

التعدد الشكلي في جينة الانترفيرون غاما عند مرضى

الليشماتية الجلدية المزمنة*

عائدة الخيمي***

أمال عساف**

الهام حرفوش****

الملخص

خلفية البحث: تعدُّ الليشماتية الجلدية من أكثر أشكال الليشماتية شيوعاً، كما أنها مرض مستوطن في سورية، وعلى الرغم من الجهود الكبيرة لمكافحة المرض ما يزال الوقوع السنوي عالياً. وعلاوة على ذلك فإن السياحة، والهجرة و انتشار مرض عوز المناعة المكتسب (الايذز) كلها عوامل تعمل على انتشار المرض إلى مناطق جديدة حول العالم. حديثاً اقترحت الدراسات بأن التعدد الشكلي في مورثات (جينات) السيٲوكينات قد يسهم في المقاومة أو الاستعداد للعديد من الأمراض ومنها الليشماتية . هدف البحث: الهدف الرئيسي لهذا البحث هو دراسة العلاقة بين التعدد الشكلي الوظيفي في جينة أحد أهم سيٲوكينات الجواب المناعي الأول Th1 وهو الانترفيرون غاما (IFN- γ) والإصابة بالليشماتية الجلدية المزمنة. طرائق البحث: في دراستنا قمنا بتحليل التعدد الشكلي في جينة الانترفيرون غاما (IFN- γ) وهو أحد السيٲوكينات المهمة في الجواب المناعي من النمط الأول Th1. شملت الدراسة 54 مريضاً مصاباً بالليشماتية الجلدية المزمنة، و70 شاهداً من مناطق مختلفة في سورية.

* أعد البحث في سياق رسالة الدكتوراه للطالبة أمال عساف بإشراف الأستاذة الدكتورة عائدة الخيمي وبمشاركة المدرسة الهام حرفوش.

** قسم الطب المخبري - كلية الطب البشري - جامعة دمشق.

*** أستاذة - قسم الطب المخبري - كلية الطب البشري - جامعة دمشق.

**** مدرسة - قسم الطب المخبري - كلية الطب البشري - جامعة دمشق.

درس التعدد الشكلي الوظيفي في الموقع +874 من جينة الانترفيرون غاما بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR ومن ثم تسلسل الـ DNA (DNA sequencing) وذلك بالتعاون مع جامعة توبنجن في ألمانيا.

النتائج: وجدنا أن التعدد الشكلي من الأدينين إلى التايمين، (IFN- γ +874 A→T) كان أقل في مرضى الليشمانية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد والفرق ذو مغزى إحصائي (كأي مربع $= 8.81$ ، $P = 0.003$).

الاستنتاج: تقترح أن التعدد الشكلي في الانترون الأول من جينة الانترفيرون غاما قد يؤثر في تطور مرض الليشمانية الجلدية باتجاه الإزمان.

الكلمات المفتاحية: الليشمانية الجلدية، الانترفيرون غاما ، التعدد الشكلي، الجواب المناعي.

Interferon γ (IFN- γ) Polymorphism in Patients with Chronic Cutaneous Leishmaniasis

Amal Assaf*

Aida khiami**

Elham Harfoush***

Abstract

Background: Cutaneous Leishmaniasis (CL) is one of the most prevalent clinical forms of leishmaniasis, also it is endemic disease in Syria. And in spite of the great efforts to control the disease the annual incidence is still increased. Furthermore, tourism, migration, and prevalence of acquired immunodeficiency (AIDS) all these factors increase the spread of this disease to new areas around the world.

Recently, studies suggest that cytokines gene polymorphisms can contribute to resistance or susceptibility to many diseases and one of these diseases is CL.

Objective: The main purpose of this research was to study the relationship between the polymorphism in Interferon γ (IFN- γ) gene, which is one of the most important cytokine in the first immune response T helper (Th1) and chronic cutaneous leishmaniasis.

Methods: In our study we analyzed the polymorphism in Interferon γ (IFN- γ) gene, which is an important cytokine in the first immune response T helper (Th1). A total of 54 patients with chronic cutaneous leishmaniasis, and 70 healthy controls from different areas in Syria were included in this study. Functional polymorphism in the position +874 of γ (IFN- γ) gene was investigated by polymerase chain reaction and DNA sequencing in cooperation with Tubingen University-Germany.

Results: We found that IFN- γ +874 A \rightarrow T polymorphism was less common in patients with chronic cutaneous leishmaniasis CCL compared to the healthy controls ($\chi^2 = 8.81$, $p = 0.003$).

Conclusion: our results suggest that the polymorphism in the first intron of the IFN- γ gene might influence the progression of disease towards CCL.

Key words: cutaneous leishmaniasis, Interferon γ , polymorphism, immune response.

* Department of Laboratory, Faculty of Medicine, Damascus University.

** Prof. Department of Laboratory, Faculty of Medicine, Damascus University.

*** Department of Laboratory, Faculty of Medicine, Damascus University.

المقدمة: Introduction

تعدُّ الليشمانية من المشاكل الصحية المهمة في العديد من الدول، ويتراوح الطيف السريري من إصابة جلدية بسيطة إلى إصابة حشوية مهددة للحياة ما لم تعالج (1). هذا وإن لأدواء الليشمانية بأشكالها السريرية الثلاثة (الجلية، الجلدية المخاطية، والحشوية) انتشاراً عالمياً واسعاً. فهناك نحو 12 مليون مصاب بالمرض، و350 مليون شخص معرض للإصابة وذلك في 88 بلداً حول العالم يتوطن فيها المرض. ويقدر معدل الوقوع السنوي بـ 1-1.5 مليون إصابة من الليشمانية الجلدية و0.5 مليون من الحشوية (1). وما تزال نسبة الحدوث العالمية في ارتفاع، كما أنه قد تشكلت بؤر جديدة endemic foci لاستيطان المرض خلال العقود الأخيرة، فضلاً عن صعوبة ضبط الجائحات. هذا ويزداد انتشار المرض بسبب الحركة السكانية والهجرة. أما في الدول الغربية فيعزى ارتفاع معدلات الإصابة بسبب تراقف المرض مع الإيدز والسياحة، ويقدر أنه بين 1.5-9.5% من مرضى الإيدز مصابون بداء الليشمانيات (2).

أما في سورية فتتوطن فيها الليشمانية الجلدية بشكليها الجاف والرطب، فتشكل الليشمانية الجلدية الجافة الناجمة عن طفيلي الليشمانية المدارية *L.tropica* معظم الإصابات، يشفى الجزء الأكبر منها خلال سنة، بينما تبقى الأقلية منها مدة أكثر من سنة مشكلة الليشمانية المزمنة *Chronic cutaneous leishmaniasis (CCL)* ويعدُّ الإنسان هو الخازن الأساسي. كما تنتشر الليشمانية الجلدية الرطبة ويسببها طفيلي الليشمانية الكبرى *L.major* أما الخازن فهو القوارض، كما تسجل حالات فرادى من الليشمانية الحشوية (3).

حديثاً أثبت أن الجواب المناعي يؤثر في الاستعداد أو المقاومة للعديد من الأمراض ومنها الليشمانية، فمقاومة المرض يرتبط بالجواب المناعي *Th1*، في حين يقود الاستجابة *Th2* إلى الاستعداد للإصابة، وربما تطور الإصابة (4). ويبدو أن

الاستجابة المناعية تؤثر حتى في الشكل السريري لليشمانيا الجلدية من شفاء أو إزمان(5,6). ومن المعروف أن الإنتاج الباكر للـ (IFN- γ) والـ IL-12 في الـ Th1 بآلياتهما المناعية المختلفة تكسب الثوي المقاومة، وذلك على نقيض الـ IL-4 الذي يقود إلى الـ Th2 وبناء عليه التأهب لليشمانيا(7). وعلاوة على ذلك فإن سيتوكينات الـ Th1 هي المسؤولة عن تفعيل البالعات macrophage، ومن ثمَّ المقاومة للعوامل المرضية التي تعيش داخل الخلايا intracellular pathogens، كون الآلية المناعية الأساسية للسيطرة على اليشمانيا هي تفعيل البالعات بالـ IFN- γ وإنتاج أول أكسيد الأزوت ذي القدرة القاتلة لطفيليات اليشمانيا (8)، فضلاً عن أن الـ IFN- γ الذي يدعى الانترفيرون المناعي يزيد من تقديم المستضد للبالعات، ويفعل الأنزيمات الحالة فيها كما أنه يثبط الـ Th2. لما كانت الدراسات ربطت بين سيتوكينات الجواب المناعي الأول والثاني Th1, Th2 والاستعداد للإصابة باليشمانيا، وحتى تطور التظاهرات السريرية المختلفة لليشمانيا ابتداء من الإصابة بالاعرضية وحتى الإزمان، ولما كان إفراز هذه السيتوكينات مرتبطاً بالتعدد الشكلي لجيناتها (9-12)، من هنا أجرينا هذه الدراسة آخذين بالحسبان ندرة الدراسات المجراة على التعدد الشكلي في جينة هذه السيتوكينات والتأهب للإصابة باليشمانيا الجلدية .

هدف الدراسة: Aim of the study

الهدف الرئيسى لهذا البحث هو دراسة العلاقة بين التعدد الشكلي الوظيفي في جينة أحد أهم سيتوكينات الجواب Th1 وهو الانترفيرون غاما والإصابة باليشمانيا الجلدية المزمنة .

المواد والطرائق Materials and methods

1- المرضى والشواهد أجريت الدراسة على 54 مريضاً مصاباً بالليشمانيا المزمنة chronic cutaneous leishmaniasis (CCL) (37 ذكراً وسطي أعمارهم 28.3 ± 14.4 سنة و 17 أنثى وسطي أعمارهن 26.5 ± 14.1) من مراجعي العيادات الجلدية في مناطق مختلفة في سورية، شخّصت لديهم ليشمانيا جلدية بالاعتماد على الشكل السريري للآفة، وعلى رؤية الطفيلي في لطاخات من الآفة الجلدية ملونة بغيماز، وعدت الإصابة مزمنة كونها استمرت أكثر من 24 شهراً.

كما أدخل بالدراسة 70 شخصاً (42 ذكراً وسطي العمر 29.2 ± 14.6 و 28 أنثى وسطي أعمارهن 28.7 ± 14.5 سنة) ليس لديهم أي آفة جلدية، عُدوا كشواهد أصحاء ملأ كلهم استمارة للتأكد من عدم وجود إصابة سابقة بالليشمانيا الجلدية، أو مرض مناعي ذاتي أو ورم. كلتا المجموعتين (المرضى والشواهد) ينتميان إلى المناطق الجغرافية نفسها والسوية الاجتماعية نفسها.

2- التعدد الشكلي في جينة الانترفيرون غاما IFN- γ gene polymorphism

3- في البداية استخلص الـ DNA من الدم المحيطي في كلية الطب باستخدام QIAampTM DNA extraction kits من شركة (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)، ومن ثم أكملت الدراسة الجينية في معهد الطب المداري -جامعة توبنجن - ألمانيا، حيث ضخم الانترن الأول من الـ IFN- γ بالـ PCR باستخدام البادئين:

Forward primer (5'-cct agg tca cag tga cgt gg-3')

Reverse primer (5'-ccg tgc ttc gtg gtt tgg act-3')

وباختصار استخدم 50 نانوغراماً من الـ DNA الجينومي في 25 μ l من مزيج التفاعل الذي يحوي 1% 20 mM Tris pH 8.8, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.1% Triton X-100, 1x Q-solution (QIAGEN), 0.2 mM dNTP, 0.5 mM MgCl₂,

فضلاً عن 0.5 ميكرومول من كل بادئة وواحدة دولية من جراثيم المياه الدافئة الـ Taq polymerase.

وذلك بشروط التضخيم التالية 20 دورة من (الحرارة 94° مدة 20 ثانية ثم 56° مدة 50 ثانية وأخيرا 72° مدة 40 ثانية). ثم لون الجزء الذي تم تضخيمه بالسيبرغرين (Biozym Diagnostik GmbH, Wien, Austria)، ورحلت على جيل الأغار، ومن ثم أجرينا تنقية لنواتج الـ PCR باستخدام كيت الـ (EZNA Cycle-Pure kit) من شركة (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) بعدها أجرى تسلسل الـ DNA بواسطة الـ BigDye® Terminator v1. 1 Cycle Sequencing Kit من شركة (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)، وفي المرحلة الأخيرة أجرى تحليل لمنتجات التفاعل على جهاز (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). واستخدم برنامج الـ Bio-Edit لقراءة النتائج وتحليلها.

الدراسة الإحصائية Statistical analysis

أجرى التحليل الإحصائي ومقارنة تواتر الأليل allele والنمط الجيني genotype بين المجموعتين وحساب كاي مربع χ^2 والنسبة الشاذة (OR) odd ratio باستخدام برنامج (Stata (STATA Corporation, Texas, USA)، وعُدَّ الفرق ذا مغزى إحصائي في حال كون $P\text{-value} < 0.05$.

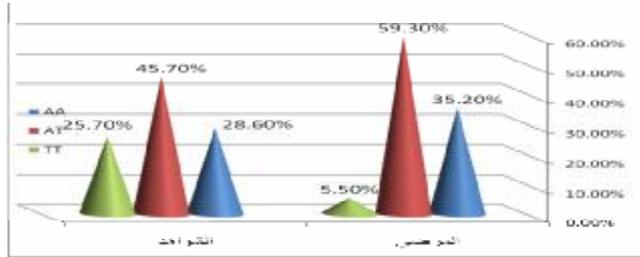
النتائج: Results

درس التعدد الشكلي في الموقع 874 + في الانترون Intron الأول من جينة الـ IFN- γ بواسطة الـ PCR ومن ثم DNA sequencing . وجدنا أن النمط الجيني TT منخفض عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد الأصحاء، وهذا الانخفاض ذو مغزى إحصائي (5.5% بالمقارنة مع 25.7%) جدول وشكل رقم (1).
[$\chi^2 = 8.81$ ، $P=0.003$ ، فاصلة الثقة للمستوى 95% (CI=0.03-0.64)
[OR=0.17

أما النمط الجيني AT وكذلك الحال AA فلم نجد اختلافات مهمة إحصائياً بين المجموعتين جدول وشكل رقم (1).
هذا وقد سجل الأليل T انخفاضاً مهماً إحصائياً أيضاً عند المرضى بالمقارنة مع الشواهد الأصحاء [35.2%، 48.55% على التوالي] ($\chi^2=4.46$ و $p=0.034$) فاصلة الثقة للمستوى 95% (CI=1-3 ، OR=1.7) الجدول والمخطط رقم (2) .

الشواهد		المرضى		
النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النمط الوراثي لل-IFN- γ
28.6	20	35.2	19	AA
45.7	32	59.3	32	AT
25.7	18	5.5	3	TT
100	70	100	54	المجموع

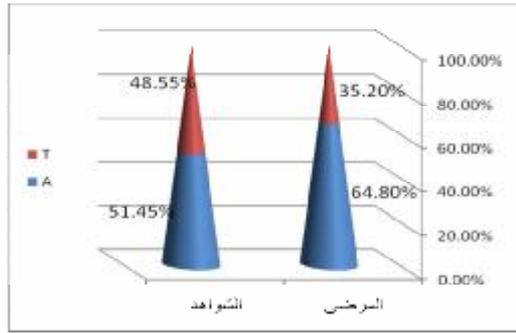
الجدول (1) يظهر توزيع الأنماط الوراثية لل-IFN- γ عند المرضى والشواهد



الشكل (1) مقارنة لتوزيع الأنماط الوراثية لل-IFN- γ بين المرضى والشواهد

الشواهد		المرضى		
النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	أليل ال-IFN- γ
51.45	72	64.8	70	A
48.55	68	35.2	38	T
100	140	100	108	المجموع

الجدول (2) يظهر توزيع أليل ال-IFN- γ بين المرضى والشواهد



الشكل (2) مقارنة توزيع أليل الـ IFN- γ بين المرضى والشواهد.

المناقشة : Discussion

على الرغم من التقدم الكبير الذي تم إحرازه منذ كشف طفيلي الليشمانية من قبل العالمين (Charles Donovan و William Leishman) سنة 1903 (1) حتى الآن، ما يزال الغموض يلف الجانب الأكبر من الأمراض والتهابات المناعية في الليشمانية. من المعروف أنه ثلاثة عناصر رئيسية تحكم التفاعل بين الطفيلي والثوي: الأرضية الجينية للثوي، والاستجابة المناعية، وكذلك القدرة الممرضة للطفيلي (14،13). أجريت كثير من الدراسات عن تأثير السلالات الطفيلية في حين قلة درست العوامل المتعلقة بالثوي.

حديثاً حددت مناطق صبغية مختلفة على الصبغيات 2،13،15،19 تتدخل في الاستعداد للإصابة بالليشمانية بأشكالها السريرية المختلفة. وقد أشارت هذه الدراسات أن مواقع جينية متعددة تضبط (تتحكم) أيضاً بهذه الاستجابة المناعية (15-18). آخذين بالحسبان الفيزيولوجية المرضية لخمج الليشمانية، يبدو أن الاستعداد (القابلية) للإصابة يعتمد-إلى حد ما-على الآلية المبكرة التي تتدخل بالتفاعل بين البالعات والطفيلي، وانطلاقاً من أن سيتوكينات الـ Th1 تؤثر في هذه المرحلة كونها تفعل البلعمة phagocytosis، ومن ثم تؤثر في الاستجابة المناعية لطفيلي الليشمانية، فإنه

وبلا شك جينات هذه السيتوكينات هي المرشحة بتأثيرها في الليشمانية بما في ذلك تظاهراتها السريرية المختلفة.

مؤخراً أكدت الدراسات في أهمية الـIFN- γ في المناعة، كما أكدت ارتباط التعدد الشكلي في الجينة في الموقع +874 من تايمين T إلى أدنين A مع الأخماج الشديدة كالتهاب الكبد B (19)، والتدرن (20)، وأيضاً مع الخبائثات (21). هذا وقد أثبت الدور الوافي للـIFN- γ في المناعة ضد الليشمانية في تجارب على الفئران أيضاً (22-25)، والأهم من ذلك هو الارتباط القوي بين التعدد الشكلي للمستقبل الأول للانترفيرون غاما (IFNGR1) polymorphism Interferon gamma receptor 1 والإصابة بالليشمانية الجلدية التالية للكلاً أذار (26).

هذا وقد أظهرت دراستنا بأن تواتر الأليل T وكذلك النمط الجيني (الوراثي) TT للـ -IFN γ في الموقع +874 من A إلى T أعلى في مجموعة الشاهد منه عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة (P=0.034 بالنسبة إلى الأليل T، P=0.003 للنمط الجيني TT)، بينما لم نجد مثل هذا الفرق بالنسبة إلى النمط الجيني AT وAA، وإذا أخذنا بالحسبان أن الطفرة في الموقع ذاته تؤثر مباشرة على مستوى الـIFN- γ ، وبالفعل إن وجود الأليل T يعدُّ مشعراً قوياً ودون شك على الإنتاج العالي لهذا السيتوكين (10) فإن كل هذا يتماشى مع نتائج دراستنا.

وبالتالي فإن النتائج التي توصلنا إليها تجعلنا نفترض أن نزعة (ميل) شخص ليطور إصابة مزمنة بالليشمانية الجلدية ترتبط وبشكل جزئي بقدرته على إنتاج الـIFN- γ الذي يتحدد بالنمط الجيني IFN- γ +874 A→T polymorphism.

وبالخلاصة نقترح هذه النتائج أن التعدد الشكلي في الانترون الأول من جينة الانترفيرون غاما قد يؤثر في تطور مرض الليشمانية الجلدية باتجاه الإزمان. ومع ذلك وبسبب صغر حجم العينة في دراستنا يفضل إجراء دراسات مماثلة تشمل استقصاءات أخرى و أعداداً أكبر من العينات.

References

- 1- www.who.int/entity/leishmaniasis "Leishmaniasis: background information". Retrieved on 2007-07-04.
- 2- Desjeux P. Global control and Leishmania HIV co-infection. *Clinics in Dermatology* 17(3) (1999), 317-325
- 3- Ministry of health ,Damascus ,Syrian Arabic republic .reports 2005
- 4- Alexander J and Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters* 2005; 99:17-23.
- 5- Caceres-Dittmar G, Tapia FG, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL. Determination of cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993;91:500-5.
- 6- Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valenci-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994;62:837-42.
- 7- Heinzel FP, Rerko RM. Cure of progressive murine leishmaniasis: interleukin-4 dominance is abolished by transient CD4(+) T cell depletion and T helper cell type 1-selective cytokine therapy. *J Exp Med* 1999;189:1895-906.
- 8- Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 1999;189:741-6.
- 9- Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape JR .Polymorphic structure of tumor necrosis factor (TNF) locus: an NCOI polymorphism in the first intron of the human TNF- β production. *J Exp Med* 1991;173:209-19.
- 10- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee J-H, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum Immunol* 2000;61:863-6.
- 11- Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M, et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995;25(Suppl):74-8.
- 12- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353
- 13- Blackwell JM. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology* 112 (1996) Suppl., 67-74.
- 14- Gangneux JP, Sulahian A, Honore S, Meneceur P, Derouin F, and Garin YJ. Evidence for determining parasitic factors in addition to host genetics and immune status in the outcome of murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2000; 22:515-9.
- 15- Bucheton B, Abel L, El Safi S et al. A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. *Am J Hum Genet* 2003; 73:1052-60.
- 16- Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun* 2006; 8:84-90.

- 17- Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genome-wide scan. *J Infect Dis* 2007; 196:1261-9.
- 18- Miller EN, Fadl M, Mohamed HS et al. Y Chromosome Lineage- and Village-Specific Genes on Chromosomes 1p22 and 6q27 Control Visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Genet* 2007; 3:e71.
- 19- Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, et al. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2003;98:144-5.
- 20- Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, et al. Genotype frequencies of the +874 T-A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- γ gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet* 2002;29:371-4.
- 21- Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-a and TNF-b) and gamma interferon (IFN- γ) among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett* 2005;223:113-9.
- 22- Launois P, Gumy A, Himmerlich H, Locksley RM, Roc`ken M, Louis JA. Rapid IL-4 productions by *Leishmania* homolog of mammalian RACK-1 reactive CD4 T cells in resistant mice treated once with anti- IL-12 or IFN- γ antibodies at the onset of infection with *Leishmania major* instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. *J Immunol* 2002;168:4628-35.
- 23- Scott P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991;147:3149-55.
- 24- Swihart K, Fruth U, Messmer N, Hug K, Behin R, Huang S, et al. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J Exp Med* 1995;181:961-71.
- 25- Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1994;179:1367-71.
- 26- Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, Peacock CS, Khalil EA, Cordell HJ, et al. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in Sudan: linkage and association with IL-4 and IFNGR1. *Genes Immun* 2003;4:351-5.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: 2009/7/26.

تاريخ قبوله للنشر: 2010/2/21.