مقایسه اثر حفاظتی واکسیناسیون مایکوباکتریوم بویس (BCG) به روش مخاطی و زیرجلدی علیه عفونت لیشمانیا ماژور در موش حساس BALB/c

سارا صعودی .M.Sc[1]، احمد زواران حسینی .Ph.D[1,*]، سیما رافتی .Ph.D[2]، رضا هاشمی فشارکی .Ph.D[3]، کسری اسماعیل‌نیا .Ph.D[3]
سید محمود هاشمی .M.Sc[1]

۱. دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده پزشکی ، گروه ایمنی شناسی
۲. انستیتو پاستور ایران، گروه ایمنی شناسی
۳. موسسه واکسن و سرم سازی رازی، گروه تک یاخته شناسی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی
پست الکترونیک: Email: zavarana@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۷/۱۶، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۱/۳

هدف: بررسی اثر حفاظتی واکسیناسیون مخاطی مایکوباکتریوم بویس (BCG) با واکسیناسیون زیر جلدی علیه عفونت لیشمانیا ماژوردر موش BALB/c

مواد و روش‌ها: موش‌های نر BALB/c، شش تا هشت هفته به دو گروه بیست تایی آزمایش و چهار گروه بیست تایی کنترل تقسیم و واکسینه شدند. دو گروه بیست تایی آزمایش با واکسن BCG در دوزهای مناسب از مسیررکتال و زیرجلدی واکسینه شدند. یک ماه بعد به گروه‌های آزمایش واکسن ALM+alum به شکل زیرجلدی تزریق شد. پس از تزریق یادآور (بیست و یک روز بعد) موش‌ها باتزریق 10^5 انگل لیشمانیا ماژور در ناحیه کف پا آلوده شدند و روند پیش‌روی زخم به طور هفتگی بررسی شد. پاسخ‌های ایمونولوژیک شامل پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به (Purified Protein Derivatives: PPD)، پاسخ تکثیری سلول‌های طحال و تولید سایتوکاین اینترفرون گاما و اینترلوکین ۵ در مایع رویی کشت سلول‌های طحال گروه‌های آزمایش اندازه‌گیری شد. گروه‌های کنترل شامل گروه‌هایی بود که فقط واکسن ALM+alum یا فقط ادجوانت الوم را به شکل زیر جلدی دریافت کردند، بدون دریافت واکسن فقط با لیشمانیا آلوده‌سازی شدند یا هیچ تیماری درباره آنها صورت نگرفت و به عنوان کنترل محیط در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: تحریک سیستم ایمنی پس از واکسن BCG در هر دو گروه افزایش معنی‌دار ($p\leq0.05$)پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری و تولید اینترفرون گاما از سلول‌های طحال را نشان داد. تا سه هفته پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا این تحریک پاسخ ایمنی همچنان با افزایش ضریب تکثیر لنفوسیتی در هر دوگروه حفظ شد. اما پس از آن گروه‌های واکسن BCG نوسان زیادی را در پاسخ‌های ایمنی پشت سر گذاشتند که منجر به غلبه بیماری در گروه BCG زیرجلدی شد. مشخصه آن کاهش معنی‌دار اینترفرون گاما و کاهش ضریب تکثیر لنفوسیتی نسبت به گروه رکتال بود ($p\leq0.05$). افزایش انگل نیز به طور معنی‌دار نسبت به گروه رکتال در اعضای لنفی مشاهده شد. در مقابل گروه رکتال در روشی متفاوت توانست با حفظ و افزایش پاسخ‌های ضدلیشمانیایی مقاومت بالایی نشان دهد.

نتیجه‌گیری: واکسیناسیون BCG از راه رکتال می‌تواند نسبت به مسیر زیرجلدی پاسخ ایمنی سلولی پایدارتری ایجاد کند و با ممانعت از گسترش لیشمانیا ماژور سبب حفاظت علیه بیماری گردد.

کلیدواژگان: واکسیناسیون، لیشمانیا ماژور، BCG، رکتال، زیرجلدی، مخاطی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۲۴۵-۲۳۸

مقدمه

BCG به عنوان یک باکتری درون سلولی تضعیف شده می‌تواند مکانیسم‌های مرتبط با سیستم ایمنی Type I را به راه اندازد. پس از واکسیناسیون موفق BCG، طیف وسیعی از سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن فعال می‌شوند و قدرت تکثیر بالایی می‌یابند. سلول‌های $CD4^+T$ و $CD8^+T$ هر دو به شدت فعال می‌شوند و اینترلوکین۲ ترشح می‌کنند که به ترتیب سبب ترشح سایتوکاین‌های محرک ماکروفاژ، IFN-γ و حذف سلول‌های آلوده از بدن می‌شوند. BCG به شدت ایمنی هومورال را تحت تاثیر قرار می‌دهد و نسبت IgG2a به IgG1 را به نفع IgG2a بر هم می‌زند (۱).

نخستین بار در سال ۱۹۸۷، ناسی و همکارانش (۲) ایده اثر مثبت واکسیناسیون BCG را در پیشگیری از لیشمانیوز جلدی مطرح کردند. آنها به بررسی اثر حفاظتی مایکوباکتریوم بویس (BCG) بر عفونت لیشمانیاماژور در موش BALB/c و موش P/J پرداختند. بر اساس نتایج به دست آمده تزریق هم‌زمان اماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و BCG زنده به موش‌هایی که قبلا با BCG ایمن شده بودند سبب ایجاد حفاظت کامل موش BALB/c و موش P/J به عفونت جلدی شد و هیچ انگلی از کف پای این حیوانات جدا نشد.

طی بررسی کانویت و همکارانش مشخص شد که ایمونوتراپی به وسیله BCG می‌تواند بسیار موثرتر از درمان دارویی با آنتیموان باشد. افزون بر این اثرات جانبی در گروه ایمونوتراپی کم (۵/۸ درصد) و

Archive of SID
www.SID.ir

خفیف است در حالی که در گروهی که دارو مصرف کرده‌اند برگشت‌پذیری (۵۲/۴ درصد) و وخامت بیماری دیده می‌شود. از سوی دیگر ایمونوتراپی کم هزینه و جایگزین کم خطری برای درمان دارویی در لیشمانیوز جلدی محسوب می‌شود (۳، ۴). به دنبال مشاهده اثر واکسن BCG، بررسی‌ها در این زمینه بیشتر شد و نقش BCG به ویژه در ایجاد پاسخ ایمنی علیه لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفت. کانویت و همکارانش در واکسن تلفیقی از پروماستیگوت‌های کشته شده L.mexicana یا L.braziliensis به همراه M.bovis BCG نقش پیشگیری و درمانی این واکسن ترکیبی را در لیشمانیازیس آمریکای جنوبی نشان دادند. آنها نشان دادند که BCG می‌تواند ایمنی سلولی را به ویژه نسبت به درمان شیمیایی برانگیزد و آن را کاندید مناسبی برای واکسیناسیون و درمان لیشمانیا معرفی کردند (۵، ۶). زمانی که این واکسن در درمان به کار رفت، توانست سبب بهبود بیماران حتی در انواع حاد شود. این اثر درمانی را حاصل ایجاد یک پاسخ ایمنی سلولی نوع I با تولید IFN-γ و عدم تولید اینترلوکین۴ دانستند.

سرانجام از سال ۱۹۹۱ به دنبال بررسی‌های مشابه در انسان و حیوان آزمایشگاهی و نتایج جالبی که به دست آمد همچنین با توجه به اولویت فعالیت‌های تحقیقاتی WHO در ایجاد روشی مناسب برای واکسیناسیون علیه لیشمانیا، برنامه‌ای منظم به منظور تعیین بی‌خطری (ایمنی)، کارآیی و ایمونوژنیسیته دوزهای مختلف واکسن L.major کشته شده به همراه مقادیر مختلف BCG طراحی شد (۷).

دولتی و همکارانش به دنبال بررسی‌هایی که پیشتر انجام داده بودند، بی‌خطری و ایمونوژنیسیته واکسن BCG را به همراه لیشمانیای کشته شده (Autoclaved Leishmania Major: ALM) با لیشمانیای کشته شده با تایمرسول به همراه انجماد و ذوب مکرر مقایسه کردند (۸).

مدبر و همکارانش (۹) طی یک بررسی به مقایسه اثر تزریق واکسن ALM+BCG در برابر BCG به تنهایی علیه لیشمانیای جلدی انتروپونوتیک (انتقال از انسان به انسان) پرداختند.

به هر حال این بررسی‌ها و انواع مشابه، همگی استفاده از واکسن ALM+BCG را مفید می‌دانند، اما کارآیی آن را در ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی تایید نمی‌کنند (۱۰). جستجوی راهی که بتواند کارآیی واکسن را افزایش دهد پیشنهاد همه محققان است. به این ترتیب هم اکنون در جستجوی ادجوانت‌ها یا مسیرهای تلقیح مختلف هستند تا پاسخ ایمنی قوی‌تری ایجاد کنند (۱۱).

بررسی‌های اخیر که به مقایسه روش‌های مخاطی تلقیح BCG (از راه بینی، داخل معده‌ای، رکتال) با روش زیرجلدی پرداخته اند نشان می‌دهند که BCG در مسیر مخاطی پاسخ ایمنی را به گونه‌ای متفاوت فعال می‌کند و واکنش‌های سیستمیک و موضعی که به راه می‌اندازد می‌تواند در مقابله با عفونت درون سلولی مایکوباکتریومی موفق‌تر عمل کند (۱۸-۱۲).

در بررسی ابوالحسنی و همکارانش مشخص شد که استفاده از واکسیناسیون رکتال BCG می‌تواند پاسخ‌های مناسب را همچون مسیرهای زیرجلدی برانگیزد (۱۹). تکثیر بالای لنفوسیت‌ها و سلول‌های طحال در پاسخ به آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریومی، ترشح بالای سایتوکاین IFN-γ و TNF-α و فعالیت مناسب سلول‌های T سایتوتوکسیک نشان داد که مسیر رکتال می‌تواند مسیر جایگزین مناسبی برای تزریق زیرجلدی یا داخل جلدی باشد و با توجه به شیوع بیشتر عفونت‌های ویروسی (HIV) خطر انتقال پاتوژن‌ها را کاهش دهد. نیاز به بهبود کارآیی این واکسن و نتایج حاصل از بررسی در زمینه واکسیناسیون BCG مخاطی سبب طراحی این تحقیق شد. در این تحقیق اثر واکسیناسیون BCG از مسیر مخاطی رکتال بر پیامد لیشمانیوز جلدی در موش BALB/c بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

برنامه واکسیناسیون

به منظور بررسی اثر تجویز واکسن BCG از مسیرهای مختلف برواکسن لیشمانیا، برنامه واکسیناسیون به شرح زیر طراحی شد:

واکسیناسیون BCG در روز صفر، واکسیناسیون ALM+alum در روزهای ۲۸ و ۴۹ و آلوده‌سازی با انگل در روز ۶۰ انجام شد. واکسن لیشمانیای اتوکلاو شده به همراه ادجوانت الوم (ALM+alum) از انیستیتو رازی تهیه شد. مقدار تزریقی به هرموش ۰/۱ میلی‌لیتر برابر ۴۵۶ میکروگرم پروتیین و ۳۷۶ میکروگرم ادجوانت و محل تزریق آن قاعده دم است. از ادجوانت آلوم (alum)، در ویال‌های ۳۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که از انستیتورازی ایران تهیه شده بود برای کنترل ادجوانت استفاده شد. واکسن BCG(pasture strain 1173-P2)، در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط کشت sauton که حاوی cfu ۲۰×۱۰^{۶} در هر میلی‌گرم است، از انستیتوپاستور ایران تهیه شد. انجام این مطالعه به تصویب شورای پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

گروه‌های آزمایش

موش‌های نر ALB/c، ۸-۶ هفته به شش گروه ۲۰تایی به شرح زیر تقسیم شدند. ده موش از هر گروه به منظور بررسی اندازه زخم تا پایان آزمایش در نظر گرفته شد و ده موش دیگر از همان گروه در فواصل زمانی مختلف به منظور سنجش پاسخ تکثیری و سنجش نهفتگی انگل کشته شدند.

گروه اول، موش‌هایی که واکسن BCG و واکسن ALM+alum را به صورت زیرجلدی (subcutaneous: s.c.) دریافت کردند.

گروه دوم، موش‌هایی که واکسن BCG را از راه رکتال و واکسن ALM+alum را به صورت زیرجلدی دریافت کردند. به منظور واکسیناسیون از راه رکتال به موش‌ها در طول شب گرسنگی داده شد و روز بعد با استفاده از سرنگ گاواژ میزان cfu $۱۰^{۶}$ باکتری به آرامی از راه رکتوم وارد بدن موش‌ها شد.

گروه سوم، موش‌هایی که فقط واکسن ALM+alum را به صورت زیرجلدی دریافت کردند (کنترل واکسن لیشمانیا).

گروه چهارم، موش‌هایی که فقط ادجوانت alum را به صورت

Archive of SID
www.SID.ir

زیرجلدی دریافت کردند.

گروه پنجم، موش‌هایی که فقط با انگل لیشمانیا ماژور آلوده شدند. مقدار انگل، 10^5 انگل L.major فاز ایستا و محل تزریق آن کف پای چپ موش‌ها بود.

گروه ششم، موش‌هایی که تنها PBS دریافت کردند.

انجام تست واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری به PPD

به منظور بررسی پاسخ DTH در موش‌هایی که با BCG واکسینه شده بودند، ۲۸ روز پس از واکسیناسیون، ۵ میکروگرم PPD به کف پای راست ۱۰ موش از هر گروه (در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر PBS) و هم حجم آن PBS به کف پای چپ هر موش تزریق شد. قطر کف پا با استفاده از کولیس پس از ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد و درصد افزایش ضخامت پای موش‌ها گزارش گردید (۲۰).

آلوده‌سازی موش‌ها و اندازه‌گیری کف پا

به این منظور میزان 10^5 انگل لیشمانیا ماژور فاز ایستا به کف پای چپ موش‌های گروه آزمایش تزریق و ایجاد و پیش‌روی زخم حاصل از تکثیر انگل هر هفته با استفاده از کولیس بررسی شد.

برای تهیه انگل در فاز ایستا، با رسیدن انگل‌ها به تعداد لازم، محیط تازه دیگری اضافه نشد. ورود به فاز ایستا با شمارش متوالی و روزانه انگل‌ها تشخیص داده شد. معمولا ۴ تا ۶ روز پس از اضافه نکردن محیط تازه انگل‌ها وارد فاز ایستا می‌شود و تعداد آنها در محیط کشت ثابت می‌ماند یا کاهش می‌یابد. هنگامی که انگل‌ها وارد فاز ایستا می‌شوند باید هرچه سریع‌تر استفاده شوند. در غیر این صورت از بین می‌روند.

سنجش پاسخ تکثیری سلول‌های طحال به روش MTT

پاسخ‌دهی سلول‌های طحال نسبت به آنتی‌ژن‌های PPD و F/T(Freeze-Thaw: F/T) انگل لیشمانیا پس از واکسیناسیون با BCG، و پس از آلوده‌سازی موش‌ها با انگل L.major سنجیده شد.

به این منظور هفته سوم، ششم و نهم پس از آلوده‌سازی، از هر گروه دو موش BALB/c بررسی شد. طحال موش‌ها جدا و هموژن شد. پس از لیز RBC، رسوب باقی‌مانده سلول‌های طحال دو موش در میلی‌لیتر مربع محیط کامل RPMI حاوی ۵ درصد FBS مخلوط شد. سپس سلول‌ها به صورت پنج بار تکرار به میزان 5×10^5 cell/well در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به آنتی‌ژن‌ها اضافه شد. قبل از کشت سلول، آنتی‌ژن‌ها به شرح زیر به چاهک‌ها اضافه شد: کانکاناوالین A(conA) به عنوان کنترل مثبت (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، PPD (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و F/T انگل لیشانیاماژور (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). از ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در ردیف کنترل منفی یا بدون آنتی ژن استفاده شد.

پس از اتمام دوره انکوباسیون مناسب ۷۲ ساعت برای con A، و ۷ روز برای آنتی‌ژن‌های PPD و لیشمانیای F/T، میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر MTT (۳-(۴ و ۵ دی‌متیل‌تترازولیل-۲-۲ و ۵- دی‌فنیل تترازولیوم بروماید) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۶-۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی این زمان و به دنبال بررسی و تشکیل بلورهای بنفش رنگ زیر میکروسکوپ محلول رویی سلول‌ها به آرامی جمع‌آوری شده وپس از افزودن ۱۰۰میکرولیتر محلول DMSO، کریستال‌ها حل شد. پس از ۲۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر بادستگاه الایزاریدر خوانده و عدد اندیکس تحریکی گزارش شد. برای محاسبه عدد اندیکس تحریکی جذب سلول‌های حاوی آنتی‌ژهای محرک یا حاوی میتوژن conA (به عنوان کنترل مثبت) بر جذب سلول‌های بدون آنتی‌ژن (کنترل منفی) تقسیم شد (۲۱). بر این اساس عدد اندیکس تحریکی کنترل منفی یک در نظر گرفته شد.

سنجش نهفتگی انگل

به منظور سنجش میزان تکثیر و پیشروی انگل در موش‌های گروه واکسینه و کنترل، در فواصل زمانی سه، شش و نه هفته پس از آلوده‌سازی موش‌ها با انگل لیشمانیا ماژور، از هر گروه دو موش کشته، طحال، کبد و غددلنفاوی آن در شرایط استریل خارج شد. قسمتی از این اعضا با وزن مشخص توسط هموژنایزر در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت اشنایدر واجد ۱۰ درصد FCS هموژن شد. سپس به شرح زیر از سوسپانسیون اولیه سریال رقت تهیه گردید.

→ ۰/۱ میلی‌لیتر → ۰/۱ → ۰/۱ → ۰/۱ →

سوسپانسیون اولیه ۲ میلی‌لیتر	۰/۹ میلی‌لیتر	۰/۹ میلی‌لیتر	۰/۹ میلی‌لیتر	۰/۹ میلی‌لیتر	۰/۹ میلی‌لیتر
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-40}

از هر رقت میزان ۲۰۰ میکرولیتر به هر چاهک ۹۶تایی به صورت دو بار تکرار اضافه شد. سپس دور پلیت‌ها با چسب یا پارافیلم مسدود شد تا از تبخیر در مدت انکوباسیون جلوگیری شود. آنگاه پلیت‌ها به مدت ۱۵-۷ روز در دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مدت پلیت‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند تا در هر گروه و هرعضو بیشترین رقت واجد انگل لیشمانیا به دست آید. آن گاه میزان نهفتگی انگل با فرمول زیر محاسبه شد (۲۲).

وزن عضو/رقت = بار انگل log-

بررسی تولید اینترلوکین پنج (IL5) و اینترفرون گاما (IFNγ) توسط سلول‌های طحالی (با استفاده از کیت R&D)

پس از تهیه محلول‌ها و آماده‌سازی نمونه، با استفاده از کیت R&D اینترفرون گاما و اینتر لوکین ۵ محلول رویی کشت سلول‌های طحال به صورت سه بار تکرار اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 11 انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

برای رسم نمودار نیز از نرم‌افزارهای SPSS و Excel استفاده شد. از روند آماری repeated measure در مقایسه اندازه‌گیری زخم، از آزمون kruskal walis در آزمون‌های ناپارامتری و در سایر موارد از student t-test استفاده شد. سطح معنی‌داری در همه موارد $p<0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتیجه بررسی پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به PPD

پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به PPD در گروه‌های واکسینه شده با BCG پس از ۲۸ روز انجام شد تا میزان تحریک حاصل از واکسیناسیون BCG از مسیرهای مختلف مقایسه گردد.

بر اساس آزمون General Linear Model و با در نظر گرفتن سطح معنی داری $p<0.05$، بین همه گروه‌های آزمایش با یکدیگر و با کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق داخل جلدی PPD اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همان طور که در جدول یک دیده می‌شود در این فاصله زمانی افزایش پاسخ نسبت به موش‌های کنترل در گروه‌های واکسینه مواجه هستیم.

نتایج مقایسه اندازه زخم

با استفاده از روش آماری Repeated measure (برای هفته یک تا هفت) و Friedman (برای هفته هفت تا دوازده) و مقایسه چندگانه (multiple comparison) ، میانگین اندازه زخم موش‌ها (ده موش در هرگروه) در گروه‌های مختلف واکسیناسیون طی ۱۲ هفته پس از آلوده‌سازی با یکدیگر مقایسه و سطح معنی‌داری برابر $p<0.05$ در نظر گرفته شد. افزایش تورم بدون زخم در کف پا در گروه‌های واکسینه با BCG از هفته اول پس از آلوده‌سازی آغاز شد (نمودار یک).

این تورم در گروه BCG زیرجلدی به زخم ناگهانی و شدید در سه هفته آخر تبدیل شد و در هفته نهم موش‌ها کاملا از بین رفتند. در حالی که در گروه رکتال افزایش تورم در برخی از موش‌های آن گروه به زخم کوچکی در هفته‌های شش و هفت تبدیل شد و در برخی موش‌ها زخمی ایجاد نکرد و اکثر موش‌های این گروه با کاهش تورم و از بین رفتن زخم، بهبود یافتند. در گروه‌های کنترل (challenge) ادجوانت (alum) و واکسن لیشمانیا (ALM) شروع تورم با شروع زخم همراه بود که در نهایت منجر به مرگ موش‌ها شد. مقایسه اندازه زخم گروه‌های challenge و PBS با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد.

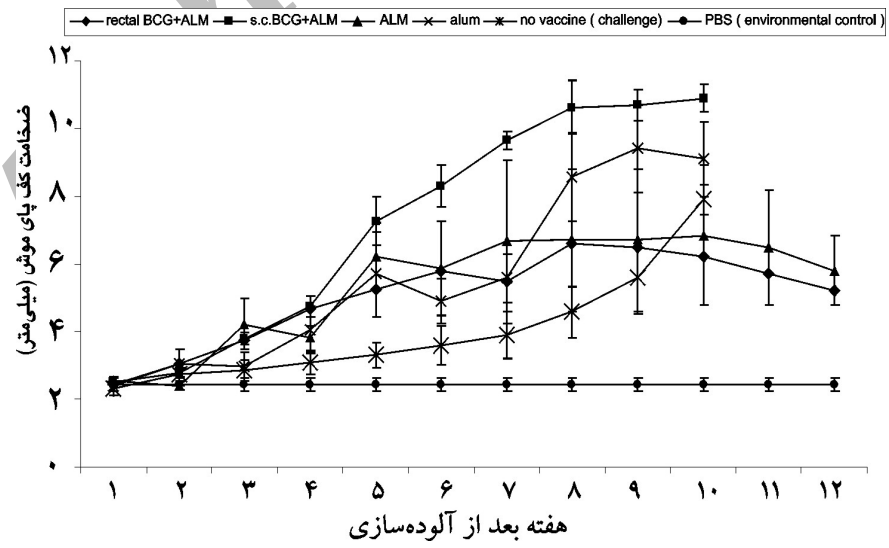
جدول ۱: پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری به PPD در موش‌هایی که با BCG واکسینه شده‌اند. درصد افزایش قطر کف پا (میانگین ±SD) گزارش شده است (n=۱۰).

گروه‌های واکسن	زمان ۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
PBS	۳/۲±۰	۲/۸±۰/۸۶	۴/۳±۱/۸
rectal	۱۹/۷±۲/۸	۲۰/۵±۲/۶	۲۰/۶±۴/۶
S.C.	۲۴/۴±۴/۹	۱۳/۹±۲/۹	۶/۷±۱/۹

نتایج بررسی تکثیر سلول‌های طحال

سنجش میزان تکثیر سلول‌های طحال در گروه‌های آزمایش متفاوت در حضور محرک‌های ثانوی شامل F/T، PPD و در حضور میتوژن conA به عنوان کنترل مثبت انجام شد و به شکل عدد اندیکس تحریکی همان طور که در بخش مواد و روش‌ها آمده است گزارش شد.

همان طور که در جدول دو مشاهده می‌شود، روند تغییر اندیکس تحریکی در گروه‌های مختلف متفاوت است.



نمودار ۱: نمودار خطی افزایش ضخامت پای موش (میانگین ±SD) را تا ۱۲ هفته پس از آلوده‌سازی در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد (n=۱۰).

www.SID.ir

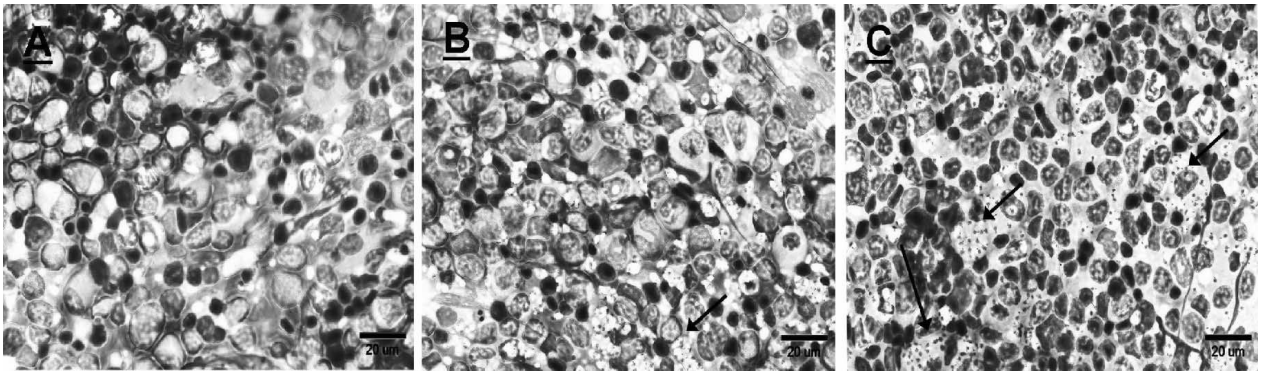
هفته سوم پس از آلوده‌سازی در گروه رکتال واکسن BCG بیشترین اندیکس تحریکی مشاهده شد.در این گروه و گروهی که از طریق زیر جلدی واکسن BCG دریافت کرده اند در هفته ششم کمترین اندیکس تحریکی مشاهده شد. در گروه‌های ALM, alum و challenge از هفته سوم تا نهم اندیکس تحریکی کاهش داشت. به هر حال در طول آزمایش تنها گروه واکسیناسیون رکتال BCG بود که توانست بالاترین اندیکس تحریکی را سه هفته پس از آلوده سازی نشان دهد (جدول دو).

نتایج سنجش میزان نهفتگی تک یاخته

میزان نهفتگی تک یاخته در هفته‌های شش و نه در گروه‌های آزمایش انجام شد. از آنجایی که این بررسی‌ها به صورت دوتایی در پلیت‌های ۹۶تایی انجام شده بود و نتایج در تکرارها برابر بود، خطای استاندارد میانگین یا انحراف معیار در همه موارد صفر خواهد بود. نمودار دو، میانگین نهفتگی تک یاخته را در اعضای لنفی کبد، طحال و گره لنفی نشان می‌دهد. بر این اساس تک یاخته لیشمانیا ماژور از هفته ششم پس از آلوده‌سازی در همه گروه‌ها به جز گروه رکتال، در هر سه عضو لنفی مورد بررسی دیده می‌شود. در هفته نهم تعداد تک یاخته دراعضای لنفی گروه‌های آزمایش افزایش یافته و در نهایت منجر به مرگ اکثر آنها می‌شود. در حالی که در گروه رکتال در طحال و غده لنفی حضور تعداد کمتری تک یاخته مشاهده می‌شود. شکل یک، تفاوت حضور تک یاخته را در نمونه های مقطع طحال گروه BCG رکتال، گروه BCG زیر جلدی و گروه challenge نشان می دهد که به صورت touch smear تهیه شده و با کیت DifQuick رنگ آمیزی شده است.

نتیجه تولید سایتوکاین اینترفرون گاما و اینترلوکین ۵

بر اساس نتایج به دست آمده میزان اینترفرون گاما قبل از آلوده‌سازی در گروه‌های واکسن BCG زیر جلدی و رکتال به ترتیب برابر با ۱۱۱۱/۵ و ۵۱۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر است. پس از آلوده‌سازی این میزان در گروه اول به طور معنی‌داری ($p<0.05$) کاهش می‌یابد در حالی که در گروه رکتال به ۷۳۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر افزایش می‌یابد. میزان اینترلوکین ۵ قبل از آلوده‌سازی در گروه‌های واکسن sc+ALM و ALM+رکتال به ترتیب برابر با ۸ و ۸/۳ است که پس از آلوده‌سازی تغییر معنی‌داری ندارد. در گروه‌های کنترل ALM و alum کاهش معنی‌داری($p<0.05$) اینترفرون گاما و افزایش اینتر لوکین ۵ پس از آلوده‌سازی نشان می‌دهند (نمودار سه و چهار).

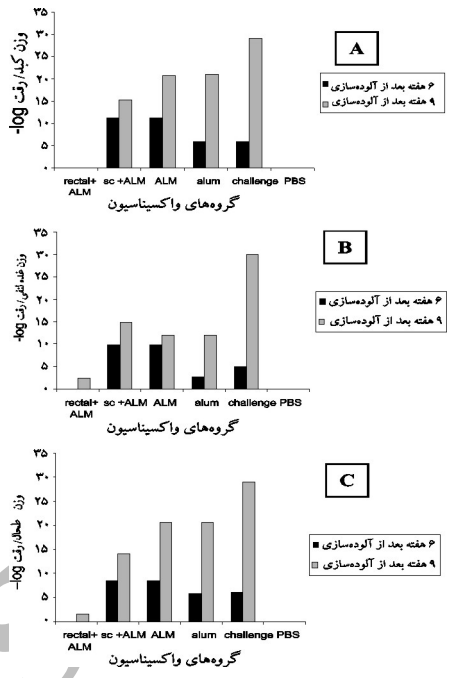


شکل ۱: اسمیرهایی که از مقطع طحال گرفته شده، عدم حضور انگل در گروه رکتال (A)، حضور نسبی انگل در گروه BCG زیرجلدی (B) و حضور فراوان در گروه Challenge (C) در هفته ششم پس از آلوده‌سازی (مشاهده نمونهٔ رنگی تصویر در پایان مقالات)

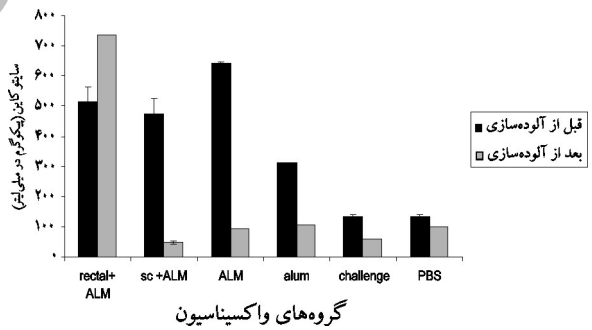
جدول ۲: میانگین ضریب تکثیر لنفوسیتی در گروه‌های واکسیناسیون در هفته ۳، ۶ و ۹ پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا (بر حسب SI) (طبق فرمول SI کنترل منفی ۱ در نظر گرفته شد). آزمایش‌ها به صورت ۵ بار تکرار انجام شد.

تیمار	۳ هفته بعد از آلوده‌سازی			۶ هفته بعد از آلوده‌سازی			۹ هفته بعد از آلوده‌سازی		
	PPD	F/T	Con-A (کنترل+)	PPD	F/T	Con-A (کنترل+)	PPD	F/T	Con-A (کنترل+)
Rectal+ALM	۶/۶	۱/۴	۵/۴	۱/۳	۱/۲	۲/۳	۲/۹	۲/۵	۴/۸
S.C.+ALM	۱/۸	۱/۵	۱/۲	۱/۲	۱/۳	۱/۷	۲/۶	۲/۵	۴/۸
ALM	۳/۲	۲/۷	۳/۸	۱/۳	۱/۷	۱/۲	۱/۸	۰/۱	۲/۹
Alum	۲/۰	۲/۳	۲/۸	۰/۹	۱/۲	۱/۸	۱/۲	۰/۹	۱/۲
Challenge	۱/۷	۱/۲	۱/۶	۰/۹	۱/۱	۱/۳	۱/۱	۰/۹	۱/۲
PBS	۱/۵	۰/۹	۴/۳	۱/۷	۱/۲	۴/۳	۱/۵	۰/۱	۴/۳

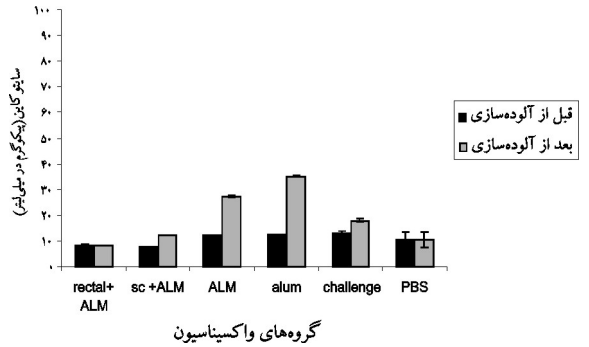
www.SID.ir



نمودار ۲: میانگین میزان نهفتگی انگل را در کبد (A)، گره لنفی (B) و طحال (C) گروه‌های واکسینه در هفته ششم و نهم پس از آلوده‌سازی نشان می‌دهد. از هر گروه دو موش انتخاب و آزمایش‌ها به صورت دو بار تکرار انجام شد.



نمودار ۳: میانگین سایتوکاین IFN-γ ± SD در مایع رویی کشت سلول‌های طحال گروه‌های واکسیناسیون قبل و بعد از آلوده‌سازی با لیشمانیا. از هر گروه ۲ موش انتخاب و آزمایش‌ها به صورت ۳ بار تکرار انجام شد.



نمودار ۴: میانگین سایتوکاین IL-5 ± انحراف معیار در مایع رویی کشت سلول‌های طحال گروه‌های واکسیناسیون قبل و بعد از آلوده‌سازی با لیشمانیا. از هر گروه ۲ موش انتخاب و آزمایش‌ها به صورت ۳ بار تکرار انجام شد.

بحث

BCG و لیشمانیا، هر دو از پاتوژن‌های درون سلولی هستند که ویژگی‌های زیر استفاده از BCG را در تحریک سیستم ایمنی به منظور مقابله با لیشمانیا موثر ساخته است. BCG هم می‌تواند همراه با واکسن لیشمانیا به صورت ادجوانت مورد استفاده قرار گیرد و هم به عنوان واکسن آغازگر یا دارو همراه واکسن‌های لیشمانیا مورد استفاده قرار گیرد.

۱. میزبان هر دو آنها ماکروفاژ است. گرچه این دو ارگانیسم در مسیر شبکه اندوزومی پس از فاگوسیتوز توسط ماکروفاژ با هم تفاوت دارند، اما هر یک در سیستم اندوزومی مکانیسم‌های فرار خاص خود را به اجرا در می‌آورند که به هر حال به بروز سیگنال‌های خطر در ماکروفاژ و تحریک ماکروفاژ منجر می‌شود.

۲. بهترین روش حذف و مقابله با این دو ارگانیسم فعال شدن ماکروفاژ به ویژه از راه تولید متابولیت‌های فعال اکسیژن و نیتروژن است. در این میان اثر کشندگی نیتریک اکساید در هر دو غالب است.

۳. اگر بتوانیم از سویه غیر بیماری‌زا BCG در جهت تحریک ماکروفاژ و سیستم ایمنی استفاده کنیم، توانسته‌ایم سطح فعالیت سیستم ایمنی را نسبت به لیشمانیا هم افزایش دهیم.

۴. علاوه بر موارد فوق، BCG می‌تواند در میزبان درون‌زاد BALB/c پاسخ ایمنی نوع یک ایجاد کند، که همان پاسخ مطلوب در حذف عفونت لیشمانیا است (۲۳).

از سوی دیگر با توجه به مطالعات انجام شده معلوم شد که باید واکسیناسیون BCG+ALM در فرمولاسیون دیگری مورد استفاده قرار گیرد تا کارایی بیشتری داشته باشد (۲۴). از این رو استفاده از واکسیناسیون BCG مخاطی پیشنهاد گردید. غشاهای مخاطی تمام سطح دستگاه تنفسی، گوارشی، ادراری-تناسلی، گوش داخلی و مجاری تمام غدد برون ریز را پوشانده‌اند. این غشاها حاوی سیستم‌های قدرتمند فیزیکی و شیمیایی برای محافظت از ورود عوامل خارجی به بدن هستند. به علاوه یک سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی وسیع این سطوح را در بر می‌گیرد. ۸۰ درصد سلول‌های ایمنی در سیستم ایمنی مخاطی قرار دارند و پیوسته در حال گردشند (۲۵، ۲۶). به این ترتیب استفاده از واکسن BCG مخاطی چه علیه بیماری توبرکلوزیس باشد چه علیه لیشمانیا یا هر پاتوژن درون سلولی دیگر، به دلایل زیر به روش زیر جلدی برتری دارد:

۱. به کمک ایمن‌سازی مخاطی می توانیم سایر اعضای لنفی و سطوح مخاطی دورتراز محل ورود آنتی‌ژن را ایمن سازیم. یعنی با وارد ساختن آنتی‌ژن به مسیر گوارش می توانیم مسیر تنفسی، طحال و سایر قسمتها را نیز در زمان کمتری نسبت به آن آنتی‌ژن ایمن سازیم. چرا که سلول‌های ایمنی و فرآورده‌های آنها در سیستم مخاطی در حال گردشند و پیام خود را در بدن منتشر می کنند.

۲. مسیرهای مخاطی به دلیل آن که محل ورود پاتوژن‌ها هستند، پیوسته از یک سیستم دفاعی فعال برخوردارند. یعنی طیف وسیعی از سلول‌های ایمنی در این محل آماده به فعالیت هستند. از این رو BCG از مسیر

Archive of SID
www.SID.ir

مخاطی سریع‌تر در دسترس سلول‌های ایمنی (ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌ها) قرار می‌گیرد.

۳. از آنجایی که ورود BCG از مسیر مخاطی می‌تواند بخش‌های مختلف و سلول‌های مختلف را درگیر کند، با تنوع پاسخ روبرو هستیم. پس در درگیری سیستم ایمنی با BCG و لیشمانیا شانس انتخاب پاسخ بهتر افزایش خواهد یافت.

۴. همچنین بررسی‌هایی که تا کنون انجام شده نشان می‌دهد که استفاده از BCG مخاطی می‌تواند با هدایت پایدارتر پاسخ‌های ایمنی به طرف نوع یک، علیه توبرکلوزیس مفید باشد (ایمن‌سازی oral با باکتری‌های درون سلولی مثل BCG و سالمونلا هم پاسخ نوع یک و هم پاسخ نوع دو را فعال می‌کند. اما پاسخ نوع دو توام با تولید IL-4, IL-5 نیست بلکه بیشتر نوعی تعدیل ایمنی با ترشح IL-10 است) شواهد دیگر نیز عدم تفاوت پاسخ ایمنی پس از واکسیناسیون از دو مسیر مخاطی و زیرجلدی را نشان می‌دهند (۱۸-۱۵، ۲۱).

در این تحقیق مشخص شد در گروه رکتال که از انتهای رکتوم با BCG واکسینه شده‌اند BCGهایی که در انتهای مسیر گوارشی کلون شده‌اند عامل تحریک سیتم ایمنی هستند. تحریک سیستم ایمنی قبل از آلوده‌سازی با لیشمانیا سبب افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری برابر ۱۹/۷درصد و تولید اینتر فرون گاما و اینتر لوکین ۵ به تر تیب برابر۵۱۵ و ۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر می‌شود. بعد از آلوده‌سازی با لیشمانیا میزان تولید اینترفرون گاما به ۷۳۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر افزایش می‌یابد. تا هفته نهم پس از آلوده‌سازی هیچ انگلی در طحال، کبد و غدد لنفی دیده نمی‌شود. در هفته نهم و دوازدهم انگل توانسته وارد طحال و غدد لنفی شود، در حالی که هنوز کبد دور از دسترس انگل قرار دارد. این یافته‌ها با تشکیل نشدن زخم وکاهش پیشروی آن در ارتباط است. ضریب تکثیر لنفوسیتی روند افزایش-کاهش- افزایش را در سه زمان مورد بررسی نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که گرچه BCG از مسیر رکتال، تولید اینترفرون گاما را قبل از آلوده‌سازی تا حد زیادی تحریک نکرده است اما پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا توانسته تا حد زیادی پاسخ ایمنی ایجاد شده را حفظ کند و مانع سیستمیک شدن وسیع انگل شود. استفاده از دوزهای متفاوت واکسن BCG، تغییر فاصله زمانی بین دو واکسیناسیون و انجام واکسیناسیون در گروه‌های سنی مختلف و بررسی پاسخ‌های ایمونولوژیک می‌تواند زمینه بررسی‌های بعدی باشد.

نتیجه‌گیری

واکسن BCG مخاطی می‌تواند پاسخ موثر در حذف عفونت لیشمانیا ماژور را بهتر از روش زیرجلدی تحریک کند. به علاوه از یک مزیت همیشگی نسبت به روش تزریق زیرجلدی BCG برخوردار است و سبب کاهش شیوع عفونت‌های تزریقی و عوارض لنفادنیت می‌شود.

تقدیر و تشکر

از گروه تک یاخته‌شناسی و گروه توبرکولین موسسه واکسن و سرم سازی رازی و گروه ایمنی‌شناسی انستیتو پاستور تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Young S, O'Donnell M, Lockhart E, Buddle B, Slobbe L, Luo Y, De Lisle G, Buchan G. Manipulation of immune responses to Mycobacterium bovis by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin. Immunol Cell Biol 2002; 80(3): 209-215

2. Fortier AH, Mock BA, Meltzer MS, Nacy CA. Mycobacterium bovis BCG-induced protection against cutaneous and systemic Leishmania major infections of mice. Infect Immun 1987; 55(7): 1707-1714

3. Convit J, Castellanos PL, Rondon A, Pinardi ME, Ulrich M, Castes M, Bloom B, Garcia L. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. Lancet 1987; 1(8530): 401-405

4. Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Borges R, Aranzazu N, Valera M, Villarroel H, Zapata Z, Tomedes I. Immunotherapy of american cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97(4): 469-472

5. Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. Clin Dermatol 1996; 14(5): 425-431

6. Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, Castes M, Rondon A, Pinardi ME, Rodriquez N, Bloom BR, Formica S, Valecillos L. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis 1989; 160(1): 104-115

7. Steigerwald M, Moll H. Leishmania major modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. Infect Immun 2005; 73(4): 2564-2567

8. Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Alimohammadian MH, Khamesipour A, Ehsasi S, Hashemi-Fesharki R, Ale-Agha S, Modabber F. Comparative safety and immunogenicity trial of two killed Leishmania major vaccines with or without BCG in human volunteers. Clin Dermatol 1996; 14(5): 489-495

9. Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, Modabber F. Randomised vaccine trial of single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic

Archive of SID

www.SID.ir

cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. Lancet 1998; 351(9115): 1540-1543
10. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev 2001; 14(2): 229-243
11. Mahmoodi M, Khamesipour A, Dowlati Y, Rafati S, Momeni AZ, Emamjomeh M, Hejazi H, and Modabber F. Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved Leishmania major vaccine mixed with low dose of BCG. Clin Exp Immunol 2003; 134(2) 303-308
12. Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. Immunogenicity and protective capacity of Mycobacterium bovis BCG after oral or intragastric administration in mice. Vaccine 2000; 18(13): 1186-1195
13. Badiner G, Goodman TG, Lefrancois L. Selection of intestinal intraepithelial lymphocyte T cell receptors: evidence for a dynamic tissue-specific process. Int Immunol 1993; 5(2): 223-226
14. Aldwell FE, Baird MA, Fitzpatrick CE, McLellan AD, Cross ML, Lambeth MR, Buchan GS. Oral vaccination of mice with lipid-encapsulated Mycobacterium bovis BCG: anatomical sites of bacterial replication and immune activity. Immunol Cell Biol 2005; 83(5): 549-553
15. Aldwell FE, Keen DL, Parlane NA, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Oral vaccination with Mycobacterium bovis BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in brushtail possums. Vaccine 2003; 22(1): 70-76
16. Falero-Diaz G, Challacombe S, Banerjee D, Douce G, Boyd A, Ivanyi J. Intranasal vaccination of mice against infection with Mycobacterium tuberculosis. Vaccine 2000;18(28): 3223-3229
17. Lyadova IV, Vordermeier HM, Eruslanov EB, Khaidukov SV, Apt AS, Hewinson RG. Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent Mycobacterium bovis and accelerates production of IFN-gamma in their lungs. Clin Exp Immunol 2001; 126(2): 274-279
18. Chen L, Wang J, Zganiacz A, Xing Z. Single intranasal mucosal Mycobacterium bovis BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis. Infect Immun 2004; 72(1): 238-246
19. Abolhassani M, Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. Mycobacterium bovis BCG induces similar immune responses and protection by rectal and parenteral immunization routes. Infect Immun 2000; 68(10): 5657-5662
20. Abou-Zeid C, Gares M-P, Inwald J.Induction of type 1 immune response to a recombinant antigen from Mycobacterium tuberculosis expressed in Mycobacterium vaccae. Infect Immun 1997; 65: 1856-1862
21. Loosdreched A.A.,Beelen R.H.A tetrazolium based colorimetric MTT assay.Jornal of immunological methods 1994; 174: 311-320
22. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying Leishmania major in tissues of infected mice. Parasite Immunol 1985; 7(5): 545-555
23. Russell DG. Mycobacterium and Leishmania: stowaways in the endosomal network. Trends Cell Biol 1995; 5(3): 125-128
24. Modabber F. Vaccines against leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89 Suppl 1: 83-88
25. Lehner T, Bergmeier L, Brooks R, Hussain L, Klavinski L, Mitchell E, Tao L. Genital and rectal mucosal immunity against transmission of SIV/HIV. Kagnoff M. and Kiyono H. Essentials of Mucosal Immunology. London: Academic Press 1996; 437-447
26. Marinaro M , Kiyono H, Vancot J, Okahashi N. Vaccines for selective induction of Th1- and Th2-cell responses and their roles in mucosal immunology. Kagnoff M. and Kiyono H. Essentials of Mucosal Immunology. London: Academic Press 1996; 461-475

Archive of SID

www.SID.ir