● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔپانزدهم، شمارهٔ ۴، ص۲۹۴-۲۸۳، ۱۳۸۷

مقالهٔ پژوهشی

اثر آلژینات *Pseudomonas aeroginosa* و پروتئین ایمونومدولاتور سیر بر اپسونوفاگوسیتوز در مدل موشی

دکتر طوبی غضنفری[۱]، شادآفرین هنرمندیان[۲]، دکتر احیا عبدی‌عالی[۳*]، مروارید شفیعی[۲]، دکتر خسرو خواجه[۴]

خلاصه

مقدمه: ترکیب غیر طبیعی ترشحات راه‌های هوایی در بیماران فیبروز سیستیک (CF)، به کلونیزاسیون مزمن پاتوژن‌ها از جمله *Pseudomonas aeruginosa* در این مکان،کمک مؤثری می‌کند. مورفوتایپ موکوئیدی *P.aeruginosa* از تولید مقدار زیادی اگزوپلی‌ساکارید که اطراف سلول را در بر می‌گیرد، ناشی می‌شود که غالباً از آن به عنوان آلژینات یاد می‌شود. این ساختار علاوه بر اختلال در پاکسازی ارگانیسم از ریه بیماران، باعث مخفی ماندن باکتری از فرایند فاگوسیتوز نیز می‌شود. آلژینات ضد فاگوسیتوز است و کشندگی اپتیمال این باکتری بواسطه فاگوسیتوز، به آنتی‌بادی‌های اپسونیک نیاز دارد. از طرفی اثرات ایمونومدولاتوری سیر طی مطالعات مختلفی از جمله اثر سیر بر تقویت فعالیت فاگوسیتوز به اثبات رسیده است. لذا در این مطالعه، تأثیر آلژینات و پروتئین ایمونومدولاتور سیر بر تولید آنتی‌بادی‌های اپسونیک ضد اگزوپلی- ساکارید *P.aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت.

روش: برای استخراج آلژینات، از کشت۷۲ ساعته سویه موکوئیدی *P.aeruginosa* 8821M استفاده شد. سپس آلژینات تحت تأثیر آنزیم‌های RNase A, DNase ۱ و Proteinase K قرار گرفت و در نهایت توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفاکریل S_{400} تخلیص گردید. موش‌های ماده BALB/c حدود ۶ تا ۸ هفته در گروه‌های ۵ تایی، طی روزهای ۰، ۷ و ۱۴ تحت تزریق مقدار مشخصی سیر، آلژینات و ترکیب توأم سیر - آلژینات و در عین حال، فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) و ترکیب آلژینات-R10 قرار گرفتند. سپس سرم آنها برای سنجش فعالیت کشندگی اپسونوفاگوسیتیک جدا شد.

یافته‌ها: آلژینات تخلیص شده از *P.aeruginosa* حاوی ۳۴/۶ µg/ml یورونیک اسید و ۱/۴۵ µg/mlپروتئین، ۰/۵ µg/ml DNA و ۰/۰۸ µg/ml LPS بود. نتایج حاصل نشان‌دهنده فعالیت کشندگی اپسونوفاگوسیتیک سرم بعد از ایمن‌سازی موش با فراکشن ایمونومدولاتوری سیر به میزان ۶۹٪ و آلژینات به میزان ۶۷ ٪ و نیز مخلوط این دو به میزان ۸۲٪ بود که افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل حاکی از آن است که فراکشن ایمونومدولاتوری سیر نسبت به عصاره سیر که مخلوطی از ترکیبات و فراکشن‌های متفاوت می‌باشد، قادر خواهد بود در همراهی با آلژینات خالص شده از سویه موکوئیدی *P.aeruginosa*، ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی (موش BALB/c)، با القای آنتی‌بادی‌های کشندهٔ اپسونیک افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: *P.aeruginosa*، آلژینات، فاگوسیتوز

۱-دانشیار ایمونولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد ۲-کارشناس ارشد میکروبیولوژی ۳-استادیار میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س) ٤-استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران ● **آدرس پست الکترونیک :** abdialya@alzahra.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸٦/۷/۱٦ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸٦/۱۱/۲۸ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۷/۱/۲۲

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

مهم‌ترین مشکل بالینی بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک (CF)، عفونت مزمن ناشی از *P.aeruginosa* در راه هوایی و پاسخ التهابی همراه آن است. التهاب حاصل از این عفونت باعث تخریب و از بین رفتن فعالیت بافتی می‌شود. سویه‌هایی از *P.aeruginosa* که از افراد مبتلا به CF جدا شده‌اند، اغلب دارای یک فنوتیپ موکوئیدی‌اند که ناشی از تولید مقدار زیادی اگزوپلی‌ساکارید است. اگزوپلی‌ساکارید *P.aeruginosa* که غالباً از آن به عنوان آلژینات یاد می‌شود و اگزوپلی‌ساکارید موکوئیدی (Mucoid Exopolysacharide: MEP) نیز نامیده شده است، پلیمری استیله متشکل از واحدهای تکراری و تصادفی D- مانورونیک اسید و L- گلورونیک اسید می‌باشد (۳-۱).

اعتقاد بر این است که آلژینات فاکتور کلیدی بیماری‌زایی در عفونت‌های مزمن ریوی بیماران مبتلا به CF است چرا که به دلیل خواص آنتی‌فاگوسیتیک از جمله تداخل در مکانیسم‌های اپسونیزاسیون سلول‌های فاگوسیت سیستم ایمنی بدن میزبان و نیز به دلیل ماهیت پلی‌ساکاریدی‌اش در انسان که ایمونوژن ضعیفی است، از پاکسازی ریه جلوگیری می‌کند. علاوه بر محدودیت پاکسازی ریوی *P.aeruginosa* در بیماران CF، این ارگانیسم می‌تواند خود را از فاگوسیتوز نیز مخفی نگه دارد. مطالعات نشان می‌دهد که MEP،ضد فاگوسیتوز است و کشندگی اپتیمال این باکتری به واسطهٔ فاگوسیتوز، به آنتی‌بادی‌های اپسونیک نیاز دارد. از طرفی تشکیل انواع میکروکلنی‌های مقاوم و بیوفیلم در راستای شرایط ویژه موجود در ریه بیماران CF، با بلوکه کردن راه هوایی در طول بیماری، مانع عملکرد طبیعی ریه می‌شود (۵-۳).

در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در مورد آثار مختلف ترکیبات سیر در درمان انواع بیماری‌ها به عمل آمده است و از جمله خواص شناخته شدهٔ آن، خواص ضد باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی و اثر آن در کاهش چربی خون، مهار تجمع پلاکت‌ها، خاصیت آنتی‌اکسیدان و غیره می‌باشد. تأثیر سیر بر پاسخ‌های مختلف سیستم ایمنی، تنها در چند سال اخیر مطرح شده و تحقیقاتی در این باره آغاز گردیده است. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که سیر حاوی ترکیبات ایمونومدولاتوری است که به صورت وابسته به دوز قادرند بر این پاسخ‌ها تأثیر بگذارند (۸-۶).

همان‌طور که گفته شد، آلژینات در انسان ایمونوژن ضعیفی است. بنابر این به تنهایی نمی‌تواند برای ایمن‌سازی مبتلایان به عفونت‌های مزمن بکار رود. مطالعات مختلف نشان داده است که برای افزایش ایمنی‌زایی می‌توان از ترکیبات پروتئینی هم‌زمان با آلژینات استفاده کرد (۹،۱۰).

Pier و همکاران (۲۰۰۳) اثبات کردند که کونژوگاسیون آلژینات به KLH قادر به القای میزان بیشتری تیتر IgG بوده که چنین آنتی‌بادی‌هایی اپسونیزان می‌باشند. البته همان‌طوری که اشاره شد نحوه تخلیص و به کارگیری آلژینات در ایمنی‌زایی آن تأثیر به سزایی دارد (۱۰).

در سال ۲۰۰۶ کاشف و همکاران واکسن کونژوگه‌ای بر اساس آلژینات با وزن ملکولی بالا و توکسوئید کزاز تولید کردند (۹) البته با این که توکسوئید تتانوس در تهیه واکسن‌های انسانی کاربرد دارد، اما به دلیل مصرف مکرر در واکسن‌های دیگر، ممکن است باعث تحریک بیش از حد سیستم ایمنی افراد شده و در نتیجه واکنش‌های جانبی و ناسازگاری را در جمعیت هدف ایجاد کند (۹).

شایان ذکر است که واکسن‌های نوترکیب بسیاری نیز علیه *P.aeruginosa* تولید شده‌اند اما این چنین واکسن‌هایی به دلیل تفاوت اسیلاسیون و گلیکوزیلاسیون بین باکتری، E.coli و *P.aeruginosa*، ایمنی‌زایی خوبی در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد نمی‌کردند (۱۱).

با توجه به ویژگی‌های عصاره سیر و فراکشن ایمونومودولاتور سیر در مطالعه حاضر ایمنی‌زایی آلژینات-عصاره سیر و نیز ایمنی‌زایی آلژینات- R10 با

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتوز آنتی‌بادی‌های اپسونین القاء شده در سرم موش‌های مورد آزمایش، بررسی شد.

روش بررسی

الف) جداسازی و تخلیص آلژینات

در این تحقیق آلژینات از سویه موکوئیدی *Pseudomonas aeruginosa* 8821M تخلیص شد. پس از کشت سویه موکوئیدی درمحیط تغییر یافته Mian`s، باکتری‌ها توسط سانتریفوژ با دور بالا (17000g، به مدت ۳۰ دقیقه) از مایع رویی جدا شدند و آلژینات توسط اتانول سرد (۸۰٪) رسوب و پس از دیالیز، لایوفیلیزه گردید. آلژینات جداسازی شده در PBS حل شد و به آن آنزیم‌های RNase A و DNase I اضافه شد (100µg/ml). پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$، آنزیم Proteinase K (100µg/ml) به آن اضافه و در دمای $56^{\circ}C$ به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس با فنل 96° به نسبت ۱:۱ تیمار گردید و مجدداً با آب دیونیزه دیالیز و سپس لایوفیلیزه گردید. در نهایت بعد از حل کردن در کلرورآمونیوم (۰/۰۳gr/ml) بر روی ستون کروماتوگرافی با ژل سفاکریل S_{400} (1cm- 70 cm) قرار داده شد.

فراکشن‌های به دست آمده برای بررسی میزان یورونیک اسید سنجش شدند و فراکشن‌های مثبت که زودتر از ستون خارج شده بودند جمع‌آوری و یکی شدند (۱۰). برای سنجش میزان یورونیک اسید از روش پلیت میکروتیتراستفاده شد. به این ترتیب که ۸ رقت از اسید آلژنیک جدا شده از جلبک Laminaria hyperborean به عنوان استاندارد در PBS تهیه شد. برای تهیه محلول A ۹/۵۶gr/l دی‌سدیم‌بورات‌دکاهیدرات در اسید سولفوریک ۹۶٪ حل شد و برای تهیه محلول B، ۰/۴۸ gr/l کاربازول در محلول A حل گردید. سپس ۱۵۰µl از محلول B به هر خانه از پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه‌ای وارد و مهر و موم شد و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۳۰µl از هر رقت استاندارد به ۸ چاهک ردیف A پلیت در حالی که پلیت روی یخ خشک قرار داشت اضافه شد و با دستگاه هم‌زن به مدت ۱۵ دقیقه یکنواخت و سپس در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه نگهداری شد. در نهایت جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد.

میزان پروتئین نمونه توسط روش Bradford با BSA به عنوان استاندارد، میزان DNA با جذب در طول موج، ۲۶۰nm و میزان LPS آن با روش LAL (Limulus amebocyte lysate assay) که در آن نیز آندوتوکسین باکتری Ecoli $O_{113}:H_{10}$ به عنوان استاندارد در نظر گرفته شده بود، سنجش گردید (۹،۱۰).

ب) تهیه عصاره سیر :

سیر تازه منطقه همدان، پس از جدا کردن پوست خرد شد و پس از مخلوط کردن با آب مقطر، تفاله‌های آن جدا گردید و میزان پروتئین آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV طبق فرمول زیر اندازه‌گیری شد (۶،۷):

(غلظت پروتئین(mg/ml)=۱/۵۵(جذب در ۲۸۰نانومتر)+۰/۷۷(جذب در ۲۶۰نانومتر)

ج) تهیه فراکشن ایمونومدولاتور سیر(R10):

در این روش، ابتدا عصاره سیر در مجاورت غشاهای ۵۰xm، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۳۰،۱۰pm اولترافیلتر شد. در نهایت اولترافیلتر R10 تولید شده، با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی با سفادکس G75 جداسازی و تخلیص شد الکتروفورز با به کارگیری ژل اکریل‌امید ۱۰٪ انجام گردید (۸).

د) ایمن‌سازی موش‌ها:

موش‌های ماده BALB /c، ۸-۶ هفته، که از مؤسسه تحقیقاتی پاستور خریداری شده بودند در گروه‌های ۵تایی، به صورت زیرپوستی تحت ۳ بار تزریق با دوزهای مختلفی از آلژینات، عصاره سیر مخلوط آلژینات - سیر و نیز R10 و آلژینات -R10 (۶،۷) در روزهای ۰، ۷و۱۴ قرار گرفتند (۶،۷).

Archive of SID

www.SID.ir

ه) سنجش اپسونوفاگوسیتک:

برای سنجش فعالیت Opsonophagocytic killing سرم موش‌های ایمن شده، ابتدا۱۰۰µl سرم موش ۱:۲ رقیق شده از هر گروه موش که فعالیت کملپمان آن در دمای ۵۶ ˚C به مدت ۳۰ دقیقه از بین رفته است همراه ۱۰۰µl از ماکروفاژهای موش ایمن نشده که در هر میلی‌لیتر آن ۲×۱۰^{۷} ماکروفاژ وجود داشته باشد در لوله‌های میکروفیوژاستریل ریخته شد و سپس ۱۰۰µl از محلول ۵٪ کملپمان خرگوش در سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید و در نهایت ۱۰۰µl از سویه موکوئیدی *P.aeruginosa* 8821 M دارای ۲×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر به لوله‌های میکروفیوژ استریل اضافه شد. هم‌چنین لوله کنترلی که فاقد سرم نمونه بوده و به‌جای آن ۱۰۰µl سرم فیزیولوژی یا ۱۰۰µl محیط RPMI با ۱۵٪ سرم جنین گاوی غیر فعال شده توسط حرارت، جایگزین شده بود، در نظر گرفته شد.

سپس لوله‌ها روی دستگاه هم‌زن به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷˚C انکوبه شدند. بعد از طی دوره انکوباسیون، ۲۵µl از ترکیبات فوق برداشته شد و در حجم ۱۰۰ برابر در سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد. جهت شمارش باکتری‌ها، از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط تریپتیکازسوی‌آگار (TSA) کشت یکنواختی تهیه شد و در ۳۷ ˚C به مدت یک شب انکوبه گردید. پس از شمارش کلنی‌های موکوئیدی باکتری، درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۲،۱۳):

Percent Kill= 100× (CFU Surviving after 90' in normal mouse serum – CFU Surviving in immune serum)/ (CFU Surviving in normal mouse serum)

که در آن CFU (Colony forming units) بیانگر تعداد سلول‌های زنده در میلی‌لیتر محیط مایع می‌باشد که معیار آن تشکیل کلنی در محیط جامد است.

جهت به‌دست آوردن ماکروفاژهای موشی، بهترین محل، صفاق می‌باشد. به این ترتیب پس از بیهوش کردن ۴-۳ موش BALB/c ۸-۶ هفته‌ای باکلروفرم، پوست شکم آنها با رعایت کامل شرایط استریل بدون این که به پردهٔ صفاق آسیبی برسد باز شد و جهت کندن ماکروفاژهای صفاقی ۳-۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سرد به پردهٔ صفاق تزریق و سپس جمع‌آوری گردید. ماکروفاژهای صفاقی توسط سانتریفوژ با دور ×1500g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴˚C رسوب داده شد و با محیط RPMI شسته و مجدداً سانتریفوژ گردید. به رسوب حاصل ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI غنی شده با FBS به نسبت ۹:۱ اضافه و یکنواخت گردید و سپس سلول‌های موجود در سوسپانسیون به‌دست آمده توسط لام نئوبارشمارش شد. (باید توجه داشت که حدود ۷۰-۶۰ درصد سلول‌های مشاهده شده زیر میکروسکوپ، ماکروفاژ هستند که باید در شمارش لحاظ شوند). با تغییر در غلظت سوسپانسیون می‌توان سوسپانسیونی با تعداد سلول ۲×۱۰^{۷} در هر میلی‌لیتر تهیه کرد.

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از برنامه نرم افزاری Microsoft Excel 2000 استفاده گردید. به‌وسیله این نرم‌افزار درصد کشندگی اپسونیک نمونه‌ها توسط آنالیز t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪ سنجیده و با گروه کنترل مقایسه شد.

نتایج

جداول ۱ و ۲ میزان دوزهای تزریقی برای ایمن‌سازی را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. آلژینات تخلیص شده از *P.aeruginosa* حاوی ۳۴/۶g/ml یورونیک اسید و۱/۴۵µg/mlپروتئین، ۰/۵µg/ml DNA و۰/۰۸µg/ml LPS بود (جدول۳).

عصاره سیر حاوی ۷۰ mg/ml پروتئین بود.

نتایج حاصل از فعالیت اپسونوفاگوسیتیک عصاره سیر، آلژینات و مخلوط عصاره سیر – آلژینات نشان داد که کمترین CFU نسبت به گروه کنترل، به ترتیب متعلق به گروه‌های سیر، آلژینات و سپس مخلوط سیر-آلژینات می‌باشد. کاهش CFU نشان‌دهنده افزایش فعالیت اپسونوفاگوسیتیک در این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل و نیز سایر گروه‌ها است (نمودار۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: *دوزهای تزریق شده سیر، آلژینات و مخلوط سیر –آلژینات*

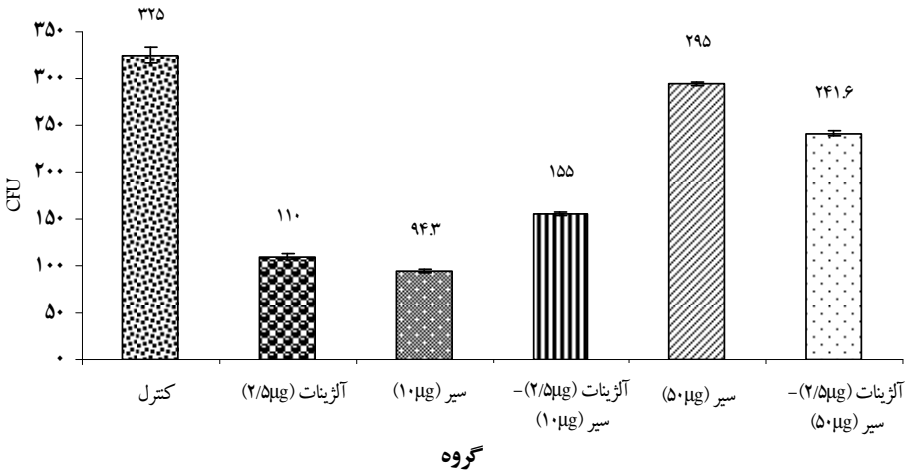
گروه / دوز	آلژینات (µg/mouse)	عصاره سیر (µg/mouse)
کنترل (PBS)	–	–
آلژینات	۲/۵	–
عصاره سیر	–	۱۰
آلژینات – عصاره سیر	۲/۵	۱۰
عصاره سیر با غلظت بیشتر	–	۵۰
آلژینات–عصاره سیر با غلظت بیشتر	۲/۵	۵۰

جدول ۲: *دوزهای تزریق شده R_{10}، آلژینات و مخلوط R_{10}–آلژینات*

گروه / دوز	آلژینات (µg/mouse)	عصاره سیر (µg/mouse)
کنترل (PBS)	–	–
آلژینات	۳	–
R_{10}	–	۴
آلژینات – R_{10}	۳	۴
R_{10} با غلظت بیشتر	–	۴۰
آلژینات – R_{10} با غلظت بیشتر	۳	۴۰

جدول ۳. *مشخصات آلژینات به‌دست آمده*

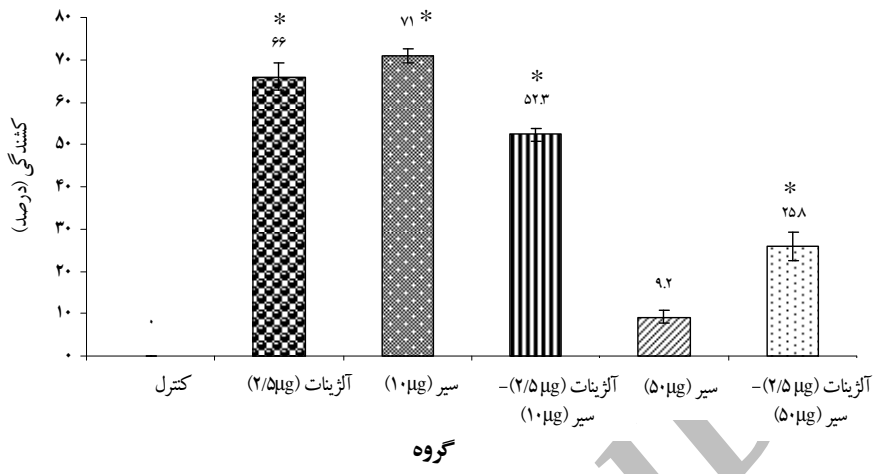
نام	میزان (میکروگرم در هر میلی‌لیتر)
یورونیک اسید	۳۴/۶
پروتئین	۱/۴۵
اسید نوکلئیک	۰/۵
لیپوپلی‌ساکارید	۰/۰۸



نمودار ۱: *میانگین فعالیت اپسونوفاگوسیتیک سرم موش‌های ایمن شده با عصاره سیر، آلژینات و مخلوط آلژینات و عصاره سیر بر کشندگی اپسونیک P.aeruginosa*

Archive of SID

www.SID.ir



***نمودار۲**: نتایج حاصل از مقایسه درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک گروهای آزمایشی با گروه کنترل*

$P<0.05$ *

بر اساس نتایج t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪ گروه‌های عصاره سیر(۷۱٪)، آلژینات (۶۶٪) و مخلوط سیر-آلژینات (۵۲/۳٪)، به ترتیب بیشترین درصد کشندگی معنی‌دار حاصل از اپسونوفاگوسیتوز را نشان دادند. این در حالی است که گروه ایمن شده با غلظت بیشتر عصاره سیر (۹/۲٪)، دارای کمترین درصد کشندگی بود (نمودار۲ و جدول۴).

بر اساس نتایج حاصل از فعالیت اپسونوفاگوسیتیک فراکشن ایمونومدولاتوری سیر (R_{10})، آلژینات و مخلوط آلژینات-R_{10}، کمترین CFU به ترتیب متعلق به گروه‌های آلژینات-R10، آلژینات-R_{10} با غلظت بیشتر، R_{10} با غلظت بیشتر، R_{10} و سپس آلژینات می‌باشد. همراهی R_{10} با آلژینات در ایمن‌سازی گروه‌های فوق، افزایش فعالیت کشندگی اپسونوفاگوسیتیک را در گروه‌های آلژینات-R10 و آلژینات-R_{10} غلیظ، نسبت به گروه کنترل و نیز هر کدام را به تنهایی سبب شده است (نمودار۳).

بر اساس نتایج t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪، گروه‌های آلژینات-R10 (۸۲٪)، آلژیناتR_{10} - غلیظ (۷۷٪)، R_{10} غلیظ (۷۱٪)،R_{10} (۶۹٪) و سپس آلژینات (۶۷٪)، به ترتیب بیشترین درصد کشندگی معنی‌دار حاصل از اپسونوفاگوسیتوز را نشان دادند (نمودار۴ و جدول۵).

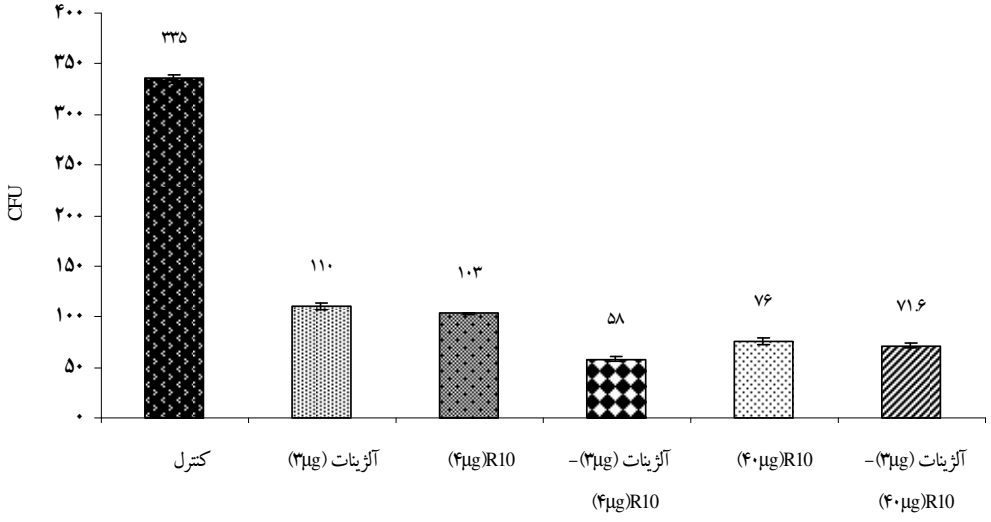
***جدول۴**: مقایسه درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک سویه موکوئیدی P. aeruginosa 8821 M به وسیله سرم موش‌های ایمن شده در گروه‌های مختلف*

گروه‌های مقایسه شده	آنالیز آماری t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪
کنترل-آلژینات	۰/۰۰۳*
کنترل-سیر	۰/۰۰۳*
کنترل-آلژینات سیر	۰/۰۰۶*
کنترل-سیر غلیظ	۰/۱۶
کنترل-آلژینات سیر غلیظ	/۰۲*

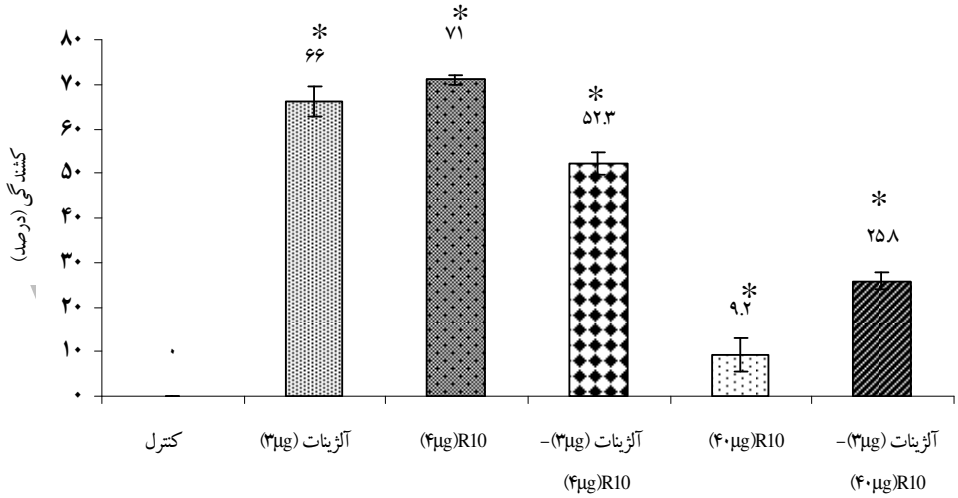
* افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ($P<0.05$)

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار۳. *میانگین فعالیت اپسونوفاگوسیتیک سرم موش‌های ایمن شده با فراکشن R10، آلژینات ومخلوط فراکشن R10 -آلژینات بر کشندگی اپسونوفاگوسیتیک P. aeruginosa*



نمودار۴. *نتایج حاصل از مقایسه درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک گروهای آزمایشی با گروه کنترل*

*$P<۰/۰۵$ **

www.SID.ir

جدول ۵: مقایسه درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک سویه موکوئیدی *P. aeruginosa 8821 M* به‌وسیله سرم موش‌های ایمن شده در گروه‌های مختلف

گروه‌های مقایسه شده	آنالیز آماری t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪*
آلژینات-کنترل	۰/۰۰۲
R_{10} - کنترل	۰/۰۰٤
R_{10} آلژینات- کنترل	۰/۰۰۱
غلیظ R_{10}- کنترل	۰/۰۰۰۸
غلیظ R_{10} آلژینات- کنترل	۰/۰۰۲

* افزایش معنی‌دار در همه گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل دیده می‌شود (P<۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت ریوی مزمن بزرگ‌ترین علت تخریب پیشرونده ریوی در بیماران مبتلا به فیبروزسیتیک (CF) است. عفونت ریوی حاصل از *P.aeruginosa* با آسیب شدید به سطوح اپی‌تلیال و سوراخ کردن راه هوایی عامل مهم کاهش فعالیت ریه در پاک‌سازی عفونت، مرگ سلول‌های مستعد و در نهایت مرگ بیماران مبتلا به CF است (۲،۳). بنابراین می‌توان *P.aeruginosa* را به عنوان پاتوژن غالب موجود در راه هوایی این بیماران، قلمداد کرد.یکی از مشخصات بارز این باکتری تمایل آن برای تبدیل به فنوتیپ موکوئیدی است که منجر به تولید مقدار زیادی اگزوپلی‌ساکاریدموکوئیدی (MEP) در اطراف سلول یا به اصطلاح آلژینات می‌گردد (۱۷-۱۴و۳).

آلژینات با تداخل در مکانیسم‌های اپسونیزاسیون و نیز ممانعت از روند فاگوسیتوز اپسونیک و غیر اپسونیک توسط ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها، سرکوب انفجار اکسیداسیون در سلول‌های فاگوسیتی و خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن، سرکوب فعالیت لنفویست‌ها و نیز تمایل به تشکیل میکروکلنی‌های مقاوم و بیوفیلم که در چسبندگی باکتری و سایر ارگانیسم‌ها نقش دارد، عامل مهم در بیماری‌زایی و ایجاد عفونت مزمن در بیماران CF است (۳،۱۸).

توانایی‌های فوق‌العاده زیاد *P.aeruginosa* در زمینه ایجاد مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معمولی مورد استفاده، ریشه‌کنی این باکتری را در بیماران CF با مشکل رو به رو کرده است. مطالعات انجام شده، وجود فعالیت کشندگی اپسونوفاگوسیتیک آنتی‌بادی تولید شده علیه اگزوپلی‌ساکارید موکوئیدی *P.aeruginosa* را در سرم خرگوش ایمن شده با MEP خالص در شرایط *in vitro* نشان داده‌اند. افزایش این نوع آنتی‌بادی‌های خرگوش علیه MEP خالص، منجربه تسهیل عمل کشندگی فاگوسیتیک، در حضور لوکوسیت‌های خون محیطی انسان و نیز سطح پایینی از سرم تازه انسانی به عنوان منبع کمپلمان گردید (۱۲،۱۹).

مطالعات نشان می‌دهد که حضور قبلی آنتی‌بادی‌های غیر اپسونیک علیه *P.aeruginosa* به دنبال ایمنی‌زایی با MEP، تولید آنتی‌بادی‌های کشنده اپسونیک علیه باکتری فوق را محدود می‌کند. این امر ایمنی‌زایی بیمارانی را که دارای تیتر بالای آنتی‌بادی‌های غیر اپسونیک هستند، با مشکل روبه رو می‌کند. به همین دلیل واکسیناسیون با MEP به تنهایی، باعث ایجاد یک پاسخ ضعیف ایمنی به دنبال تحریک کم تولید آنتی‌بادی‌های اپسونیک، می‌شود (۵).

از طرف دیگرMEP به تنهایی یک آنتی‌ژن غیره وابسته به T-cell است که خاطره ایمنی بر جای نمی‌گذارد. این در حالی است که استفاده از MEP

Archive of SID

www.SID.ir

همراه با یک پروتئین ایمونومدولاتور به صورت ترکیب توأم و به‌ویژه کونژوگه کردن، می‌تواند ایمنی‌زایی را نسبت به استفاده از MEP به تنهایی، افزایش دهد و این آنتی‌ژن را به آنتی‌ژن وابسته به T-cell تبدیل کرده و علاوه بر پاسخ ایمنی فعال‌تر، خاطره ایمنی نیز ایجاد نماید (۲۱- ۱۹و۱۳).

نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که عصاره سیر و فراکشن ایمونومدولاتوری آن (R_{10}) باعث افزایش ازدیاد حساسیت تأخیری، تکثیر لنفوسیت‌های T، فعالیت سلول‌های NK و نیز تقویت پاسخ‌های Th_1 که در ایجاد ایمنی سلولی نقش دارد، می‌گردد که بیانگر وجود ترکیبات ایمونومدولاتور در سیر می‌باشد (۶،۷).

در مطالعه حاضر مخلوط عصاره سیر به همراه آلژینات نتوانست ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی افزایش دهد. به نظر می‌رسد که ترکیبات سولفیدریل و تیول که در سیر به فراوانی یافت می‌شوند به گونه‌ای با گروه‌های هیدروکسیل آزاد و یا حتی گروه‌های استیله مانورونیک اسید که اپی‌توپ‌های (epitope) اصلی آلژینات محسوب می‌شوند واکنش داده و اثرات آن را تا حدودی از بین برده‌اند و با افزایش غلظت سیر، با این که گروه‌های تیول و سولفیدریل توانسته‌اند بر اپی‌توپ‌های آلژینات غلبه یابند، اما ترکیب میتوژن و لکتین مانند سیر تا حدودی توانسته است، باعث تحریک سیستم ایمنی شود (۳و۸-۶).

فراکشن R_{10} نیز در غلظت بالا نتوانست ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی افزایش دهد،که به نظر می‌رسد در غلظت بالای R_{10} و آلژینات، سیستم ایمنی با پدیده تولرانس مواجه گردیده است. تولرانس طی دو حالت ممکن است رخ دهد:

۱- تلقیح آنتی‌ژن به حیواناتی که از لحاظ ایمونولوژیکی نابالغ هستند.

۲- تلقیح مکرر دوزهای بالا از آنتی‌ژن و یا دوزهای پایینی که پایین‌تر از حد آستانه تحریک پاسخ ایمنی باشند.

در این مطالعه، موش‌های ماده BALB/C که تحت تزریق قرار گرفته بودند در سنین ۶ تا ۸ هفته بوده و از لحاظ ایمونولوژیکی نیز به بلوغ رسیده بودند و از سویی دیگر، از آن جایی که غلظت پایین فراکشن پروتئینی نیز به همراه آلژینات، باعث تحریک سیستم ایمنی شده است، لذا به نظر می‌رسد که غلظت بیشتر R_{10} به همراه آلژینات باعث پدیده تحمل گردیده است (۸-۵).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر حاکی از آن است که فراکشن ایمونومدولاتوری سیر (R_{10}) نسبت به عصاره سیر که مخلوطی از ترکیبات و فراکشن‌های متفاوت است، قادر خواهد بود در همراهی با آلژینات خالص شده از سویه موکوئیدی *P.aeruginosa*، ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی (موش BALB/c)، با القای آنتی‌بادی‌های کشندهٔ اپسونیک که اپی‌توپ‌های آن، گروه‌های O استیله موجود بر روی MEP می‌باشد و عمدتاً از کلاس IgG هستند (۲۱)، افزایش دهد. پیش‌بینی می‌گردد که کونژوگه کردن آلژینات با فراکشن ایمونومدولاتوری سیر (R_{10}) بتواند باعث افزایش ایمنی‌زایی علیه اگزوپلی‌ساکارید موکوئیدی *P.aeruginosa* به‌خصوص در بیماران فیبروزسیستیک، حتی در حضور آنتی‌بادی‌های غیر اپسونیزان، گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر کاشف و سرکار خانم دکتر یارایی و جناب آقای پروفسور Pier و نیز پرسنل بخش بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس و بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد در اجرای این تحقیق تشکر می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

The Effect of Combination of *Pseudomonas aeruginosa* Alginate and an Immunomodulator Protein of Garlic on Opsonophagocytosis in Murine Model

Ghazanfari T., Ph.D.[1], Honarmandian Sh., M.Sc.[2], Abdiali A., Ph.D.[3]*, Shafiei M., M.Sc.[2], Khajeh Kh., Ph.D.[4]

1. Associate Professor of Medical Immunology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Master of Science in Microbiology
3. Assistant Professor of Microbiology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor of Biochemistry, School of Basic Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

* Corresponding author, e-mail: abdialya@alzahra.ac.ir

(Received 7 Oct. 2007 Accepted 10 April 2008)

Abstract

Background & Aims: Chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis is predominantly due to infection by mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mucoid *P. aeruginosa* is due to the production of exopolysaccharide called also alginate. Alginate in addition to interference with the clearance of lung has antiphagocytic property. Optimal killing activity of *P. aeruginosa* requires opsonic antibodies. Since immunomodulatory effects of garlic on enhancing phagocytic activity has been proved, in this study the effect of combination of alginate and an immunomodulator protein of garlic on production of opsonic antibodies against *P. aeruginosa* mucoid exopolysaccharide has been investigated.

Methods: Alginate was extracted from a 72-hour culture of *P. aeruginosa* strain 8821M and then DNase1, RNaseA and Proteinase k were added. Subsequently, alginate was purified with gel filtration chromatography by sephacryl S-400. Female BALB/c mice aged 6-8 weeks were divided into five groups and injected subcutaneously on days 0,7,14 with either alginate, garlic, alginate- garlic, R10 or alginate-R10 and opsonophagocytic killing activity was calculated in each group.

Results: The purified alginate contained 34.6µg/ml uronic acid, 0.5 µg/ml nucleic acid, 1.45 µg/ml protein and 0.08µg/ml LPS. Opsonophagocytic killing activity after immunization with R10, alginate and their combination showed significant increases of respectively 69%, 67% and 82% comparing to the control group.

Conclusion: Combination of *P.aeruginosa* alginate and immunomodulator fraction of garlic enhances immunogenicity to *P.aeroginosa* by the elicitation of opsonic antibodies in BALB/c mice.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Alginate, Garlic, Phagocytosis

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2008; 15(4): 283-294

References

1. Doggett RG, Harrison GM, Wallis ES. Comparison of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in persons with and without cyctic fibrosis. *J Bacteriol* 1964; 87(2): 427–31.
2. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Cinl Microbiol Rev* 2002; 15(2): 194–222.
3. Govan JR, Deretic V. Microbial Pathogenesis in cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60(3): 539–74.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Cryz SJ, Furer E, Que JU. Synthesis and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* alginate-toxin A conjugate vaccine. *Infect Immun* 1991; 59(1): 45-50.

5. Pier GB. Desjardin D, Grout M, Garner C, Bennet SE, Pekoe G. Human immune response to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide vaccine. *Infect immun* 1994; 62(9): 3972-9.

6. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebrahimi M. Immmunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. *Int Immunopharmacol* 2002; 2(11): 1541-9.

7. Ghazanfari T, Hassan ZM, Khamesipour A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (Allium sativum) treatment. *J Ethnopharmacol* 2006; 103(3): 333-7.

8. Hassan ZM, Yaraee R, Zare N, Ghazanfari T, Sarrafnejad AH, Nazori B. Immunomodulatory affect of R10 fraction of garlic extract on natural killer activity. *Int Immunopharmacol* 2003; 3(10-11): 1483-9.

9. Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najar-Peerayeh S, Mousavi-Hosseini K, Moazzeni M, Djavid GE. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. *J Med Microbiol* 2006; 55(pt 10): 1441-6.

10. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Liosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccarid-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun* 2003; 71(7): 3875-84.

11. Staczek j, Gilleland LB, Van der Heyde HC, Gilleland HE. DNA vaccines against chronic lung infections by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 37(2-3): 147-53.

12. Ames P, DesJardins D, Pier GB. Opsonophagocytic killing activity of rabbit antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide. *Infect Immun* 1985; 49(2): 281-5.

13. Garner CV, DesJardins D, Pier GB. Immunogenic properties of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide. *Infect Immun* 1990; 58(6): 1835-42.

14. Ramphal R, Pier GB. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exoplysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infect Immun* 1985; 47(1): 1-4.

15. Van Heeckeren AM, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Response to acute lung hnfection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis mice. Am J Respir Crit Care Med *2006;*173(3): 288-96.

16. Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2006. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(8): 754-7.

17. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiol*ogy 2007; 153(pt 4): 917-23.

18. Pier GB, Matthews WJ, Eardley DD. Immunochemical characterization of the mucoid exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect* Dis 1983; 147(3): 494-503.

19. Pier GB, Saunders JM, Ames P, Edwards MS, Auerbach H, Goldfarb J, et al. Opsonophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in older noncolonized patients with cystic fibrosis. *New Eng J Med* 1987; 317(13): 793-8.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Lang AB, Rudeberg A, Schoni MH, Que JU. Vaccination of cystic fibrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa* reduces the proportion of patients infected and delays time to infection. *Pediatr Infect Dis* 2004; 23(6): 504-10.

21. Pier GB, Coleman F, Grout M, Franklin M, Ohman DE. Role of alginate O-acetylation in the resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 2001; 69(3): 1895-901.

Archive of SID

www.SID.ir