافر فسفات‌سالیین^{۳۱} استریل (pH=7.2) شستشو شدند. سلول‌های یادشده ($10^9 \times 1$ سلول در میلی‌لیتر) در محلول بافر لیزکننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار ترکیب تریس کلریدریک‌اسید^{۳۲}، ۱ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید^{۳۳} غنی‌شده با لئوپیتین^{۳۴} (به غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و

با یکی از آنتی‌ژن‌های آنتی‌ژن‌محلول لیشمانیا^{۳۵}، PPD^{۴۰} یا لفتوهماگلوآنتی‌ژن^{۴۱} تحریک شدند. آنتی‌ژن PPD^{۳۶} از مؤسسه واکسن و سرم رازی تهیه و با غلظت ۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. غلظت آنتی‌ژن‌های آنتی‌ژن‌محلول لیشمانیا^{۳۷} و لفتوهماگلوآنتی‌ژن^{۳۸} (تولیدی شرکت گیکو، انگلستان) در محیط کشت چاهک به ترتیب برابر ۵۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون، سوپ سلولی حاصل از کشت سلولی برداشت و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سنجش مقادیر اینترفرون گاما در سوپ سلولی با روش ساندویچ الایزا و کیت تجاری تشخیص اینترفرون گامای انسانی (شرکت ایبو سیانس^{۴۲} آمریکا، شماره کاتالوگ: ۸۸-۷۳۱۶-۲۲) انجام شد. تمام مراحل الایزا براساس شیوه‌نامه کیت انجام و میزان جذب نوری نمونه‌ها در دستگاه الایزا ریدر^{۴۳} (کمپانی آوارنس^{۴۴}، ایالات متحده آمریکا) و در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام اطلاعات دموگرافیک^{۴۵} و بالینی بیماران و همچنین نتایج حاصل از الایزا با نرم‌افزار SPSS^{۴۶} (نسخه ۲۰) تجزیه و تحلیل آماری شدند. سطوح اینترفرون گامای تولیدشده در هر یک از گروه‌ها به کمک آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های تکراری^{۴۷} مقایسه شدند. برای مقایسه متغیرهای اسمی از آزمون‌های آماری کای اسکور پیرسون^{۴۸} و آزمون دقیق فیشر^{۴۹} استفاده شد. همچنین، متغیرهای رتبه‌ای و کمی پیوسته با مان-ویتنی^{۵۰} و تی‌تست^{۵۱} مقایسه شدند. در این مطالعه، مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ اختلاف آماری معنادار در نظر گرفته شد. با استفاده از منحنی راک^{۵۲} و بر مبنای مناسب‌ترین ویژگی و حساسیت، بهترین نقطه برش برای پیشگویی سالک التیام‌ناپذیر و لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر محاسبه شد.

۱/۶ میلی‌مولار از فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلورید^{۳۵} قرار گرفتند (تمام مواد محلول بافر لیزکننده از کمپانی سیگما^{۳۶} تهیه شدند). برای جلوگیری از واسرشت شدن پروتئین انگل، ۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر از آنزیم مهارکننده کوکتل پروتئاز^{۳۷} ساخت شرکت سیگما به سوپانسیون فوق‌اضافه شد. محلول حاوی پروماستیگوت هفت‌مرتبته در دماهای منفی ۷۰ و مثبت ۳۷ درجه سانتی‌گراد منجمد و ذوب شد و سپس عمل سونیکه شدن انگل هفت‌مرتبته (هر بار ۲۰ ثانیه با قدرت ۶۰ درصد) انجام شد. سوپانسیون حاصل از انگل، دو بار در ۳۰۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه و در ۱۰۰۰۰g به مدت ۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دستگاه اولتراسانتریفیوژ (مدل ال ۹۰ کی، ساخت کمپانی بکمن کولتر-آمریکا^{۳۸}) مستقر در دانشکده دارو دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سانتریفیوژ شد. پس از حذف لایه لیپیدی، سوپرناتانت برداشته و فیلتر شد و غلظت پروتئین آنتی‌ژن محلول لیشمانیا^{۳۷} با روش بردفورد^{۳۹} اندازه‌گیری شد. آنتی‌ژن پروتئینی تهیه‌شده تا زمان مصرف در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای و سنجش اینترفرون

گاما در سوپ سلولی: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران در پلیت‌های ۱۲-خانه‌ای مسطح حاوی RPMI 1640 غنی‌شده با سرم جنین گوساله ۱۵ درصد و دارای ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای هر بیمار در سه چاهک با غلظت $10^5 \times 10^5$ سلول در میلی‌لیتر در هر چاهک توزیع شدند. کل حجم محیط کشت در هر چاهک برابر ۱۰۰۰ میکرولیتر بود و سلول‌های موجود در هر یک از چاهک‌ها

نتایج

روش لام مستقیم (رنگ آمیزی با گیمسا)، زخم سالک همه ۲۴ بیمار مبتلا به سالک التیام‌پذیر را تأیید کرد. در ۷ نفر از ۸ بیمار مبتلا به زخم سالک التیام‌ناپذیر، بیماری سالک با روش لام مستقیم و در ۱ نفر، وجود انگل با روش کشت در محیط N.N.N تأیید شد. تمام بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر یا التیام‌ناپذیر هنگام نمونه‌گیری، زخم تپیک سالک را داشتند و بیماری سالک در تمام بیماران التیام‌ناپذیر در ابتدای تظاهر زخم سالک و قبل از ورود به فاز مزمن تأیید شده بود. میانگین سن شرکت‌کنندگان در گروه سالک التیام‌ناپذیر و سالک التیام‌پذیر به ترتیب برابر $38/37 \pm 21/9$ و $33/58 \pm 11/45$ سال بود و اختلاف آماری معناداری بین دو گروه شرکت‌کننده از نظر میانگین سنی افراد مشاهده نشد ($p=0/569$). میانه طول دوره زخم در گروه سالک التیام‌ناپذیر و لیشمانیوز التیام‌پذیر به ترتیب برابر ۹۲۵ روز و ۶۰ روز بود و هیچ‌یک از افراد شرکت‌کننده در مطالعه به فشار خون زیاد یا بیماری دیابت مبتلا نبودند. مقایسه نتایج حاصل از آزمون لیشمانین بیانگر اختلاف آماری معنادار بین دو گروه بود ($p=0/023$). در گروه سالک التیام‌ناپذیر، نتایج حاصل از تست لیشمانین نیمی از بیماران مثبت و سایر شرکت‌کنندگان منفی بودند. در گروه سالک التیام‌پذیر، ۹۱/۷ درصد و ۸/۳ درصد بیماران به ترتیب در گروه مثبت قوی و مثبت قرار گرفتند (جدول ۱).

میانگین تولید اینترفرون گاما در چاهک‌هایی که با آنتی‌ژن‌های آنتی‌ژن محلول لیشمانیا، PPD یا لیتوهم‌گلوتینین تحریک شده بودند بین دو گروه التیام‌پذیر و التیام‌ناپذیر مقایسه شد (جدول ۲). میانگین سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های حاوی PPD در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و التیام‌پذیر به ترتیب برابر با $20/54 \pm 27/31$ و $29/57 \pm 45/84$ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد دو گروه در میزان اینترفرون گامای چاهک‌های تحریک‌شده با PPD اختلاف آماری معناداری ندارند ($p=0/113$). میانگین سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول لیشمانیا در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و التیام‌پذیر به ترتیب برابر با $396/74 \pm 529/86$ و $5344/85 \pm 1921/47$ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین، میانگین تولید اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با لیتوهم‌گلوتینین در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و التیام‌پذیر به ترتیب برابر با $1500/84 \pm 1776/18$ و $10272/60 \pm 3017/58$ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. در این مطالعه، بین دو گروه مبتلا به سالک در سطح اینترفرون گامای چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول لیشمانیا و میتوزن لیتوهم‌گلوتینین اختلاف آماری معناداری وجود داشت (مقادیر p برای چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول لیشمانیا و میتوزن لیتوهم‌گلوتینین کمتر از ۰/۰۰۱ بود).

جدول ۱- مقایسه ویژگی‌های بالینی بیماران مبتلا به سالک بین دو گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر و التیام‌ناپذیر

p-Value	بیماران مبتلا به سالک غیر قابل التیام	بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر	ویژگی
۰/۰۵۶۹ ^λ	۳۷/۳۸±۲۱/۹۰	۳۳/۵۸±۱۱/۴۵	سن (سال): (میانگن ±انحراف معیار)
۰/۴۴۴ ^η	۷(۸۷/۶٪)	۲۳(۹۵/۸٪)	جنس: تعداد شرکت‌کنندگان مرد (درصد)
۰/۰۵۶ ^η	۶(۷۵٪) ۲(۲۵٪)	۲۴(۱۰۰٪) ۰(۰٪)	ملیت تعداد افراد ایرانی (درصد) تعداد افراد افغانی (درصد)
۰/۲۰۴ ^ρ	۰(۰٪) ۳(۳۷/۵٪) ۳(۳۷/۵٪) ۲(۲۵٪)	۱(۴/۳٪) ۱۴(۵۸/۳٪) ۷(۲۷/۹٪) ۲(۸/۳٪)	نمایه توده بدنی یا BMI ^{۵۳} تعداد افراد با BMI کمتر از ۱۸/۵ (درصد) تعداد افراد با BMI از ۱۸/۵ تا ۲۴/۵ (درصد) تعداد افراد با BMI از ۲۵ تا ۲۹/۹ (درصد) تعداد افراد با BMI بیشتر از ۳۰ (درصد)
۰/۷۰۱ ^θ	۱(۱۲/۵٪) ۱(۱۲/۵٪) ۶(۵۸/۳٪)	۵(۲۰/۸٪) ۵(۲۰/۸٪) ۱۴(۷۵٪)	شغل تعداد افراد کشاورز(درصد) تعداد افراد راننده (درصد) تعداد افراد در شغل‌های دیگر (درصد)
۰/۱۴۸ ^η	۳(۳۷/۵٪)	۳(۱۲/۵٪)	تعداد افراد معتاد به مصرف سیگار (درصد)
۰/۹۹ ^η	۲(۲۵٪) ۶(۷۵٪)	۷(۲۹/۲٪) ۱۷(۷۰/۶٪)	منطقه سکونت تعداد افراد ساکن در منطقه آندمیک برای بیماری لیشرمانیوز (درصد) تعداد افراد ساکن در منطقه غیر آندمیک برای لیشرمانیوز (درصد)
۰/۱۱۶ ^θ	۳(۳۷/۵٪) ۴(۵۰٪) ۱(۱۲/۵٪)	۱۶(۶۶/۷٪) ۸(۳۳/۳٪) ۰(۰٪)	روش درمان تعداد افراد با تزریق موضعی گلوکانتیم (درصد) تعداد افراد با تزریق سیستمیک گلوکانتیم (درصد) تعداد افراد با درمان سنتی (درصد)
۰/۴۵۹ ^θ	۲(۲۵٪) ۵(۶۲/۵٪) ۱(۱۲/۵٪)	۲(۸/۳٪) ۱۹(۷۹/۲٪) ۳(۱۲/۵٪)	محل ضایعه تعداد افراد با ضایعه سالک در صورت (درصد) تعداد افراد با ضایعه سالک در دست و پا (درصد) تعداد افراد با ضایعه سالک در نقاط مختلف بدن (درصد)
۰/۵۱۳ ^θ	۰(۰٪) ۰(۰٪) ۳(۳۷/۵٪) ۵(۶۲/۵٪) ۰(۰٪)	۰(۰٪) ۰(۰٪) ۶(۲۵٪) ۱۵(۶۲/۵٪) ۳(۱۲/۵٪)	زمان آغاز زخم سالک در فصل: تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در بهار (درصد) تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در تابستان (درصد) تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در پاییز (درصد) تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در زمستان (درصد)
۰/۹۱۵ ^ρ	۴(۵۰٪) ۴(۵۰٪)	۱۳(۵۴/۲٪) ۱۱(۴۵/۸٪)	تعداد زخم سالک در هر بیمار تعداد افراد با یک زخم سالک (درصد) تعداد افراد با دو زخم سالک و یا بیشتر (درصد)
۰/۰۴۲ ^λ	۳۹/۳۷±۱۷/۵۰	۲۳/۱۲±۱۹/۰۸	مساحت کل زخم (میلی متر): (میانگن ±انحراف معیار)
۰/۰۲۳ ^ρ	۴(۵۰٪) ۴(۵۰٪) ۰(۰٪)	۰(۰٪) ۲۲(۹۱/۷٪) ۲(۸/۳٪)	آزمون جلدی لیشرمانین تعداد افراد با اندوراسیون کمتر از ۵ میلی‌متر (درصد) تعداد افراد با اندوراسیون ۶ تا ۱۴ میلی‌متر (درصد) تعداد افراد با اندوراسیون بیشتر از ۱۵ میلی‌متر (درصد)

توضیحات زیر نویس جدول ۱

λ: روش آماری استفاده شده در تی تست

η: روش آماری استفاده شده در آزمون دقیق فیشر

ξ: روش آماری استفاده شده کای اسکور پیرسون

ρ: روش آماری استفاده شده مان ویتنی

جدول ۲- مقایسه تولید اینترفرون گامای حاصل از کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در مجاورت سه آنتی‌ژن مختلف PPD، آنتی‌ژن

محلول لیسمانیا و فیتوهماگلو تینین

سایتوکاین گروه	غلظت اینترفرون گاما در چاهک‌های دارای آنتی‌ژن PPD*	غلظت اینترفرون گاما در چاهک‌های دارای آنتی‌ژن محلول لیسمانیا	غلظت اینترفرون گاما در چاهک‌های دارای فیتوهماگلو تینین	اثر آنتی‌ژن داخل هر گروه	اثر محرک‌های PPD*، آنتی‌ژن محلول لیسمانیا و میتوژن فیتوهماگلو تینین بین گروه‌ها
التیام‌پذیر	۴۵/۸۴±۲۹/۵۷	۵۳۴۴/۸۵±۱۹۲۱/۴۷	۱۰۲۷۲/۶۰±۳۰۱۷/۵۸	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱ ^d
التیام‌ناپذیر	۲۷/۳۱±۲۰/۵۴	۳۹۶/۷۴±۵۲۹/۸۶	۱۵۰۰/۸۴±۱۷۷۶/۱۸	p=۰/۰۴۹	
P-Value ^h	۰/۱۱۳	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱		

*:آنتی‌ژن PPD: Purified Protein Derivative

fi: نوع آزمون آماری به کاررفته تی تست بود.

ξ: نوع آزمون آماری به کاررفته، آنالیز واریانس با اندازه‌های تکراری بود.

تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول لیسمانیا^h برای پیشگویی طبقه‌بندی بیمار در گروه سالک التیام‌ناپذیر و یا لیسمانیوز جلدی التیام‌پذیر برابر ۱۲۰۸ میکوگرم در میلی‌لیتر بود (حساسیت و ویژگی به ترتیب برابر با ۸۷/۵ درصد و ۱۰۰ درصد و مساحت زیر نمودار^{۵۴} برابر ۹۹/۵ بود). از ۸ بیمار مبتلا به سالک، سطح اینترفرون گامای ۱ نفر بیشتر از نقطه برش تعیین شد.

بحث و نتیجه‌گیری

براساس نتایج این پژوهش، سطح اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر نسبت به بیماران مبتلا به لیسمانیوز جلدی التیام‌پذیر کمتر بود. ارتباط بین تولید اینترفرون گاما و التیام زخم لیسمانیا در الگوهای حیوانی ثابت شده است ولی درباره ارتباط این سایتوکاین و مدت زمان بهبود زخم سالک در انسان، یافته‌های

مقایسه سطح اینترفرون گاما در گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر نشان داد که سطح سایتوکاین در چاهک‌های تحریک‌شده با PPD^h به شکل معناداری از چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول لیسمانیا^h و فیتوهماگلو تینین^h کمتر بود (p<۰/۰۰۱) (جدول ۲). در گروه سالک التیام‌پذیر، سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با فیتوهماگلو تینین^h به طور معناداری بیشتر از چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول لیسمانیا^h بود (p<۰/۰۰۱). در گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر، سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول لیسمانیا^h و فیتوهماگلو تینین^h به شکل معناداری نسبت به چاهک‌های تحریک‌شده با PPD^h بیشتر بود (p=۰/۰۴۹).

نقطه برش مناسب اینترفرون گاما در چاهک

به شکل معناداری بیشتر از بیماران مبتلا به سالک حاد (زخم آنها در مدت کمتر از ۴ ماه بهبود یافته بود) بود (۱۵). همچنین در مطالعه اژدری و همکاران، اختلاف آماری معناداری در سطح اینترفرون گامایی که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تولید می‌کنند بین دو گروه بیماران مبتلا به زخم حاد و مزمن سالک (التیام‌ناپذیر) مشاهده نشد (۱۳). علت تفاوت نتایج مطالعه ما با پژوهش‌هایی که وجود مقادیر فراوان اینترفرون گاما را در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر نشان می‌دهند را می‌توان به پاسخ‌ندادن به تولید اینترفرون گاما نسبت داد؛ به عبارتی، دو شکل از بیماری لیشمانیوز التیام‌ناپذیر مشاهده شد: در شکل اول، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نمی‌توانند مقادیر کافی اینترفرون گاما در پاسخ به *ل. آنتی‌ژن* محلول *لیشمانیا* تولید کنند و در شکل دوم، لنفوسیت‌های تی و سلول‌های کشنده طبیعی به مقدار مناسب و حتی بیشتر از حد معمول اینترفرون گاما تولید می‌کنند ولی گیرنده اینترفرون گاما و یا مولکول‌های پیام‌رسان درون‌سلولی به مقدار کافی داخل سلول‌های ماکروفاژ وجود ندارند. در واقع، بیان‌نشدن مقادیر کافی از گیرنده اینترفرون گاما و یا مولکول‌های پیام‌رسان داخل سلولی که مسئول فعال کردن ماکروفاژ در برابر عوامل بیماری‌زای داخل سلولی هستند، می‌تواند به پاسخ‌ندادن به سطوح زیاد اینترفرون گاما و ایجاد اشکال التیام‌ناپذیر سالک منجر شود. مکانیسم‌های مختلفی برای پاسخ‌ندادن به اینترفرون گاما مطرح شده‌اند که به نحوی با فرایندهای تنظیم ایمنی^{۶۰} فرد مبتلا به سالک در ارتباط هستند، از جمله می‌توان به کاهش بیان گیرنده اینترفرون گاما و همچنین کاهش مولکول‌های رونوشت‌برداری مؤثر در پاسخ به اینترفرون گاما اشاره کرد. در واقع، آلودگی

متضادی وجود دارد (۱۲، ۱۳ و ۱۵). برای مثال، در مطالعه اژدری^{۵۵} و همکاران، سطح اینترفرون گامایی که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر تولید می‌کنند نسبت به افراد مبتلا به سالک التیام‌پذیر، به طور معناداری کمتر بود. در مطالعه یادشده سلول‌های تک‌هسته‌ای بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر رنگ‌آمیزی داخل سلولی شدند و درصد سلول‌های تولیدکننده اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر به طور معناداری کمتر از افراد بهبودیافته از سالک مشاهده شد (۱۲) مطالعه کمپت^{۵۶} و همکاران نشان داد که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی افراد بهبودیافته از سالک که در محیط کشت سلولی با *ل. آنتی‌ژن* محلول *لیشمانیا* مواجه شده بودند توانایی تکثیر زیادی داشته و مقادیر فراوانی از سایتوکاین اینترفرون گاما تولید کردند (۱۹). در مطالعه دیگری مشاهده شد که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به سالک شدید مقاوم به درمان، توان تکثیر در برابر *ل. آنتی‌ژن* محلول *لیشمانیا* را نداشتند و مقادیر کمی اینترفرون گاما در پاسخ به *ل. آنتی‌ژن* یادشده تولید کردند (۲۰). در مطالعه‌ای که غفار^{۵۷} و همکاران در سودان انجام دادند؛ مشخص شد که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به سالک شدید مقاوم به درمان، مقادیر کمی اینترفرون گاما در پاسخ به *ل. آنتی‌ژن* محلول *لیشمانیا* تولید می‌کنند (۲۱). برخی پژوهش‌های دیگر نیز هاپراکتیویته^{۵۸} سلول‌های Th1 و تولید مقادیر زیادی از اینترفرون گاما را در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر نشان می‌دهند؛ برای مثال، در مطالعه حسینی^{۵۹} و همکاران سطح بیان ژن اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به زخم مزمن سالک (زخم آنها بیش از ۶ ماه طول کشیده بود)

نسبت به دیگر انواع سالک به شکل معناداری بیشتر است. همان‌طور که صادقان و همکاران بیان کردند تفاوت در تظاهر کلینیکی بیماری سالک می‌تواند در میزان اندوراسیون زخم سالک مؤثر باشد. در مطالعه ما، تمام بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر مبتلا به شکل پلاک^{۶۲} بیماری سالک بوده و موردی از ابتلا به سالک لوپوئید مشاهده نشد؛ در نتیجه می‌توان علت تفاوت نتایج ما با مطالعه صادقان و همکاران را در تفاوت تظاهر کلینیکی دانست (۱۸).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که اندازه ضایعه^{۶۳} حاصل از لیشمانیا اختلاف آماری معناداری بین دو گروه مبتلا به لیشمانیوز التیام‌ناپذیر و سالک التیام‌پذیر دارد (جدول ۱). این یافته با پژوهش‌های قبلی انجام‌شده در الگوهای حیوانی و مطالعات انسانی هماهنگی داشت. به نظر می‌رسد تولید مقادیر بیشتر اینترفرون گاما که در بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر مشاهده شد به کاهش تعداد انگل موجود در موضع عفونت شده منجر می‌شود و روند التیام زخم را تسریع می‌کند (۲۴).

با توجه به کارایی کم داروهای آنتی‌موان پنج‌طرفیتی در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و نبود راهکار مشخص و همگانی برای درمان این دسته از بیماران یک طرف و وجود درمان استاندارد برای بهبود بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر از طرف دیگر، بر آن شدیم تا نقطه‌ای را در منحنی راک برای افتراق بیماران استفاده کنیم که بتواند تمام افراد مبتلا به سالک التیام‌پذیر را شناسایی کرده و در نتیجه تمام آنها با گلوکانتیم درمان استاندارد شوند. به این منظور، از نقطه‌ای استفاده شد که به ازای ویژگی ۱۰۰ درصد، بیشترین حساسیت را داشت؛ این نقطه معادل اینترفرون گامای ۱۲۰۸ پیکوگرم

حاصل از عفونت لیشمانیا می‌تواند به کاهش بیان گیرنده اینترفرون گاما منجر شود؛ به دنبال کاهش بیان گیرنده اینترفرون گاما، تولید اینترلوکین-۱۲^{۶۱} و نیتریک‌اکساید^{۶۲} در ماکروفاژهای آلوده‌شده کاهش یافته و امکان بقای عوامل بیماری‌زای داخل سلولی در ماکروفاژهای آلوده افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، مشخص شده است که ماکروفاژهای آلوده به اشکال پروماستیگوت و آماستیگوت انگل لیشمانیا مقادیر کمتری از مولکول‌های پیام‌رسان داخل سلولی مانند مولکول‌های STAT^{۶۳}، AP-1^{۶۴} و NF-kB^{۶۵} را بیان می‌کنند. مولکول‌های یادشده پس از اتصال اینترفرون گاما به گیرنده مربوطه فعال شده و می‌توانند به القای آثار التهابی اینترفرون گاما منجر شوند (۲۲).

آزمون پوستی لیشمانین، واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری^{۶۶} در پاسخ به اجسام کشته‌شده لیشمانیا مازور در این مطالعه انجام شد. نتایج نشان دادند که اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی لیشمانین در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر به شکل معناداری از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر کمتر بود (جدول ۲). نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های حاصل از مطالعه گورین^{۶۷} و همکاران همخوانی داشت. در مطالعه یادشده مشخص شد که اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی لیشمانین در بیماران مبتلا به لیشمانیوز التیام‌ناپذیر وجود نداشته و یا کم است. همچنین نتایج مطالعه یادشده، وجود اختلاف آماری معنادار در اندوراسیون آزمون جلدی بین افراد مبتلا به سالک برگشت‌پذیر^{۶۸} و لیشمانیوز بدون علامت^{۶۹} را نشان داد (۲۳). مطالعه ما با پژوهشی که صادقان^{۷۰} و همکاران انجام دادند هم‌سو نبود؛ در مطالعه یادشده ثابت شد که اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی در بیماران مبتلا به سالک لوپوئید^{۷۱}

گروهی از بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر را شناسایی کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه بوعلی‌سینای همدان و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان برای حمایتشان از انجام این پژوهش و از زحمات آقای دکتر خامسی پور، آقای دکتر حجازی و کارکنان مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر می‌کنند.

References

- (1) Rezvan H., Moafi M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. *Veterinary Research Forum* 2015; 6(1): 1-7.
- (2) Norouzzinezhad F., Ghaffari F., Norouzzinejad A., Kaveh F., Gouya MM. Cutaneous leishmaniasis in Iran: Results from an epidemiological study in urban and rural provinces. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2016; 6(7): 614-619.
- (3) Mortazavi H., Sadeghipour P., Taslimi Y., Habibzadeh S., Zali F., Zahedifard F., et al. Comparing acute and chronic human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica* focusing on arginase activity. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2016; in press.
- (4) Zamir M., Zaman G., Alshomrani AS. Sensitivity analysis and optimal control of anthroponotic Cutaneous *Leishmania*. *PloS one* 2016;11(8):e0160513.
- (5) Dabirzadeh M, Hashemi M, Maroufi Y. Study of Genetic Variation of *Leishmania major* Based on Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) in Chabahar, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2016; in press.

در میلی‌لیتر در چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* بود. بر این اساس، حساسیت و ویژگی اینترفرون گامای تولیدی در نقطه برش ۱۲۰۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر به ترتیب برابر ۸۷/۵ و ۱۰۰ درصد بود؛ به این معنی که با اندازه‌گیری اینترفرون گاما می‌توان حدود ۸۷ درصد بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و تمام بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر را تشخیص داد. در واقع، حساسیت ۸۷/۵ درصد در نقطه برش ۱۲۰۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر به این معنی است که سطح اینترفرون گامای سلول‌های تک‌هسته‌ای ۸۷ نفر از ۱۰۰ بیمار مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر کمتر از ۱۲۰۸ بوده و در مقابل سطح اینترفرون گامای ۱۳ بیمار از ۱۰۰ بیمار مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر بیشتر از ۱۲۰۸ است. با استفاده از نقطه برش تعیین شده می‌توان براساس میزان تولید اینترفرون گاما در مجاورت آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* راهکار مناسب درمانی را تعیین کرد. بر این اساس، در صورتی که میزان تولید اینترفرون گاما در بیمار مبتلا به سالک بیشتر از ۱۲۰۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر باشد از گلوکانتیم استفاده می‌شود که درمان استاندارد طلائی^{۶۴} است (۲۵). از سوی دیگر، باتوجه به ویژگی بالای نقطه برش تعیین شده (۱۰۰ درصد)، چنانچه میزان تولید اینترفرون گاما کمتر از ۱۲۰۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر باشد می‌توان از روش‌های جایگزین که عوارض جانبی کمتری دارند مانند درمان موضعی با تری‌کلرواستیک‌اسید^{۷۵} ۵۰ درصد استفاده کرد (۲۶).

با توجه به نتایج این پژوهش و مطالعات مشابه، به نظر می‌رسد کاهش تولید اینترفرون گاما می‌تواند یکی از عوامل ایجاد اشکال التیام‌ناپذیر سالک محسوب شود. از این رو می‌توان با اندازه‌گیری میزان اینترفرون گامای تولیدشده در پاسخ به آنتی‌ژن اختصاصی *لیشمانیا*،

- (6) de Vries HJ., Reedijk SH., Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology* 2015; 16(2):99-109.
- (7) Torpiano P., Pace D. Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe. *Expert review of anti-infective therapy* 2015; 13(9): 1123-38.
- (8) Abadi S., Fekri M., Dabiri S., Ardakani RF., Malaki LF., Rostami SA., et al. Design and validation of real time PCR: Quantitative diagnosis of common *Leishmania* species in Iran. *Archives of Iranian Medicine (AIM)* 2016;19(7): 496-501.
- (9) Mohammadzadeh M., Behnaz F., Golshan Z. Efficacy of glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in Central Iran. *Journal of infection and public health* 2013; 6(2): 120-4.
- (10) de Moura TR., Santos MLB., Braz JM., Santos LFV., Aragão MT., de Oliveira FA., et al. Cross-resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. *Parasitology research* 2016; 115(2): 713-21.
- (11) Paul C., Wolff S, Zapf T., Raifer H., Feyerabend TB., Bollig N., et al. Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice. *European journal of immunology* 2016; 46(1): 114-21.
- (12) Ajdary S., Alimohammadian MH., Eslami MB., Kemp K., Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infection and immunity* 2000; 68(4): 1760-4.
- (13) Ajdary S., Riazi-Rad F., Alimohammadian MH., Pakzad SR. Immune response to *Leishmania* antigen in anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infection* 2009; 59(2): 139-43.
- (14) Hoseini SG. Comparison of immune regulatory factors in early and late lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Experimental dermatology* 2012; 17: 513-8.
- (15) Hoseini SG., Javanmard SH., Hejazi SH., Rafiei L., Zarkesh SH., Karbalaii K., et al. Comparison of immune regulatory factors in acute and chronic lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Journal of Research in Medical Sciences* 2014; 19(3): 36-40.
- (16) Fletcher RH., Fletcher SW., Fletcher GS. Clinical epidemiology: the essentials. Fifth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
- (17) Hepburn N. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology* 2000; 25(5): 363-70.
- (18) Sadeghian G., Ziaei H., Bidabadi LS., Nilforoushzadeh MA. Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis. *Indian journal of dermatology* 2013; 58(3):239.
- (19) Kemp M., Hey A., Kurtzhals J., RISTENSEN CC., Gaafar A., Mustafa M., et al. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clinical & Experimental Immunology* 1994; 96(3): 410-5.
- (20) Shahi M., Mohajery M., Shamsian SAA., Nahrevanian H., Yazdanpanah SMJ. Comparison of Th1 and Th2 responses in non-healing and healing patients with cutaneous leishmaniasis. *Reports of biochemistry & molecular biology* 2013; 1(2): 43.
- (21) Gaafar A., Kharazmi A., Ismail A., Kemp M., Hey A., Christensen C., et al. Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clinical & Experimental Immunology* 1995; 100(2): 239-45.

- (22) Kima PE., Soong L. Interferon gamma in leishmaniasis. *Frontiers in immunology* 2013; 4: 156.
- (23) Guarín N., Palma GI., Pirmez C., Valderrama L., Tovar R., Saravia NG. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. *Biomedica* 2006; 26: 38-48.
- (24) Hurrell BP., Schuster S., Grün E., Coutaz M., Williams RA., Held W., et al. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. *PLOS Pathog* 2015; 11(5): e1004929.
- (25) Nilforoushzadeh MA., Jaffary F., Derakhshan R., Haftbaradaran E. Comparison between intralesional meglumine antimoniate and combination of trichloroacetic acid 50% and intralesional meglumine antimoniate in the treatment of acute cutaneous Leishmaniasis: A randomized clinical trial. *Journal of Skin and Stem Cell* 2014; 1(1): e16633.
- (26) Banihashemi M., Yazdanpanah MJ., Amirsolymani H., Yousefzadeh H. Comparison of lesion improvement in lupoid leishmaniasis patients with two treatment approaches trichloroacetic acid and intralesional meglumine antimoniate. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 2015; 19(1): 35-9.
-
- ¹ - *Leishmania major* (*L. major*)
² - *Leishmania tropica* (*L. tropica*)
³ - Polymerase Chain Reaction (PCR)
⁴ - Real Time PCR
⁵ - Sensitivity
⁶ - Specificity
⁷ - Internal Transcribed Spacer (ITS)
⁸ - Kinetoplastid DNA (kDNA)
⁹ - Heat Shock Protein 70 (HSP-70)
¹⁰ - Tryparedoxin Peroxidase
¹¹ - Allopurinol
¹² - Pentavalent Antimony
¹³ - Glucantime
¹⁴ - Pentostam
¹⁵ - Type 1 T helper (Th1) cells
¹⁶ - type 2 T helper (Th2) cells
¹⁷ - Interferone-gamma
¹⁸ - Cut-off Point
¹⁹ - Follow-up
²⁰ - Novy-MacNeal-Nicolle (N.N.N)
²¹ - Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)
²² - Ficoll
²³ - Leishmanin Skin Test (LST)
²⁴ - Phosphate Buffer Saline (PBS)
²⁵ - Volar
²⁶ - Interdermal (Id)
²⁷ - Dorsal
²⁸ - Strongly Positive
²⁹ - Soluble Leishmania Antigen (SLA)
³⁰ - Fetal Calf Serum (FCS)
³¹ - IU/ml
³² - TRIS -HCL
³³ - Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
³⁴ - Leupeptin
³⁵ - Phenyl methyl sulfonyl fluoride
³⁶ - Sigma
³⁷ - Cocktail protease inhibitor enzyme
³⁸ - L 90 K, ULTRACENTRIFUGE, USA
³⁹ - Bradford assay
⁴⁰ - Purified Protein Derivative (PPD)
⁴¹ - Phytohemagglutinine (PHA)
⁴² - Ebioscience
⁴³ - ELISA Reader
⁴⁴ - Awareness
⁴⁵ - Demographic
⁴⁶ - Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)
⁴⁷ - Repeated Measure ANOVA
⁴⁸ - Pearson Chi-square
⁴⁹ - Fisher's exact test
⁵⁰ - Mann-whitney
⁵¹ - t-test
⁵² - Receive Operation Characteristic (ROC)
⁵³ - Body Mass Index (BMI)
⁵⁴ - Area under Curve (AUC)
⁵⁵ - Ajdary
⁵⁶ - Kemp
⁵⁷ - Gaafar
⁵⁸ - Hyperactivity
⁵⁹ - Hosseini
⁶⁰ - Immunoregulatory
⁶¹ - Interleukin 12 (IL-12)
⁶² - Nitric Oxide (NO)
⁶³ - Signal transducer and activator of transcription (STAT)
⁶⁴ - Activator protein 1 (AP-1)
⁶⁵ - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)
⁶⁶ - Delayed Type Hypersensitization (DTH)
⁶⁷ - Guarín
⁶⁸ - Refractory
⁶⁹ - Asymptomatic
⁷⁰ - Sadeghian
⁷¹ - Lupoid
⁷² - Plaque
⁷³ - Lesion Size
⁷⁴ - Golden Standard
⁷⁵ - Trichloroacetic Acid (TCA)