واکسیناسیون موشهای BALB/c علیه لیشمانیوز پوستی با استفاده از لیپوزومهای حاوی گلیکوپروتئین سطحی اصلی لیشمانیا نوترکیب(rgp63)

محمود رضا جعفری[1]، افروز عارفی[2]، کیوان صدری[3]، مهرناز امانی[4]، فریدون مهبودی[5]

تاریخ پذیرش:۸۲/۷/۴

Title: Vaccination of BALB/c Mice Against Cutaneous Leishmaniasis Using Liposomes Incorporated with Recombinant Major Surface Glycoprotein of Leishmania (rGP63)

Authors: Jaafari M.R[1].,Arefi A.[2], Sadri K.[3], Amani M.[4], Mahboudi F.[5],

Abstract: The objective of this study was to formulate liposome preparations loaded with recombinant major surface metalloproteinase glycoprotein of Leishmania (rGP63) to selectively induce cell mediated immunity (CMI) in susceptible BALB/c mice and protect the mice against challenge with virulent L. Major. Liposomes containing rGP63 was prepared as dehydration-rehydration vesicles and composed of DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) and cholesterol (Chol) (DRV-DPPC/Chol-rGP63 7:2 molar ratio). To this formulation, DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine) (DRV-DPPC/DOPE/Chol-rGP63 7:1:2 molar ratio) and stearylamine (SA) (DRV-DPPC/SA/Chol-rGP63 7:2:2 molar ratio) were added to produce fusogenic and positively charged liposomes, respectively. Another formulation had all the lipid ingredients (DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol-rGP63, 7:1:2:2 molar ratio). All the liposome formulations were heterogeneous in size, ranging from 0.1 to 1.5 μm, but their encapsulation rate was high (46-52%). Liposome preparations containing rGP63 (2μg), rGP63 (2μg) by itself (PBS-rGP63), PBS (Phosphate buffer saline), and a control liposome (DRV-DPPC/Chol 7:2 molar ratio) were injected subcutaneously (SC) three times in groups of 10 female BALB/c mice with three weeks intervals. Three weeks later the mice were tested for delayed type hypersensitivity (DTH) by injecting 2 μg of rGP63 SC to the left footpads; and for comparison the right footpads were injected with PBS. After 24, 48 and 72 hours the footpad thickness was measured on both foot pads. One weak after the DTH test, the mice were challenged with virulent L. major promastigotes (1×10^6 / 50 μL) SC to the left footpads and the footpad thickness was measured for 10 weeks. The results of DTH test indicated that among different groups, the DRV-DPPC/DOPE/Chol-rGP63 had the greatest positive DTH response compared to the control groups ($p < 0.01$). The DTH response of the other liposomal formulations containing rGP63 and PBS-rGP63 were also positive ($p<0.05$); however, it was less. In the challenge test, the DRV-DPPC/DOPE/Chol-rGP63 had a complete protective effect ($p < 0.001$). The DRV-DPPC/Chol-rGP63 had also a good protective effect ($p<0.001$) but it was less than the DRV-DPPC/DOPE/Chol-rGP63. The DRV-DPPC/SA/Chol-rGP63 had a little protective effect that was not statistically significant ($p>0.05$), DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol-rGP63 and PBS-rGP63 showed only partial protection ($p<0.05$). These results indicate that DRV-DPPC/DOPE/Chol-rGP63 could be a suitable immunoadjuvant for rGP63 to induce selective CMI in susceptible BALB/c mice and protect the mice against cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Liposome, rGP63, Cellular immunity, DTH.

1-Assistant professor, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences.
2- Pharm. D.
3- Pharm. D.
4- Research assistant, School of Pharmacy, Mashhad Univ. of Medical Sciences.
5-Assistant professor, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences.

۱- استادیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
۲- دکتر داروساز.
۳- دکتر داروساز.
۴- کارشناس آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
۵- استادیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده

هدف این مطالعه تهیه فرآورده های لیپوزومی حاوی rgp63 (major surface glycoprotein of Leishmania recombinant)است که بتواند در موشهای BALB/c بصورت اختصاصی باعث القاء ایمنی سلولی شود و موشها را در مقابل چالش با انگل زنده لیشمانیا ماژور، محافظت کند. لیپوزومهای حاوی rgp63 به روش دهیدراسیون – رهیدراسیون (Dehydration- Rehydration vesicles, DRVs) تهیه شدند. اجزای اصلی لیپیدی تشکیل دهنده لیپوزومها شامل DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) و کلسترول (Chol) DRV-DPPC/Chol-rgp63) با نسبت مولی ۲:۷) بود و اجزای دیگر شامل DRV-DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine) DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63 با نسبت مولی ۷: ۱ : ۲) و استئاریل آمین (SA) DRV-DPPC/SA/Chol-rgp63) با نسبت مولی ۷: ۲: ۲) به فرمولاسیون اصلی اضافه شدند تا لیپوزومهای بترتیب فوزوژنیک و با بار مثبت حاصل شوند. فرمولاسیون دیگری حاوی تمام اجزای لیپیدی فوق بود (لیپوزوم با بار مثبت و فوزوژنیک-DRV (DPPC/DOPE/SA/Chol-rgp63) با نسبت مولی ۷: ۱: ۲: ۲). لیپوزومهای حاصل محدوده سایز ناهمگن (µm ۰/۱-۱/۵) داشتند ولی میزان محصورسازی آنها بالا (۵۲-۴۶٪) بود. فرآورده های لیپوزومی حاویµm rgp63 (µg ۲) و rgp63 به تنهایی (PBS-rgp63)(µg ۲) ، PBS و لیپوزوم خالی (DRV-DPPC/Chol) به عنوان کنترل به صورت زیر جلدی به موشهای BALB/c در گروه های ۱۰ تایی سه مرتبه به فاصله ۳ هفته از هم تزریق شدند. سه هفته بعد از آخرین تزریق ایمن سازنده تست ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed type hypersensitivity, DTH) با تزریق µg ۲ از rgp63 در کف پای چپ موش و PBS (Phosphate buffer saline) به عنوان کنترل در کف پای راست بصورت زیر جلدی انجام گرفت و میزان تورم حاصل در پای موشها ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت پس از تزریق اندازه گیری شد. یک هفته بعد از تست DTH موشها با تزریق پروماستیگوتهای زنده لیشمانیا ماژور (µg ۲۱۰/۵۰ ^{6} × ۱) در کف پای چپ بصورت زیرجلدی تحت چالش قرار گرفتند. میزان تورم و زخم در پای موشها بصورت هفتگی به مدت ۱۰ هفته اندازه گیری شد. آنالیز نتایج DTH نشان داد که در بین گروه های مختلف فرآورده لیپوزومی-DRV DPPC/DOPE/Chol-rgp63 در مقایسه با گروه های کنترل بیشترین تاثیر را در ایجاد پاسخ DTH مثبت در هر سه نوبت اندازه گیری شده را دارد ($p<0.01$) ، پاسخ فراورده های لیپوزومی دیگر حاوی rgp63 و rgp63 PBS نیز در هر سه نوبت مثبت ولی کمتر بود. ($p<0.05$) در تست چالش با انگل زنده گروه-DRV-DPPC/DOPE/Chol rgp63 اثر محافظتی کامل داشت ($P<0.001$) ، گروه DRV-DPPC/Chol-rgp63 اثر محافظتی خوبی داشت ولی کمتر از گروه قبل بود. ولی فرآورده لیپوزومی DRV-DPPC/SA/Chol-rgp63 اثر محافظتی جزئی نشان داد که ازنظر آماری بارز نبود. ($p>0.05$) گروه های DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol-rgp63 و PBS- rgp63 فقط بصورت نسبی($p<0.05$) باعث محافظت موشها شدند. این نتایج نشان می دهد که لیپوزومهای-DRV DPPC/DOPE/Chol-rgp63می توانند ایمونوادجوانتهای مناسب برای rgp63 برای تحریک ایمنی سلولی و محافظت موشها در مقابل لیشمانیوز پوستی باشند.

گل واژگان : لیشمانیوز پوستی، لیپوزوم ، rgp63 ، ایمنی سلولی، DTH .

مقدمه

لیشمانیازیس یک بیماری تک یاخته ای انسانی می باشد که در اکثر نقاط دنیا رخ می دهد. لیشمانیوز پوستی که عامل آن انواع گونه های لیشمانیا می باشد باعث ایجاد یک زخم پوستی می شود که در اغلب موارد خود به خود خوب می شود ولی باعث بجا ماندن یک زخم معمولا" بدشکل برروی پوست می شود (۱). درمان لیشمانیازیس بر اساس ترکیبات

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی موان می باشد که عوارض جانبی ناخواسته زیادی دارد. درمان این بیماری معمولاً خیلی طولانی بوده و همراه با صرف هزینه های زیادی می باشد بنابراین بهترین راه برای کنترل لیشمانیا واکسیناسیون است. واکسنهای تجربی زیادی مثل انگل کشته شده با اتوکلاو، آنتی ژنهای استخراج شده از غشاء انگل و آنتی ژنهای محلول انگل باعث محافظت با درجات مختلف شده است (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸،۷).

در تمام این تحقیقات محافظت در مقابل لیشمانیازیس همراه با پاسخ Th_1 (ایمنی سلولی) و تولید i nterferon-γ (IFN-γ) بوده است ولی interleukin-4 (IL-4) و IL-10 تولید نشده است. یا به مقدار کم ایجاد میشود که مشخصه ایمنی هومورال (Th_2) است بنابراین ایمنی مناسب برای مبارزه با سالک ایمنی از نوع سلولی می باشد که با آزمون بررسی ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed type hypersensitivity, DTH) می توان آنرا نشان داد (۹،۲).

گونه های مختلف لیشمانیا دارای یک گلیکوپروتئین برروی سطح شان هستند که گلیکوپروتئین سطحی اصلی لیشمانیا می باشد و (63-Kilodalton major surface GP63 metalloproteinase glycoprotein of Leishmania) نامیده می شود. این گلیکوپروتئین یک متالوپروتئیناز _ روی می باشد و ۶۳ کیلو دالتون وزن مولکولی آن است (۱۰). این پروتئین نقش مهمی برای ورود انگل به ماکروفاژها و متعاقباً زنده ماندن درون فاگولیزوزوم ها دارد (۱۱،۱۲). GP63 همچنین یک واکسن کاندید برای مقابله با لیشمانیازیس می باشد (۲، ۶، ۱۳و۱۴).

برای مقابله با لیشمانیوزیس و ابداع واکسن، نوع نوترکیب recombinant GP63 (rgp63) نیز تهیه شده است (۱۶،۱۵). rgp63 در مقایسه با GP63 طبیعی فاقد مولکولهای متصل قندی بوده و وزن مولکولی آن ۵۸-۵۴ کیلو دالتون می‌باشد. نشان داده شده است که rgp63 باعث DTH مثبت در میمونهای Vervet که زخمهای سالکی مشابه انسان ایجاد می‌کنند می‌شود ولی به تنهایی یا به همراه BCG (Bacille Calmette Guerine) به عنوان ایمونوادجوانت برای القاء ایمنی سلولی، فقط به مقدار نسبی باعث محافظت میمون ها در مقابل چالش با انگل زنده شده است (۱۷). بنابراین rgp63 نیز می تواند به عنوان واکسن کاندید علیه لیشمانیا باشد، ولی از نظر ایمن زایی ضعیف بوده و نیاز به تقویت اثر با استفاده از ایمونوادجوانت های دیگر را دارد .

لیپوزومها وزیکولهای میکروسکوپی هستند که از دو لایه های فسفولیپیدی تشکیل شده اند و حاوی فازهای آبی می باشند. داروها (هم محلول در آب و هم محلول در چربی) را می توان در لیپوزومها انکپسوله کرد تا کارآیی و اختصاصی بودن دارو را افزود، علاوه بر این لیپوزومها ایمیونوادجوانتهای خیلی موثر برای آنتی ژنهای پروتئینی می باشند (۱۸) . این وزیکولها قادر به تحریک هم پاسخ هومورال و هم سلولی برای انواع مختلفی از آنتی ژنها می باشند (۱۹) .

یکی از مهم ترین ویژگی های لیپوزوم ها بعنوان ایمیونوادجوانت، توانایی آنها در تحریک سیستم ایمنی سلولی به صورت اختصاصی می باشد. این هدف بوسیله روش های مختلف مثل انتخاب فسفولیپید مناسب (۲۰، ۲۱)، انتخاب بار مناسب برروی سطح لیپوزوم ها (۳، ۴، ۲۲) ، پوشش دادن لیپوزوم ها با ترکیبات قندی حاوی اولیگومانوز نظیر مانان (۲۳، ۲۴) و تهیه لیپوزوم ها طوری که آنتی ژن در سطح لیپوزوم ها یا در قسمت دو لایه لیپوزوم ها (به جای اینکه در فازآبی داخلی لیپوزوم ها انکپسوله شود) قرار گیرد (۲۵) قابل دست یابی است. علاوه بر این لیپوزوم ها به عنوان ادجوانت مورد تائید اداره

www.SID.ir

Archive of SID

دارو و غذای آمریکا است، در مطالعات کلینیکی کاملا بی خطر بوده و توسط افراد داوطلب به خوبی تحمل شده است (۲۶).

در مطالعه حاضر از لیپوزوم ها بعنوان ایمونوادجوانت برای rgp63 استفاده شد و اثر محافظتی آنتی ژن rgp63 انکپسوله شده در لیپوزوم های تهیه شده بروش دهیدراسیون –رهیدراسیون (Dehydration- Rehydration vesicles, DRVs) با استفاده از فسفولیپیدهای مختلف (Dioleoylphosphatidylethanolamine) PPC, (Dipalmitoylphosphatidylcholin) DOPE و استئاریل آمیل (SA جهت ایجاد بار مثبت برروی لیپوزوم ها) و کلسترول در مدل موشی لیشمانیازیس با استفاده از موش های BALB/c مورد بررسی قرار گرفت .

مواد و روش کار

حیوان

جهت این مطالعه موشهای BALB/c ماده ۸ هفته ای از انیستیتو رازی مشهد تهیه گردید. موشها در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند و ازنظر آب و غذا محدودیتی نداشتند .

انگل

انگل L. major سویه MRHO/IR/75/ER که ازطرف مرکز تحقیقات و آموزش بیماریهای پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران به صورت هدیه دریافت شده بود، تا زمان استفاده با پاساژ در موش BALB/c نگهداری گردید. سپس جهت تکثیر، آماستیگوتهای گرفته شده از ترشحات زخم موشها ابتدا درمحیط آگار خون دار (NNN) کشت داده شد. بعد از اطمینان از رشد انگل و عدم آلودگی کشت ها بوسیله بررسی با میکروسکوپ، انگلها به محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪FCS، ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین G ، و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین انتقال داده شده و در دمای ° ۲۲ تکثیر شدند.

مواد

DOPE، کیسه دیالیز با Cutoff برابر با ۱۲-۱۰ کیلو دالتون، ۱۰۰- Triton X و استاندارد وزن مولکولی پروتئینی با دامنه پائین از سیگما (آمریکا) خریداری گردیدند. گلایسین، کوماسی بلو، نیترات نقره ، کلسترول، کلروفرم، متانول، اتر، ایزوپروپیل الکل، اسید استیک و تریس محصول مرک (آلمان) بودند. DPPC، استئاریل آمین (SA) و (Bovine serum albumin)BSA از Fluka (سوئیس) خریداری گردیدند. گریدهای مسی ۳۰۰ مش، فسفوتنگستیک اسید و فورموار محصول شرکت ProSciTech (استرالیا) بودند.

استاندارد وزن مولکولی پروتئین ، ژل (Preparative Grade) Superdex 75 و (Fast flow) DEAE- Sepharose (Diethylaminoethyl) محصول شرکت Pharmacia (سوئد) بود. بقیه مواد از نوع تجزیه ای (analytical grade) بودند و به همان صورتی که رسیده بودند بدون خالص سازی بیشتر استفاده شدند.

محلول ها

بافر PBS (Phosphate buffer saline) : ۷/۵ میلی مول H_2O ۴،۷ Na_2HPO ، ۲/۵ میلی مول NaH_2PO_4 ، ۱۴۵/۳ میلی مول Nacl .

محلول ۱: بافر شستشو دهنده حاوی ۲۰ میلی مول تریس، ۲۰ میلی مول کلرور سدیم و حاوی یک میلی مول EDTA (Ethylene diamine tertra acetic acid) با pH هشت.

www.SID.ir

Archive of SID

محلول ۲: بافر لیز کننده حاوی ۵۰ میلی مول تریس، ۱۰۰ میلی مول کلرور سدیم و یک میلی مول EDTA با pH هشت.

محلول ۳: بافر شستشوی رسوب سلولی حاوی ۵۰ میلی مول تریس و یک میلی مول EDTA با pH هشت.

محلول ۴: بافر حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۲ مول اوره و یک میلی مول EDTA با pH ۸/۸.

محلول ۵: بافر حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۸ مول اوره و یک میلی مول EDTA با pH ۸/۸.

محلول ۶: بافر حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۸ مول اوره، ۱۲۰ میلی مول کلرورسدیم و یک میلی مول EDTAبا pH ۸/۸.

محلول ۷: بافر حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۸ مول اوره، ۱۵۰ میلی مول کلرورسدیم و یک میلی مول EDTA با pH ۸/۸.

تولید، جداسازی و تخلیص rgp63

آنتی ژن GP63 به صورت نوترکیب بوسیله بیان در سلول های Recombinant E.Coli BL21 (DE3) کشت داده شده در محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین ۱۰۰ µg/ml تولید گردید (۱۰، ۱۵). سپس با استفاده از سانتریفوژ (Beckman, J2- MI, USA) به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm رسوب سلولی جدا گردید. رسوب سلولی با محلول ۱ شستشو گردید و سپس در همان دور قبلی سانتریفوژ شد تا رسوب سلولی عاری از محیط کشت گردد. درمرحله بعد به رسوب سلولی محلول ۲ اضافه گردید، به مدت 1hr برروی یخ نگهداری شد و سپس تحت امواج ماوراء صوت از نوع میله ای (Ultrasonic, MSE, UK) قرار گرفت. سپس به رسوبی که از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm بدست آمد محلول ۳ افزوده گردید و دوباره سوسپانسیون شد و با استفاده از سانتریفوژ با دور قبلی رسوب ها جدا شد. مرحله شستشو با محلول ۳، ۶-۵ مرتبه تکرار شد تا محلول شفاف روئی شفاف گردید و سپس رسوب حاصل با محلول ۴ شستشو گردید و محلول روئی دور ریخته شد که ممکن است حاوی یکسری آلوده کننده ها باشد. رسوب که حاوی Inclusion bodiesمی باشد در محلول ۵ دوباره سوسپانسیون گردید بعد از نگهداری به مدت نیم ساعت در محیط اتاق به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید، محلول روئی حاوی rgp63می باشد. در اولین مرحله تخلیص از ستون DEAE-Sepharose fast flow - (۱۶/۱۰۰ mm) استفاده گردید (۲۲، ۹). و به ازای هر ml ۱ ر زین DEAE-Sepharose، mg ۱۰-۷ از نمونه پروتئینی به ستون اضافه گردید و سپس با دو حجم از محلول ۵ ستون شستشو شد و سپس با استفاده از محلول ۶ ,rgp63 از ستون خارج گردید. در مرحله بعد فراکسیون های حاوی rgp63 که توسط (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis) SDS-PAGEتائید گردید به ستون (۲۶/۶۰۰ mm) ژل فیلتراسیون Superdex 75 اضافه گردید و بعد از شستشوی ستون با محلول ۵، با ml ۱۰۰ محلول ۷، rgp63 از ستون خارج گردید و سپس با استفاده از کیسه دیالیز با Cut off وزن مولکولی برابر با ۱۲-۱۰ کیلو دالتون که در محلول Urea 8M بود به بافر فسفات با ۷/۲pH منتقل گردید و غلظت پروتئین Lowry (۲۷) و یا Bradford (۲۸) اندازه گیری شد.

تهیه لیپوزومهای حاوی rgp63

لیپوزومهای حاوی rgp63 با روش دهیدراسیون – رهیدراسیون (DRV) تهیه شدند (جدول ۱). به طور

www.SID.ir

Archive of SID

خلاصه در روش DRV (۲۹، ۳۰، ۳۱) اجزای لیپیدی در حلالهای آلی (کلروفرم: متانول، ۲:۱) در یک بالن ته گرد حل گردیدند. حلال های آلی تحت خلاء چرخان توسط دستگاه روتاری (Buchi, Switzerland) تبخیر شد که منجر به نشستن لیپیدها برروی دیوارهٔ ظرف بصورت یک فیلم نازک می شود.

برای اطمینان از تبخیر کامل حلال های آلی، فیلم لیپیدی حاصل به مدت ۲ ساعت در دستگاه (Heto Drywinner, DW3, Allerod, Denmark) Freeze-Dryer در ۵۰°C و فشار ۰/۱ تور (۰/۱mmHg) خشک گردید. سپس آب مقطر به فیلم لیپیدی اضافه شد و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ سانتی گراد تحت تکان های شدید توسط ورتکس (Velp Scientifica Srl, Milan, Italy) Vortex قرار گرفت تا لیپوزومهای چند لایه ای بزرگ (Multilamellar vesicles, MLV) خالی تشکیل شوند. لیپوزومهای خالی MLV به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴۵°C تحت امواج ماوراء صوت ازنوع حمامی (Kerry Ultrasonic, PUI 125, UK) قرار گرفت تا لیپوزومهای MLV به لیپوزوم های تک لایه ای کوچک (Small unilamellar vesicles, SUV) تبدیل شوند. سپس بافر حاوی آنتی ژن rgp63 به SUVهای خالی افزوده شد، مخلوط حاصل توسط نیتروژن مایع فریز گردید و توسط دستگاه Freeze-Dryer در ۵۰ °C و فشار ۰/۱ تور خشک گردید. بعد از اتمام عمل Freeze-Drying فرآورده با یک دهم حجم اولیه SUV آب مقطر هیدراته گردید، این عمل به وسیله ورتکس کردن و سپس قراردادن مخلوط به مدت نیم ساعت در درجه حرارت °C45 انجام گرفت. سپس لیپوزومهای DRV حاوی rgp63 حاصل با بافر PBS به حجم اولیه رسانده شدند.

برای جداسازی آنتی ژن rgp63 محصور نشده از لیپوزومهای DRV هیدراته شده از اولتر اسانتریفوژ (Beckmam Optima 1901,USA) g ×۱۰۰/۰۰۰ بمدت یکساعت استفاده گردید سپس رسوب لیپوزومی در بافر PBS سوسپانسیون گردید. جهت جداسازی کامل rgp63 محصور نشده عمل اولتراسانتریفوژ و شستشو با PBS ، ۲ بار دیگر تکرار شد.

برای تعیین مقدار پروتئین محصور شده در انواع لیپوزومها، از روش اندازه گیری پروتئین بروش Lowry (۲۷) و یا Bradford (۲۸) با استفاده از البومین سرم گاوی (BSA) بعنوان استاندارد استفاده شد. بدین ترتیب که پس از جداسازی آنتی ژن rgp63 محصور نشده از لیپوزومها بوسیله اولترا سانتریفوژ مقدار کل آنتی ژن موجود در مایع شفاف رویی بوسیله اندازه گیری پروتئین تعیین شد و از مقدار کل آنتی ژن استفاده شده برای تهیهٔ لیپوزومها کسر گردید و درصد محصور سازی با استفاده از فرمول ذیل تعیین گردید .

(محصورسازی٪) = (کل rgp63 استفاده شده در تهیه لیپوزوم − rgp63 آزاد موجود در محلول شفاف رویی پس از اولتراسانتریفوژ) / کل rgp63 استفاده شده در تهیه لیپوزوم ×۱۰۰

پس از جداسازی آنتی ژن rgp63 محصور نشده از لیپوزومها و محاسبه درصد محصور سازی (جدول ۱)، رسوبهای لیپوزومی در PBS طوری دوباره سوسپانسیون گردیدند که غلظت آنتی ژن rgp63 درتمام فرمولاسیون ها بصورت ۲μg/100 μl باشد و برای تزریقات لیپوزومهای تازه تهیه شده استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: محدوده اندازه ذره ای و کارآیی محصورسازی فرمولاسیونهای لیپوزومی مختلف حاوی rgp63

نام فرآورده	اجزای لیپیدی (نسبت مولی)	غلظت DPPC (μmol/ml)	محدوده اندازه ذره ای (nm)	کارآیی محصور سازی برای rgp63
Control liposomes	DPPC/Chol (7:2)	16	900-100	-
DRV-DPPC/Chol-rgp63	DPPC/Chol (7:2)	16	950-100	49%
DRV-DPPC/SA/Chol-rgp63	DPPC/SA/Chol (7:2:2)	16	1350-200	52%
DRV-DPPC/DOPE.Chol-rgp63	DPPC/DOPE/Chol(7:1:2)	16	1500-250	51%
DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol-rgp63	DPPC/DOPE/SA/Chol (7:1:2:2)	16	1150-150	46%

آنالیزسدیم دودسیل سولفات پلی‌اکریل آمیدژل الکتروفورز (SDS-PAGE) نمونه های پروتئینی و لیپوزومهای حاوی آنتی ژن

آنالیز SDS-PAGE نمو نه های پروتئینی و لیپوزومهای حاوی rgp63 (پس از جداسازی rgp63 انکپسوله نشده با اولتراسانتریفوژ و سوسپانسیون نمودن رسوب لیپوزومی در PBS) در ژل حاوی ۳٪ آکریل آمید بعنوان ژل متراکم کننده و ۱۰٪ آکریل آمید بعنوان ژل جدا کننده انجام شد (۳۲). بافر الکتروفورز حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۱۹۲ میلی مول گلایسین و ۰/۱ ٪ SDS با pH ۸/۳ بود .

پس از اتمام الکتروفورز ژلها برای ردیابی پروتئین یا باکوماسی بلو و یا نیترات نقره رنگ آمیزی شدند .

برای رنگ آمیزی کوماسی بلو، پس از اتمام الکتروفورز ژل جهت فیکس شدن به محلول حاوی ۲۵٪ ایزوپروپیل الکل و ۱۰٪ اسید استیک در آب منتقل شد (۲ مرتبه هر بار ۳۰ دقیقه). سپس ژل با محلول کوماسی بلو ٪ ۰/۰۵ در ایزپروپانول ۲۵٪، اسید استیک ۱۰٪ و آب ۶۵٪ بمدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس ژل چند بار با آب مقطر شستشو داده شد و با محلول ایزوپروپانول ۱۰٪ و اسید استیک ۱۰٪ در آب رنگ زدایی شد. پروسه رنگ زدایی چندین مرتبه تا ظهور باندهای پروتئینی تکرار شد.

برای رنگ آمیزی با نقره، پس از اتمام الکتروفورز ژل جهت فیکس شدن به محلول متانول ۵۰٪ و اسید استیک ۱۰٪ در آب بمدت یک شب منتقل گردید. سپس ژل با آب مقطر ۳ مرتبه و هر بار ۱۰ دقیقه شستشو داده شد و برای رنگ آمیزی در محلول C ، که با تیترکردن محلول B (مخلوط ۲۱ میلی لیتر NaOH ٪۰/۳۶ و ۱/۴ میلی لیتر محلول آمونیاک غلیظ) با محلول A (۰/۸ گرم نیترات نقره در ۴ میلی لیتر آب مقطر) و همراه با همزدن مداوم (که در ابتدا رسوب قهوه ای رنگ حاصل می گردد ولی پس از هم زدن شفاف می شود) و سپس به حجم رساندن تا ۱۰۰ میلی لیتر حاصل می شود، به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از شستشوی ژل توسط آب مقطر (۲ بار) و غوطه ور نمودن آن در آب به مدت ۲ دقیقه، در محلول ظاهر کننده (1ml اسید سیتریک ۱٪ و ۰/۱ میلی لیتر فرمالدئید ۳۸٪ با همدیگر مخلوط می گردد و با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی لیتر رسانده می شود) قرار داده شد و با آرامی تکان داده شد تا باندهای پروتئینی ظاهر شوند (معمولا ۵ تا ۱۰ دقیقه). پس از ظهور باندها ژل توسط آب مقطر شسته شده و به محلول ۵٪ از اسید استیک منتقل شد تا پروسه رنگ آمیزی متوقف شود.

بررسی میکروسکوپ الکترونی لیپوزوم ها بروش رنگ آمیزی منفی

انواع سوسپانسیون لیپوزومی (۱۰μl) بر روی گریدهای مسی پوشش داده شده با فورموار قرار داده شده و خشک گردیدند و سپس توسط ۱۰μl محلول

www.SID.ir

Archive of SID

فسفوتنگستات سدیم ۱٪ با pH ۷ به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه رنگ آمیزی منفی شدند، بعد از خارج نمودن رنگ اضافی با فیلتر کاغذی، نمو نه ها بوسیلهٔ بررسی میکروسکوپ الکترونی گذرا (LEO 910, Oberkochen, Germany) مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند (۳۳).

واکسیناسیون موشهای BALB/c

موش های BALB/c ماده ۸-۱۲ هفته ای در گروههای ده تایی (کلا ۷ گروه) سه مرتبه با فاصله های سه هفته ای توسط فرآورده های لیپوزومی حاوی r-GP63 (۲ µg / ۱۰۰ µl mouse) (جدول ۱) و rgp63 به تنهایی (PBS-rgp63) با غلظت ۲ µg / ۱۰۰ µl mouse از آنتی ژن در ناحیهٔ پشت بروش زیرجلدی (Subcutaneous, SC) (واکسینه شدند و در ضمن دو گروه به عنوان کنترل منفی شامل لیپوزوم فاقد آنتی ژن (control-liposome) و PBS به میزان ۱۰۰ µl / (SC) دریافت کردند (۶، ۷، ۱۳، ۳۴و۳۵).

آزمون بررسی ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH)

سه هفته پس از آخرین تزریق ایمن سازنده، آنتی ژن r-GP63 (۲ µg / ۵۰ µl mouse) در کف پای چپ موشها بصورت SC تزریق شد و همزمان به کف پای راست موشها PBS به مقدار ۵۰ µl (SC) تزریق گشت. پس از انجام تزریقات ضخامت کف هر دو پای موشها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت با کولیس اندازه گیری شد و اختلاف اندازه در ضخامت کف پای راست و چپ به میلی متر بیان و درصد افزایش ضخامت در کف پای موش با فرمول زیر :

۱۰۰×(ضخامت کف پای کنترل_ضخامت کف پای مبتلا شده)÷ درصد افزایش ضخامت در کف پا

ضخامت کف پای کنترل

حساب شده و در محاسبات آماری مورد استفاده قرار گرفت (۶، ۷، ۱۳، ۳۴ و ۳۵).

آزمون چالش (Challenge) با انگل لیشمانیاماژور

یک هفته پس از انجام تست DTH موشهای BALB/cواکسینه شده، با مقدار µl/mouse ۱ × $۱۰^{۶}$/۵۰ از پروماستیگوتهای انگل لیشمانیاماژور (MRHO/IR/75/ER) در فاز ایستا، در کف پای چپ بصورت SC تحت چالش قرار گرفتند. به کف پای راست هم پنجاه میکرولیتر PBS بصورت SC تزریق شد. موشها بطور هفتگی تحت معاینه قرار گرفتند و میزان ورم و التهاب حاصله در کف پای موشها بوسیله کولیس بمدت ۱۱ هفته اندازه گیری شد. اختلاف اندازه در ضخامت کف پای راست و چپ به میلی متر بیان شده و نهایتا این اندازه با استفاده از فرمول ذکر شده در قسمت DTH بصورت درصد افزایش ضخامت در کف پا بیان شد (۶، ۷، ۱۳، ۳۴و۳۵).

ارزیابی آماری

برای ارزیابی آماری داده ها، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای مشخص شدن همگن بودن انحراف استانداردها انجام گرفت و در صورت همگن بودن انحراف استانداردها آزمون Tukey-Kramer برای مقایسه گروهها بصورت جداگانه انجام شد و $p<0.05$ به منزله معنی دار بودن اختلاف بین دو گروه در نظر گرفته شد .

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

بررسی SDS-PAGE لیپوزومهای حاوی rgp63

آنالیز SDS-PAGE نمونه تخلیص شده آنتی ژن rgp63 را با رنگ آمیزی نقره نشان می دهد. باند مربوط به آنتی ژن rgp63 در فاصله باندهای ۶۷ و ۴۳ کیلو دالتون پروتئین استاندارد قرار دارد و براساس محاسبات R_f وزن مولکولی این نمونه rgp63 ۵۵ کیلو دالتون می باشد. از آنجا که وزن مولکولی پروتئین rgp63 سنتزی در محدوده ۵۸-۵۴ کیلو دالتونی است (۱۵) وجود پروتئین rgp63 تخلیص شده به اثبات می رسد. حساسیت رنگ آمیزی نیترات نقره در حد چند نانوگرم می باشد باتوجه به این SDS-PAGEچون باند واضح دیگری به جز باند rgp63مشاهده نمی شود میزان خلوص rgp63 بیش از ۹۵٪ است.

به منظور اثبات کیفی وجود آنتی ژن rgp63 در لیپوزومها، پس از جداسازی لیپوزومها از محلول شفاف رویی بوسیله اولترا سانتریفوژ، لیپوزومهای حاصل تحت بررسی SDS-PAGE قرارگرفتند . این SDS-PAGE نشان می دهد که باند rgp63 با وزن مولکولی حدود ۵۵ کیلو دالتون در تمام لیپوزوم های حاوی آنتی ژن موجود است باند پروتئینی rgp63 موجود در لیپوزوم ها دقیقا همردیف باندrgp63 خالص در PBS می باشد. هم در فرآورده های لیپوزومی حاوی rgp63 و هم در rgp63 خالص مقدار ناچیزی تجمع های با وزن مولکولی بالا از rgp63 مشاهده می شود که در اثر نگهداری rgp63 و تهیه لیپوزوم های حاوی rgp63 رخ داده است ولی میزان آن ها خیلی کمتر از خود rgp63 مونومر می باشد فرآورده لیپوزومی کنترل (لیپوزوم خالص) فاقد هرگونه پروتئینی می باشد . برای ستونهای ۳، ۴، ۵ و ۶ ژل مقادیر برابر (۱۰ µg) از rgp63 براساس محاسبه درصد محصور سازی انواع لیپوزومها) استفاده شد، برای ستون دوم (rgp63 خالص) مقدار استفاده شده از آنتی ژن (۱۵ µg) بود. باتوجه به این SDS-PAGE انکسپولاسیون و وجود rgp63 پس از جداسازی لیپوزوم ها از rgp63 انکسپوله نشده بوسیله سانتریفوژ در لیپوزوم ها به اثبات می رسد.

بررسی میکروسکوپ الکترونی لیپوزومهای حاویrgp63

مطالعات میکروسکوپ الکترونی برروی لیپوزومهای تهیه شده به روش رنگ آمیزی منفی انجام شد تا مورفولوژی لیپوزومهای تهیه شده با سه روش مختلف مشخص شود. اغلب فرآورده های لیپوزومی DRV از نوع لیپوزومهای تک لایه ای بزرگ (Large Unilamellar Vesicles, LUV)و یا چند لایه ای (Multilamellar Vesicles,MLV) بودند. هم لیپوزومهای کنترل و هم لیپوزوم های حاوی rgp63 سایز ناهمگون داشتند محدوده اندازه ذره ای آنها ۱/۵-۰/۱ میکرون بود (جدول ۱)، ولی بیشتر از ۸۰٪ جمعین لیپوزومها قطر متوسط کمتر از یک میکرون داشتند. محصورسازی آنتی ژن rgp63 در داخل انواع لیپوزومها تاثیری در سایز مورفولوژی لیپوزومها در مقایسه با کنترل لیپوزوم نداشت.

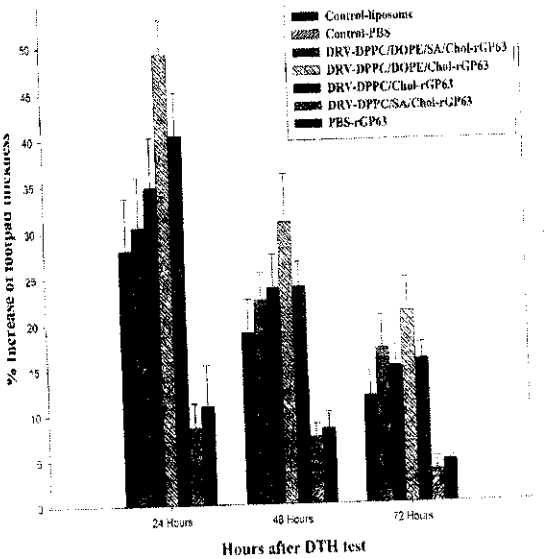
تاثیر لیپوزومهای حاوی rgp63 در پاسخ DTH

با توجه به نمودار ۱ بررسی نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت نشان می دهد که تمام فرآورده های لیپوزومی به تنهایی، بطور بارزی PBS- rgp63 و rgp63حاوی در مقایسه با DTH باعث افزایش پاسخ ($p<0.01$) شده است. PBS گروههای لیپوزوم کنترل و کنترل درصد افزایش ضخامت در کف پای موشها در گروهها DRV-DPPC/SA/Chol-rgp63 ,DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63

www.SID.ir

Archive of SID

DRV-،DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol -rgp63 DDPC/Chol-rgp63 و PBS-rgp63 در مقایسه با گروه کنترل منفی PBS بترتیب ۵/۷۸، ۴/۰۹، ۴/۷۵، ۳/۵۹ و ۳/۲۹ برابر بود. بین گروه های کنترل PBS و لیپوزوم کنترل اختلاف معنی داری وجود نداشت. (P>0.05) اگرچه پاسخ DTH گروه های لیپوزومی مختلف حاوی rgp63 بیش از PBS- rgp63 بود ولی این اختلاف ازنظر آماری بارز نبود (P>0.05) همچنین فرآورده لیپوزومی-DRV DPPC/DOPE/Chol-rgp63 بیشترین پاسخ DTH را داشت (نمودار ۱) .



شکل ۱:پاسخ DTH درموشهای BALB/C بعد از واکسینه شدن با فرآورده های مختلف لیپوزومی حاوی rgp63 ، PBS، کنترل لیپوزوم و PBS-rgp63

شدت پاسخ DTH پس از گذشت ۴۸ساعت اگرچه کمتر از ۲۴ ساعت بود ولی در کل شبیه ۲۴ ساعت بود (نمودار ۱). اختلاف معنی دار در بین تمام گروههای لیپوزومی حاوی rgp63 و PBS-rgp63 با گروههای کنترول وجود داشت . (P<0.05) بین گروههای کنترل و همچنین بین گروههای لیپوزومی حاوی rgp63 و PBS-rgp63 اختلاف معنی داری وجود نداشت .(P>0.05) ولی تاثیر گروه-DRV DPPC/DOPE/Chol-rgp63در ایجاد پاسخ DTHبیشتر از گروههای دیگر بود (نمودار ۱).

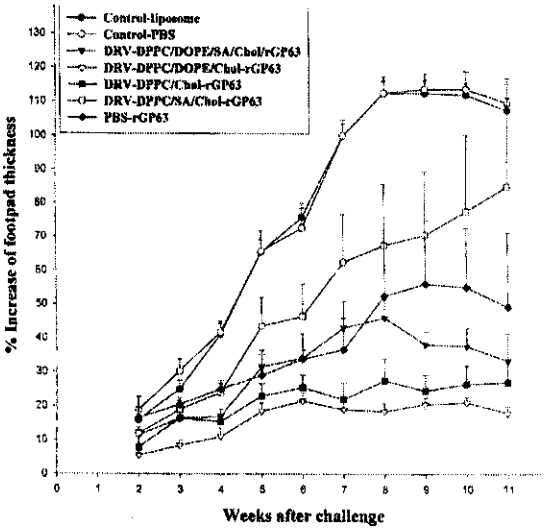
بررسی نتایج پس از گذشت ۷۲ ساعت نشان می دهد تمام گروههای لیپوزومی حاوی rgp63 و rgp63 باعث افزایش پاسخ DTH در مقایسه با گروههای کنترل شده است .(P<0.05) ولی بین گروههای کنترل و گروههای لیپوزومی حاوی rgp63 با خود PBS-rgp63 اختلاف معنی داری وجود نداشت(P<0.05) (نمودار ۱).

تأثیر لیپوزومهای حاوی rgp63 در تست چالش با L.Major

نمودار ۲ روند پیشرفت ضخامت در کف پای موشها را در گروههای مختلف پس از تزریق 1×10^{6} انگل L.Major نشان می دهد. در گروههای کنترل PBS و لیپوزم کنترل (لیپوزم خالی بدون آنتی ژن) ۲ هفته پس از تزریق انگل تورم و زخم در پای موش ها ایجاد و بتدریج پیشرفت نمود. در بین گروه های مختلف دو گروه-DRV DPPC/DOPE/Chol-rgp63 و DRV-DPPC/Chol-rgp63 محافظت نسبتا کامل در مقابل چالش با انگل زنده L.major ایجاد نمودند و از ایجاد و پیشرفت تورم و زخم درکف پای موشها جلوگیری نمودند (نمودار ۲). در این دو گروه در مقایسه با گروههای کنترل میزان تورم حاصل در هفته های متوالی پس از تزریق انگل زنده فوق العاده کم بود. میزان تورم در این دو گروه در هفته یازدهم درمقایسه با گروه کنترل PBS به ترتیب ۸۳/۵۹٪ و ۷۵/۳۸٪ کمتر بود (P<0.001) ولی بین دو گروه ازنظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت(P<0.05) . (نمودار ۲) .

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲: میانگین اندازه زخمها در گروههای مختلف موشهای BALB/C واکسینه شده با فرآورده های مختلف لیپوزومی حاوی rgp63 ،PBS ، کنترل لیپوزوم و PBS-rgp63 پس از چالش با انگل لیشمانیا طی هفته های متوالی

گروه DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol محافظت نسبی درمقابل چالش با انگل زنده L.major ایجاد نمود (نمودار ۲). میزان تورم در پای موشهای این گروه بطور بارزی ($P<0.01$) کمتر از گروههای کنترل بود. میزان تورم در این گروه در هفته یازدهم درمقایسه با گروه کنترل PBS 7/69% کمتر بود ($P<0.01$) (نمودار ۲).

گروه DRV-DPPC/SA/Chol-rgp63 فقط محافظت خیلی کمی درمقابل چالش با انگل زنده L.major ایجاد نمود که ازنظر آماری با گروههای کنترل تفاوت معنی دار نداشت ($P>0.05$) (نمودار ۲). در این گروه میزان تورم در پای موشها روند رو به رشدی را داشت بطوری که بعد از گروه های کنترل بیشترین میزان افزایش در ضخامت کف پا را نشان داد. درضمن میزان تورم در پای موش ها در گروه های DRV-DPPC/Chol-rgp63 ، DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63 و DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol-rgp63 به طور بارزی ($P<0.05$) کمتر از گروه DRV-DPPC/SA/Chol-rgp63 بود.

گروه rgp63 تنها (PBS-rgp63) نیز محافظت نسبی در مقابل چالش با انگل زنده ایجاد نمود (نمودار ۲). میزان تورم در پای موشهای این گروه بطور بارزی ($P<0.05$)کمتر از گروه های کنترل بود، میزان تورم در این گروه در هفته یازدهم در مقایسه با گروه کنترل PBS ۵۵/۲٪ کمتر بود. هم چنین میزان تورم در پای موش ها در گروه های DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63 و DRV-DPPC/Chol.rgp63 به طور بارزی کمتر از گروه های PBS-rgp63 بود .($P<0.05$)

بحث

بطور کلی، ایمنی محافظتی موثر در پاسخ به عفونتهای لیشمانیایی، ایمنی سلولی به واسطه سلولهای T ، CD_4^+ ازنوع Th_1 می باشد. ترکیبات بیولوژیکی حاصل از این سلولهای T فعال شده شامل IL-2، IL-12 و IFN-γ می باشند که باعث محافظت میزبان در مقابل انگل می شود (۲، ۳، ۴، ۵ و۹). لیپوزوم ها ایمیونو ادجوانت های کارآمد برای آنتی ژنهای پروتئینی می باشند و می توانند باعث تحریک پاسخ ایمنی علیه پروتئینها شوند درنتیجه از آنها بطور گسترده ای برای ابداع واکسن استفاده می شود (۱۹). توانایی لیپوزومها برای افزایش دادن پاسخ های ایمنی برای آنتی ژنهای پروتئینی به این ربط داده می شود که لیپوزومها باعث می شوند آنتی ژنها بیشتر در سلولهای ارائه کننده آنتی ژن (Antigen presenting cells, APC)، نظیر انواع ماکروفاژها، جذب شوند و درنتیجه ارائه آنها با سلولهای T بیشتر می شود (۱۸). لیپوزومها به دلیل سایز و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی شان بلافاصله پس از تزریق به عنوان جسم خارجی برای بدن محسوب می شوند و درنتیجه

www.SID.ir

Archive of SID

توسط سیستم رتیکلو اندوتلیال (Reticuloendothelial system, RES) انواع سیستم ماکروفاژ موجود در بدن بلعیده شده و در داخل ماکروفاژها پس از تخریب لیپوزوم آنتی ژن آزاد می شود که دقیقا در محل هدف خودش یعنی APCs می باشد. در واقع لیپوزوم ها باعث هدف گیری غیرفعال (Passive Targeting) آنتی ژنها به سمت سلولهای APC شده درنتیجه باعث افزایش بروز پاسخ ایمنی به آنتی ژن می شوند (۱۸). هدف اصلی این مطالعه تعیین این مطلب بود که آیا لیپوزومها می توانند به عنوان ایمونوادجوانت موثر برای آنتی ژن rgp63 برای تحریک ایمنی سلولی و محافظت موشها در مقابل چالش با انگل زنده عمل کنند و دیگر اینکه در بین فرمولاسیونهای مختلف کدام فرمولاسیون موثرترین ازنظر تحریک ایمنی سلولی می باشد و اثر محافظتی مناسب برای ابداع واکسن علیه لیشمانیوز پوستی را فراهم می آورد. در این مطالعه برای تهیه لیپوزومهای حاوی rgp63 درتمام فرمولاسیون ها DPPC و کلسترول با نسبت مولی ۷:۲ بعنوان پایه فرمولاسیون لیپوزوم استفاده شد و سپس اجزای دیگر به فرمولاسیون اضافه شد تا ویژگیهای خاصی به فرمولاسیون بدهد (جدول ۱). در فرمولاسیون ها به فرمول پایه DRV-DPPC/Chol-rgp63 که لیپوزوم خنثی می باشد در یکی از فرمولاسیونها فسفولیپید DOPE اضافه شد که به فرآورده خاصیت فوزوژنیکی (Fusogenic) می دهد (فرآورده DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63) و افزودن SA به فرمول پایه باعث ایجاد لیپوزوم با بار مثبت می گردد (DRV-DPPC/SA/Chol-rgp63). وجود DOPE در فرمول اخیر باعث می شود تا لیپوزوم با بار مثبت و خاصیت فوزوژنیکی حاصل شود (DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol-rgp63).

دراین مطالعه برای تهیه لیپوزومهای حاوی rgp63 از روش DRV استفاده شد. بطور کلی در این روش لیپوزومهای حاصل معمولا یا لیپووزمهای تک لایه ای بزرگ (LUV) و یا چند لایه ای (MLV) کوچک با محدوده سایز ۲-۰/۱ میکرون می باشند (۲۹، ۳۰، ۳۱). این متد یکی از بهترین روشها برای تهیه لیپوزومهای حاوی پروتئین می باشد چون میزان محصور سازی در این روش بالا است و بسته به فسفولیپید مورد استفاده می تواند تا حدود ۸۰٪ باشد (۳۰). لیپوزومهای DRV حاوی rgp63 تهیه شده در این مطالعه همینطور که در مطالعات میکروسکوپی نشان داده شد، ازنوع LUV و یا MLV کوچک غیرهموژن محدوده اندازه ذره ای (۱/۵-۰/۱ میکرون) می باشند و میزان محصور سازی نسبتا بالا (۵۲-۴۶٪ در فرمولاسیونهای مختلف) داشت (جدول ۱). علت درصد محصورسازی بالا با روش DRV برای مواد محلول در آب به این دلیل است که وقتی SUVهای خالی با آنتی ژن rgp63 مخلوط میگردند و توسط Freez-Dryer منجمد و خشک می شوند، لیپوزوم های خالی دچار شکستگی در ساختمان دو لایه خود می شوند، در این حالت مولکولهای فسفولیپید تشکیل دهنده لیپوزوم در یک حالت خیلی منظم کنار هم می باشند (بجای اینکه تشکیل یک ماتریکس تصادفی را بدهند) ، که در مرحله رهیدراسیون با مقدار کمی آب (معمولا ۱/۱۰ آب اولیه مورد استفاده برای تهیه لیپوزومهای (SUV می توانند هیدراته شده و دوباره تشکیل لیپوزومها ولی بزرگتر را بدهند و آنتی ژن محلول در آب را در بر گیرند (۳۰، ۳۱). علاوه بر این ازنظر حفظ پایداری پروتئین این روش نسبت به روشهای دیگر تهیه لیپوزومها بهتر است (۳۱). در روشهای دیگر تهیه لیپوزوم مثل روش تبخیر حلال Bangham و یا تبخیر فاز معکوس Szoka پروتئین در مجاورت حلالهای

www.SID.ir

Archive of SID

آلی مثل کلروفرم و متانول قرار می گیرد که می تواند باعث دناتوراسیون پروتئین شود ولی در روش DRV پروتئین با SUV های خالی از قبیل تهیه شده مخلوط می گردد، بنابراین در مجاورت حلالهای آلی قرار نمی گیرد .

هدف استفاده از SDS-PAGE در آنالیز نمونه های لیپوزومی حاوی rgp63 این بود که فقط نشان داده شود پس از تهیه لیپوزومها و خالص سازی آنها توسط اولتراسانتریفوژ لیپوزومها حاوی آنتی ژن rgp63 می باشند. روش SDS-PAGE قبلا برای نشان دادن انکپسولاسیون GP63 طبیعی جداسازی شده از پروماستیگوتهای L.major در لیپوزومهای DRV تهیه شده از (Distearoyl phosphatidylcholin DSPC و کلسترول نیز استفاده شده است (۱۳).

در این مطالعه بعنوان مدل موشی لیشمانیوز پوستی از موشهای BALB/c استفاده شد. موش های BALB/c ازنظر ژنتیکی خیلی حساس به عفونت با انگل لیشمانیا میباشند و در صورت عفونت (تزریق زیر جلدی انگل L.major) بتدریج تشکیل زخم های پوستی بزرگی را میدهند که در صورت عدم درمان پس از چندین هفته عفونت ژنرالیزه شده و پس از مدتی باعث مرگ موشها میشود. از طرف دیگر موشهای C57BL/6 و CBA/N ازنظر ژنتیکی مقاوم هستند و دراثر عفونت با انگل لیشمانیا زخمهای کوچک حاصل میشود و سپس سریعا در عرض چند هفته در زخمها یشان بهبودی حاصل میشود. موشهای با نژادهای دیگر ازنظر حساسیت به انگل لیشمانیا بینابینی میباشند (۲).

در این مطالعه برای نشان دادن تاثیر لیپوزوم های حاوی rgp63 ابتدا از تست DTH استفاده شد. تست DTH یک آزمون مناسب برای نشان دادن ایمنی سلولی و همچنین آزمایش معتبر برای محافظت در مقابل لیشمانیازیس است (۵،۶، ۱۷، ۳۵، ۳۶). در این مطالعه تست DTH در تمام فرآورده های لیپوزومی حاوی rgp63 مثبت بود. در بین فرآورده های لیپوزومی، فرمول DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63 بیشترین تاثیر را داشت. بنابراین با تست DTH نتیجه گیری شد که بین تمام گروه ها فرآورده لیپوزومی DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63 که باعث بیشترین پاسخ DTH شد احتمالا بیشتر باعث سوق دادن ایمنی بطرف سلولی شده است و میتواند بیشتر باعث محافظت موش ها در مقابل چالش با انگل زنده شود. فرآورده های لیپوزومی دیگر که باعث پاسخ DTH مثبت کمتر شدند احتمالا کمتر باعث محافظت موشها در مقابل چالش با انگل زنده شوند rgp63.به تنهایی نیز باعث DTH مثبت شد که این مطلب بوسیله سایر محققین نیز نشان داده شده است (۱۷).

به منظور اثبات تاثیر گروهها در محافظت موشها درمقابل لیشمانیوز پوستی درمرحله بعد تست چالش با انگل زنده استفاده شد. در تست چالش با انگل زنده همینطور که انتظار می رفت بیشترین اثر محافظتی را درمقابل لیشمانیوز پوستی فرآورده لیپوزومی DRV -DPPC/DOPE/Chol-rgp63 ایجاد نمود. تاثیر این گروه در محافظت موشها در راستای تست DTH مثبت وقوی برای این فرآورده می باشد. این فرآورده به دلیل وجود DOPE در فرمولاسیون آن اثر fusogenic دارد .DOPE یک فسفولیپیدی است که دارای درجه حرارت عبور فاز (Phase transition temperatue, Tm) ۱۶ C ° - است و وجودش در فرمولاسیون درمقادیر مولی کم خاصیت فیوزژنیک به لیپوزوم میدهد (۳۱، ۳۷، ۴۱). این فسفولیپید به دلیل همین خاصیت فوزوژنیکی که دارد در فرمولاسیون بسیاری از کیتهای لیپوزومی تجاری موجود در دنیا (نظیر Lipofectace, Lipofectamine, Lipofectin, DC-Chol , TFX-50, Cellfectin) که

www.SID.ir

Archive of SID

برای انتقال ژنها (Transfection) به سلول ها استفاده شود وجود دارد (۳۸). در این لیپوزوم ها ی فوزوژنیک معمولا محتویات داخل لیپوزوم بداخل سلول تزریق می شود.

در لیپوزومهای فاقد مواد فوزوژنیک (لیپوزومهای خنثی) معمولا لیپوزوم یا با مکانیسم جذب سطحی و یا اندوسایتوز جذب سلول میشود. بطور کلی در فرمولاسیون های حاوی مواد فوزوژنیک مقدار رساندن مواد انکپسوله شده به سلول بیشتر بوده و پروسه کردن مواد در داخل سلول فرق دارد. در اندوسایتوزیس لیپوزوم جذب شده در انتها وارد لیزوزوم سلول (معمولا ماکروفاژ، و یا دیگر سلول ها) شده و تحت آنزیمهای تخریبی موجود در لیزوزوم تخریب شده و آنتی ژن انکپسوله داخل لیپوزوم نیز تحت عمل پروتئولیز قرار می گیرد و سپس پروسه کردن آنتی ژن داخل سلول (APC) برای پروسه های ایمنی شروع میشود (۳۷).

در لیپوزوم های فوزوژنیک جدار لیپوزوم با جدار ممبران سلولی یکی شده و محتویات لیپوزوم داخل سلول تزریق شده و بنابراین آنتی ژن که با این روش وارد سلول میشود تحت عمل پروتئولیز در لیزوزوم قرار نمیگیرد (۳۷). ولی پس از ورود آنتی ژن بداخل سلول به عنوان جسم خارجی تحت شناسایی قرار گرفته و پروسه کردن آنتی ژن برای شروع پروسه های ایمنی آغاز میگردد.

تاثیر بهتر فرآورده DRV-DPPC/DOPE/Chol-rgp63 در مقایسه با DRV-DPPC/Chol-rgp63 در محافظت موش ها می تواند به این ربط داده شود که فرآورده اول فوزوژنیک میباشد ولی فرآورده دوم خنثی بوده و بیشتر از راه اندوسایتوز جذب می شود، اگرچه اختلاف این دو فرآورده ازنظر آماری زیاد بارز نیست .

فرآورده لیپوزومی DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol- rgp63 تاثیر خیلی کمی در محافظت موش ها در مقابل چالش با انگل زنده داشت و تاثیرش حتی ازخود rgp63 نیز کمتر بود. علت این امر می تواند وجود استئاریل آمین در فرمول این فرآورده باشد که بار مثبت به لیپوزوم می دهد و به طور کلی نشان داده شده است لیپوزوم های با بار مثبت ایمونوادجوانتهای خوبی برای آنتی ژن های پروتئینی محلول برای تحریک ایمنی هومورال در مقایسه با لیپوزوم های خنثی و با بار منفی میباشند (۲۲). افزودن DOPE به فرمول با بار مثبت بالا DRV-DPPC/DOPE/SA/Chol-rgp63 باعث افزایش تاثیر فرآورده شده است که در راستای بحث بالا میباشد.

تاثیر لیپوزوم های حاوی GP63 (خالص شده از پروماستیگوت های L. mexicana) در محافظت موش های CBA/Ca, BALB/c علیه لیشمانیوز پوستی بوسیله سایر محققین نیز گزارش شده است (۶). در این مطالعه آنتی ژنهای GP63 طبیعی و LPG (Leishmania promastigote lipophosphoglycan) در لیپوزوم های تشکیل شده از لسیتین سویا و کلسترول با استفاده از روش انحلال با دترژنت انکپسوله شده اند. در این مطالعه نیز برای تخلیص از اولتراسانتریفوژ (g ۱۰۰۰۰۰) و اثبات وجود GP63در لیپوزومهای تخلیص شده از SDS-PAGE استفاده شده است. این مطالعه نشان داد موشهای واکسینه شده با لیپوزومهای حاوی GP63 (۵ میکروگرم) و LPG (۴ میکروگرم) دو مرتبه با فاصله ۴ هفته، هم باعث واکنش DTH مثبت و هم بطور کامل باعث محافظت موش ها درمقابل چالش با انگل L. mexicana شده است (۶). تاثیر لیپوزومهای حاوی GP63 تخلیص شده از L. major علیه لیشمانیوز پوستی در مطالعه دیگر نیز نشان داده

www.SID.ir

Archive of SID

شده است (۱۳). در این مطالعه لیپوزومهای حاوی آنتی ژنهای L.major بوسیله روش DRV با استفاده از نسبتهای مولی مساوی DSPC و کلسترول تهیه شده اند و با استفاده از روش های-SDS PAGEو ایمیونوبلات (Western blot) نشان داده اند که اگرچه این لیپوزوم ها با آنتی ژنهای تام L. major تهیه گردیده اند ولی به صورت ترجیحی GP63و LPG در این لیپوزوم ها انکپسوله شده اند. همچنین در تست چالش با انگل زنده نشان دادند که این لیپوزومهای حاوی GP63 و LPG در محافظت موشهای BALB/C علیه لیشمانیوز پوستی کاملا موثرند (۱۳) .

مطالعه حاضر همچنین نشان داد که rgp63 به تنهائی قادر به ایجاد پاسخ DTH مثبت ومحافظت نسبی درمقابل چالش با انگل زنده می شود. تست DTH مثبت و محافظت نسبی درمقابل چالش با انگل زنده بوسیله rgp63 توسط سایر محققین نیز نشان داده شده است (۱۷) . در این مطالعه نشان داده شده است که میمونهای Vervet بدنبال واکسیناسیون با ۵۰ میکروگرم از rgp63 (۳مرتبه با فاصله دو هفته ازهم) به همراه BCG (بعنوان ایمونوادجوانت جهت سوق دادن ایمنی بطرف سلولی) پاسخDTH مثبت ازخود بروز می دهند. همچنین وقتی این میمون های واکسینه شده با پروماستیگوت های L.major تحت چالش قرار گرفتند فقط بصورت نسبی باعث محافظت در مقابل لیشمانیوز پوستی شدند (۱۷). مطالعه حاضر نشان داد که rgp63 حتی بدون BCG شده باعث بروز پاسخ DTH مثبت و محافظت نسبی درمقابل چالش با انگل زنده می شود که مبین این می تواند باشد که خود مولکول به تنهایی قادر است تا حدودی باعث القاء ایمنی سلولی در موشها و محافظت در مقابل لیشمانیوز پوستی شود.

لیپوزومها هم چنین به عنوان حاملهای ایمونوادجوانت برای آنتی ژن های لیشمانیا جهت پیشگیری از لیشمانیوز احشائی نیز استفاده شده اند (۳،۴و۵). در یک مطالعه لیپوزومهای خنثی تهیه شده از لسیتین تخم مرغ و کلسترول با روش تبخیر حلال که حاوی آنتی ژن های لیشمانیای استخراج شده از غشای L. donovani بودند باعث پاسخ DTH مثبت و محافظت نسبی موش های BALB/c در مقابل لیشمانیوز احشائی شده است (۵) . در یک مطالعه دیگر توسط همین گروه ولی با استفاده از لیپوزوم های با بار مثبت تهیه شده از لسیتین تخم مرغ، کلسترول و استئاریل آمین (جهت ایجاد بار مثبت در سطح لیپوزومها) با نسبتهای مولی ۷: ۲: ۲ با روش تبخیر حلال که حاوی آنتی ژنهای لیشمانیای استخراج شده از غشای L. donovani بودند تاثیر محافظتی بیشتری در مقایسه با لیپوزومهای خنثی در موشهای BALB/c در مقابل لیشمانیوز احشائی داشت، این موشها نیز پاسخ DTH مثبت ازخود نشان داده اند (۳) . ازطرف دیگر لیپوزومهای با بار منفی تهیه شده از لسیتین تخم مرغ، کلسترول و فسفاتیدیک اسید (فسفولیپید با بار منفی جهت ایجاد بار منفی در سطح لیپوزومها) با نسبتهای مولی ۷: ۲: ۲ با روش تبخیر حلال که حاوی آنتی ژنهای لیشمانیای استخراج شده از غشای L. donovani بودند تاثیر محافظتی کمتری در مقایسه با لیپوزوم های با بار مثبت و خنثی در موشهای BALB/c در مقابل لیشمانیوز احشائی داشت، اگرچه این موش ها نیز پاسخ DTH مثبت ازخود نشان داده اند (۴). این مطالعات نشان می دهد که نوع بار موجود در سطح لیپوزوم ها در ایجاد نوع ایمنی و تاثیر حفاظتی لیپوزوم ها درمقابل لیشمانیوز احشائی نیز موثر است و لیپوزوم های با بار مثبت بیشتر باعث تحریک پاسخ ایمنی محافظتی درمقابل لیشمانیوز احشائی می شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه حاضر فرمولاسیون های حاوی SA طراحی شد تا لیپوزوم های با بار مثبت حاصل شود و اثر ایمونوادجوانتی محافظتی لیپوزوم ها در برابر لیشمانیوز پوستی همانند لیشمانیوز احشایی (مطالعه انجام شده توسط گروه Afrim و3 Ali و ۴ و۵) افزوده شود ولی به طور آشکارا با این عمل نتیجه عکس گرفته شد و افزودن SA به فرمولاسیون های لیپوزومی باعث کاهش تاثیر مصونیت زایی فرآورده ها نسبت به لیشمانیوز پوستی شد. اختلاف اثر لیپوزوم های با بار مثبت این مطالعه با مطالعه انجام شده توسط گروه Afrin و Ali (۳) می‌تواند به دلایل مختلف باشد. اول از همه در مطالعه انجام شده توسط گروه فوق از لیستین تخم مرغ برای تهیه لیپوزوم استفاده شده است درحالی که در مطالعه انجام شده حاضر از DPPC استفاده شد. لیستین تخم مرغ حاوی مجموعه ای از فسفولیپیدی های شامل فسفاتیدل کولین (فسفولیپید خنثی)، فسفاتیدیل اتانول آمین (فسفولیپید خنثی)، فسفاتیدیل سرین (فسفولیپید با بار منفی) و فسفا تیدیل اینوز یتول (فسفولیپید با بار منفی) می باشد که این دو فسفولیپید با بار منفی به تنهایی می توانند در لیپوزومهای تشکیل شده از لیستین تنها بار منفی به لیپوزوم بدهند (۳۱، ۳۹) و اضافه نمودن استئاریل آمین SA به فرمولهای تهیه شده از لیستین دقیقا مشخص نیست مثبت که درنهایت بار خالص روی لیپوزوم مثبت خواهد بود یا منفی. ولی در مطالعه حاضر از DPPC که یک فسفولیپید خنثی صناعی کاملا خالص می باشد استفاده شد و اضافه نمودن SA در فرمولهای حاوی DPPC بطور حتم باعث ایجاد لیپوزومهای با بار منفی می شود. تفاوت دیگر مطالعه حاضر با مطالعه گروه Afrin و Ali طریقه ایمونیزاسیون می باشد. در مطالعه گروه فوق (۳) برای ایمونیزاسیون از تزریق داخل صناعی استفاده شده است در حالی که در این مطالعه از طریقه زیر جلدی استفاده شد. بعضی مطالعات نشان داده اند که طریقه تزریق در میزان مصونیت حاصل دخیل می باشد (۳۴). از طرف دیگر بعضی محققین دیگر نشان داده اند که لیپوزومهای با بار مثبت بیشتر در القاء ایمنی هومورال موثرند تا ایمنی سلولی (۲۲) و برخی دیگر اثبات نموده اند لیپوزومهای با بار منفی در ایجاد ایمنی سلولی موثرترند (۴۰). اختلاف مهم دیگر مطالعه گروه Afrin وAli با این تحقیق در نوع آنتی ژن است. در این مطالعه از آنتی ژن خالص rgp63استفاده شده در حالی که در مطاله گروه فوق (۳) از آنتی ژن خام استخراج شده از غشاء L.Ionovaniاستفاده شده است که می تواند شامل طیف وسیعی از آنتی ژن ها باشد .

نتیجه گیری کلی

بطور خلاصه مطالعه حاضر نشان داد که لیپوزوم های خنثی تشکیل شده از DPPC و کلسترول و حاوی درصد کمی DOPE به عنوان فوژونیک می تواند ایمونوادجوانت موثر برای rgp63 برای تحریک ایمنی سلولی و ایجاد مصونیت برعلیه لیشمانیوز پوستی باشد و این فرآورده می تواند بعنوان یک واکسن کاندید علیه سالک باشد .

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که در تامین بودجه این تحقیق دخیل بوده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1- Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect, Clinics in Dermatology, 1996, 14: 425-431.

2- Handman E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development, Cli. Mic. Rev. 2001, 14: 229-243.

3- Afrin F., Ali N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by Leishmania donovani antigens encapsulated in positively charged liposomes, Infect. Immun. 1997, 65: 2371-2377.

4- Afrin F., Anam K., Ali N., Induction of partial protection against Leishmania donovani by promastigote antigens in negatively charged liposomes, J. Parasitol. 2000, 86: 730-735.

5- Ali N., Afrin F., Protection of mice against visceral leishmaniasis by immunization with promastigote antigen incorporated in liposomes, J. Parasitol. 1997, 83: 70-75.

6- Russell D.G., Alexander J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes, J. Immunol. 1988, 140: 1274-1279.

7- Barral-Netto M., Reed S.G., Sadigursky M., Sonnefeld G. Specific immunization of mice against Leishmania mexicana amazonensis using solubilized promastigotes, Clin. Exp. Immun. 1987, 67: 11-19.

8- Mirsa A., Dube A., Srivastava B., Sharma P., Srivastava J.K., Katiyar J.C., Naik S. Successful vaccination against Leishmania donovani infection in Indian langur using Alum-precipitated autoclaved Leishmania major with BCG, Vaccine, 2001, 19: 3485-3492.

9- Mcsorley S., Proudfoot L., O'Donnell C.A., Liew F-Y. Immunlogy of murine leishmaniasis, Clinics in Dermatology, 1996, 14: 451-464.

10- Macdonald M.H., Morrison C.J., McMaster W.R. Analysis of the active site and activation mechanism of the Leishmania surface metalloproteinase GP63, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1253: 199-207.

11- Russell D.G., Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of leishmania promastigotes in attachment to macrophages, J. Immunol. 1986, 136: 2613-2621.

12- Hey S.A., Theander T.G., Hviid L., Mazrati S.M., Kemp M., Kharazmi A. The major surface glycoprotein (gp63) from leishmania major and leishmania donovani cleaves CD4 molecules on human T cells, J. Immunol. 1994, 152: 4542-4548.

www.SID.ir

Archive of SID

13- Kahl L.P., Lelchuk R., Scott C.A., Beesley J. Characterization of Leishmania major antigen/liposemes that protect BALB/c mice against cutaneous leishmaniasis. Infec. Immun. 1990, 58: 3233-3241.

14- Russo M.D., Burns J.M., Carvalho E.M., Armitage R.J., Grabstein K.H., Button L.L., McMaster W.R., Reed S.G. Human T cell responses to gp63, a surface antigen of leishmania, J. Immunol. 1991, 147: 3575-3580.

15- Botton L.L., McMaster W.R. Molecular cloning of the major surface antigen of Leishmania, J. Exp. Med. 1988, 167: 724-9.

16- Xu D., Liew F.Y. Genetic vaccination against leishmaniasis, Vaccine, 1994, 12: 1534-1536.

17- Olobo J.O., Anjili C.O., Gicheru M.M., Mbati P.A., Kariuki T.M., Githure J.I., Koech D.K., McMaster W.R. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniosis using recombinant Leishmania 'major surface glycoprotein' (gp63). Vet. Para. 1995, 60: 199-212.

18- Gregoridis G., Immunological adjuvants: A role for liposomes. Immunoloy Today, 1990, 11: 89-97.

19- Gregoridis G., in Liposomes in drug delivery: Liposomes as immunological adjuvants for peptide and protein antigens, Gregoridis G., Florence A.T., Patel H.M. Ed.; Hardwood Academic Publishers, Berkshire, UK, 1993, 77-94.

20- Phillips N.C., Gagne L., Ivanoff N., Riveau G. Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens. Vaccine, 1996, 14: 898-904.

21- Phillips N.C., Emili A., Enhanced antibody response to liposome-associated protein antigens: preferential stimulation of IgG2a/b production. Vaccine, 1992, 10: 151-158.

22- Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsuml Y., Kubo K., Nakagawa S., Forward H., Hamaoka T., Mayumi T., Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins. Biochim. Biophy. Res. Com., 1997, 240: 793-797.

23- Sugimoto M., Ohishi K., Fukasawa M., Shikata K., Kawai H., Itakura H., Hatakana M., Sakakibara R., Ishiguro M., Nakata M. Oligomannose-coated liposomes as an adjuvant for the induction of cell- mediated immunity. FEBS- Lett., 1995, 363: 53-56.

24- Toda S., Ishii N., Okada E., Kusakabe K.I., Arai H., Hamajima K., Gorai I., Nishioka K., Okuda K. HIV-1-spcific cell–mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by

www.SID.ir

Archive of SID

anti- interferon gamma antibody. Immunology, 1997, 92: 111-117.

25- Fortin A., Shahum E., Krzystyniak K., Therien H.M. Differential activation of cell- mediated immune functions by encapsulated and surface-linked liposomal antigens. Cell. Immunol., 1996, 169: 208-217.

26- Fries L.F., Gordon D.M., Richards R.L., Egan J.E., Holingdale M.R., Gross M., Silverman C., Alving C.R. Liposomal malaria vaccine in humans: A safe and potent adjuvant strategy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, 88: 358-362.

27- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265-275.

28- Bradford M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. Analyt. Biochem., 1976, 72: 248-254.

29- Kirby C., Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. Biotechnology, 1984, 2: 979-984.

30- Gregoriadis G., Davis D., Davies A. Liposomes as immunological adjuvants: antigen incorporation studies. Vaccine, 1987, 5: 145-151.

31- New R.R.C., Liposomes: a practical approach, Oxford University Press, Oxford, 1997, 33-85.

32- Weber K. et al. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 1969, 244: 4406-4412.

33- Jaafari M.R., Foldvari M. P0 protein mediated targeting of liposomes to melanoma cells with high level of ICAM-1 expression. J. Drug Targeting, 1999, 7: 101-112.

34- Kahl L.P., Scott C.A., Lelchuk R., Gregoriadis G., Liew F.Y. Vaccination against murine cutaneous leishmaniasis using Leishmania major antigen/liposemes: optimization and assessment of the requirement for intravenous immunization. J. Immuol., 1989, 142: 4441-4449.

35- Scott P., Pearce E., Natovitz P., Sher A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model: Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. J. Immunol., 1987, 139: 221-227.

36- De Rossel R.A., Bray R.S., Alexander J. The correlation between delayed-type hypersensitivity, lymphocyte activation and protective immunity in experimental murine leishmaniosis. Parasit. Immunol., 1987, 9: 105-115.

www.SID.ir

Archive of SID

37- Foldvari M., Faulker G.T., Mezei C., Mezei M. Interaction of Liposomal drug delivery systems with cells and tissues: Microscopic studies. Cells and Materials, 1992, 2: 67-85.

38- Lasic D.D., Liposomes in gene delivery, CRC Press, New York, 1997, 85-89.

39- Parfitt K., Martindale: The complete drug reference, 32 edition, Pharmaceutical Press, Taunton, MA, 1999, 1595-1595.

40- Aramaki Y., Suda H., Tsuchiya S. Interferon-gamma inductive effect of liposomes as an immunoadjuvant. Vaccine, 1995, 13: 1809-1814.

41- Kono K., Iwamoto M., Nishikawa R., Yanagie H., Takagishi T. Design of fusogenic liposomes using a poly(ethylene glycol) derivative having amino groups, J. Cont. Rel. 2000, 68: 225-235.

www.SID.ir