Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید صدوقی یزد
دوره سیزدهم، شماره پنجم، زمستان ۱۳۸٤، صفحات ۵۸-۵۰

# اثر حفاظتی ویتامین D3 و کنژوگه GP63 و توکسوییدکزاز بر ایجاد زخمهای جلدی لیشمانیایی در موش BALB/c

آرزو کرمانی جلیلوند[1] ، دکتر احمد زواران حسینی[2*] ، دکتر علی فتاحی بافقی[3] ، سارا صعودی[4]

## چکیده

**مقدمه:** GP63 پروتئاز اصلی سطح پروماستیگوتهای لیشمانیا است که در بیماریزایی آن نقش مهمی دارد. از آنجا که به تنهایی قادر به ایجاد محافظت مؤثر علیه لیشمانیوز نمی‌باشد، هدف این تحقیق بررسی اثر حفاظتی کنژوگه GP63 و توکسوییدکزاز به همراه ویتامین D3 در موشهای حساس BALB/c در مقابل لیشمانیوز پوستی می‌باشد.

**روش بررسی:** این پژوهش مطالعه‌ای بنیادی – کاربردی و به روش تجربی است که از مهر ماه ۱۳۸۱ تا خرداد ۱۳۸۳ در دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. ما $۱۰^{۹} \times ۵$ لپتوموناد Leishmania (L.) Major سویه [MRHO/IR/75/ER] را کشت دادیم. ملکول GP63 با روش افینیتی کروماتوگرافی تخلیص گردید و با توکسوییدکزاز کنژوگه شد و برای ایمن‌سازی در ۸ گروه از موشهای ماده BALB/c استفاده شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد موشهایی که کنژوگه و ویتامین D3 دریافت کردند از لحاظ افزایش اندازه قطر زخم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P\leq0.05$). در کشت طحال نیز نشان داده شد که در این گروه بیماری سیستمیک نگردیده است.

**نتیجه گیری:** بنابراین کنژوگاسیون GP63 با توکسوییدکزاز که باعث تقویت ایمنی سلولی است و به کار بردن آن همراه با ویتامین D3 که محرک فعالیت ماکروفاژهاست می‌تواند نوید بخش تولید یک فراورده مناسب علیه لیشمانیوز باشد.

**واژه‌های کلیدی:** لیشمانیا ال. ماژور ، GP63 ، ویتامین D3 ، توکسوییدکزاز، اثر حفاظتی، موش BALB/c

## مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری آندمیک در چندین بخش جهان شامل آمریکای مرکزی، آسیا و آفریقا است که توسط تک یاخته‌ای از گروه تاژکداران ایجاد می‌گردد و با گزش پشه خاکی آلوده منتقل می‌گردد. حداقل ۴۰۰ میلیون نفر در دنیا در خطر ابتلا به این بیماری هستند و حدود ۱۲ میلیون فرد مبتلا وجود دارد. این بیماری طیفی از لیشمانیوز پوستی خود بهبود یابنده تا لیشمانیوز احشایی کشنده دارد. لیشمانیوز پوستی یا سالک به صورتی که در دنیای قدیم مشاهده می‌شود توسط لیشمانیاهای متعلق به کمپلکس ترو‌پیکا ایجاد می‌شود. عامل لیشمانیوز جلدی در دنیای جدید گونه‌هایی از لیشمانیا مکزیکانا هستند. هر سال

۲*- نویسنده مسئول: - استاد گروه ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی، ص پ ۱٤۱۱۵-۳۳۱
تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱-۰۲۱ داخلی ۳۰۹۰ ، نمابر: ۸۸۰۰۷۸۳۰-۰۲۱
E-mail: zavarana@modares.ac.ir
۱- کارشناسی ارشد ایمونولوژی،دانشگاه تربیت مدرس
۳- استادیار علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
٤- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸٤/۹/۳

www.SID.ir

Archive of SID


حدود ۱/۵ میلیون مورد لیشمانیوز جلدی ایجاد می‌شود که بیش از ۹۰ درصد آن در افغانستان، ایران، عراق، عربستان سعودی و سوریه در دنیای قدیم و پرو در دنیای جدید است[۱،۲،۳].

درمان دارویی، حشره‌کش و واکسن مناسبی علیه این بیماری وجود ندارد. با وجود این افرادی که از لیشمانیوز بالینی بهبود می‌یابند مصونیت مؤثری علیه عفونت مجدد در آنها ایجاد می‌شود و این موضوع نشان می‌دهد که تهیه واکسن امکان‌پذیر است[۴].

گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی (GP63)، پروتئین اصلی سطحی پروماستیگوتهای لیشمانیا است و به علت فراوانی آن و خصوصیت متالوپروتئینازی آن نشان داده شده که در بیماریزایی لیشمانیا نقش دارد. GP63 در تمام گونه‌های لیشمانیا بسیار محافظت شده است[۵]. ملکول GP63 نقش مهمی در چسبیدن پروماستیگوتها به ماکروفاژ ایفا می‌کند و چسبیدن از طریق این لیگاند باعث بیگانه‌خواری و ورود انگل به ماکروفاژ می‌شود. GP63 باعث تسریع تبدیل C3b به iC3b در سطح انگل می‌شود که به‌عنوان اپسونین برای لیشمانیا عمل می‌کند و اتصال آن را به رسپتور نوع ۳ کمپلمان (CR3) که رسپتور غالب برای بلعیدن متاسایکلیک‌ها است تسهیل می‌کند[۶،۷،۸].

اثر حفاظتی این ملکول در چندین آزمایش با استفاده از سویه‌های مختلف موش آزمایش شده و در بین واکسنهای زیر واحد آنتی‌ژن بیشتر از همه مورد آزمایش قرار گرفته است[۹،۱۰]. اما GP63 به تنهایی قادر به ایجاد محافظت کامل علیه لیشمانیوز نمی‌باشد[۱۱،۱۲]. از طرف دیگر واکسنهای کنژوگه امروزه بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند زیرا یک ترکیب منفرد قادر به ایجاد یک پاسخ کاملاً مؤثر نمی‌باشد زیرا بیش از یک نوع سلول باید تحریک شود که یک پاسخ ایمنی آغاز شود. به‌طور مثال پلی‌ساکاریدهای کپسولی بسیاری از باکتریها اگر به یک پروتئین حامل مثل توکسوییدکزاز (TT) کنژوگه شوند. پپتیدهای لازم برای شناسایی توسط سلولهای T مختص آنتی‌ژن فراهم می‌شود و پاسخ غیروابسته به سلول T به یک پاسخ وابسته سلول T تبدیل می‌شود[۱۳].

از طرف دیگر ویتامین D3 (۱ و ۲۵ – دی هیدروکسی ویتامین D3) تمایز منوسیت ها به ماکروفاژ را القا می‌کند و فعالیت فاگوسیتوز آنها را افزایش می‌دهد[۱۴] و فعالیت سایتوتوکسی‌سیتی ماکروفاژها را می‌افزاید[۱۵]. از آنجا که ماکروفاژها هنگامیکه توسط سایتوکاینها فعال می‌شوند، NO تولید می‌کنند، در کنترل عفونت نقش دارند[۱۶].

هدف ما در این تحقیق خالص سازی آنتی‌ژن GP63 و کنژوگه کردن آن با توکسوییدکزاز به‌عنوان حامل ملکول و استفاده از آن به همراه ویتامین D3 برای تهیه فراورده‌ای با کارایی مناسب، ارزیابی اثر حفاظتی فراورده تهیه شده در موش حساس آزمایشگاهی BALB/c وبررسی اینکه آیا این کنژوگه به همراه ویتامین D3 قادر به فعال کردن سیستم ایمنی موشهای BALB/c و مقاوم کردن آنها نسبت به عفونت بوده است.

## روش بررسی

این پژوهش مطالعه‌ای بنیادی – کاربردی به روش تجربی است که از مهر ۱۳۸۱ تا خرداد ۱۳۸۱ توسط گروه ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس طی ۷ مرحله انجام پذیرفت:

**۱- کشت و جمع‌آوری انگل Leishmania (L.) Major سویه خاص ایران:**

Leishmania (L.) Major سویه ایران در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FCS (Sigma) به میزان انبوه کشت داده شد. پروماستیگوتهای جمع‌آوری شده بعد از سه بار شستشو با PBS ۰/۱۵ مولار (pH=۷/۲) در g × ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد و به انگلها مقدار ۳ml RPMI-1640 اضافه گردید و پس از گذراندن زنجیره سرد در ۷۰°C- تا زمان استفاده نگهداری شد. در این مطالعه با این روش ۵ میلیارد لپتومونادفرم لگاریتمی جمع‌آوری گردید.

**۲- تخلیص GP63 با افینیتی کروماتوگرافی**

انگلهای جمع‌آوری شده را پس از رسیدن به دمای محیط در دو لوله ریخته و ۲ بار با PBS ۰/۱۵ مولار(pH۷/۲) در g ×۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در بافر Tris-HCl ( Sigma ) یک میلی‌مولار (pH=۷/۲) حاوی مهارکننده پروتئاز PMSF (Sigma) ۹ مرتبه منجمد و ذوب شد


www.SID.ir

Archive of SID


سپس پروماستیگوتهای لیز شده ۳۰ دقیقه در دور g × ۴۵۰۰۰ در دمای ۴°C با اولتراسانتریفوژ (Sorval combi plus) سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و به رسوب حاصل بافر تریس ۱ mM (pH=۷/۲) حاوی سدیم آزاید (MERCK) ۰/۰۲ درصد و فسفولیپاز C (Sigma) افزوده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷°C داخل انکوباتور (GALLENKAMP) قرار داده شد. سپس این محصول با دور g × ۴۵۰۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب آن جدا و مایع رویی برای کروماتوگرافی افینیتی نگهداری شد.

ستونی (Pharmacia) به ابعاد (۱/۴ cm × ۱۰)، ژل Con-A Sepharose (Sigma) در آن ریخته شد و با mM Tris – HCl ۱ (pH=۷/۲) شستشو یافت سپس با ریختن آهسته و تدریجی مایع رویی حاصل از تغلیظ و آزادسازی پروتئین‌های انگل بر روی ستون کار تخلیص ملکول GP63 در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول بافر Washing (تریس (Sigma) mM ۲۰ با pH=۷/۲ ، کلرید کلسیم (MERCK) و کلرید منیزیم (MERCK) mM ۱ و CHAPS (MERCK) ۰/۱ درصد) به‌عنوان ۲ برابر حجم ستون با جریان عبوری ml/h ۴ از ستون عبور داده شد و در مرحله بعد بافر Eluting (تریس M ۰/۰۵ با pH=۷/۲ ، کلرید کلسیم و کلرید منگنز (MERCK) M ۰/۱ مولار و کلرید سدیم (MERCK) M ۰/۱ به میزان ۳ برابر حجم ستون با جریان عبوری ml/h ۴ از ستون عبور داده شد[۵،۱۰،۱۷].

با روش برادفورد غلظت پروتئین تعیین شد[۱۸]. مشخص گردید GP63 ۱۰۰ µg تخلیص گردید. برای اثبات خلوص GP63 از روش PAGE برای مشخص کردن تعداد اجزای پروتئینی، SDS-PAGE برای تعیین وزن ملکولی پروتئین و رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (MERCK)[۱۹] و DOT-ELISA برای نشان دادن GP63 خالص با آنتی‌بادی منوکلونال ضد GP63 (تهیه شده از انستیتو پاستور) و anti-mouse IgG کنژوگه با HRP (SUNTEB Co. AP7170) و سوبسترای دی آمینو بنزیدین (Biogen) استفاده گردید[۲۰].

**۳- کنژوگاسیون GP63 و توکسویید کزاز**

ابتدا توکسویید کزاز (تهیه شده از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) و GP63 در برابر تریس M ۰/۱ دیالیز شدند. با روش گلوتارآلدیید با کمی تغییرات به صورت زیر کنژوگاسیون صورت گرفت:

ابتدا GP63 ۲ ml (۳۰ µg/ml) و ۱ ml توکسویید کزاز (µg/ml ۱۲۰) به علاوه ۲۵ µl گلوتارآلدیید ۲۵٪ (Sigma) در بشر ریخته شد و روی همزن مغناطیسی (Pars Azma Co) به مدت ۲ ساعت در ۴°C در تاریکی قرار داده شد سپس ۱۰۰ µl گلایسین (MERCK) ۵ mg/ml به آن افزوده شد و ۲۰ دقیقه دیگر روی همزن مغناطیسی داخل یخچال گذاشته شد[۲۱]. برای جداسازی کنژوگه از سایر ترکیبات از روش ژل فیلتراسیون با استفاده از ژل سفاکریل S-300 (Pharmacia) و بافر تریس mM ۰/۱ با جریان عبوری ml/h ۴ استفاده گردید و با دستگاه جمع‌آوری نمونه (Pharmacia) فراکشن‌ها جمع‌آوری گردید.

**٤- ایمن‌سازی موشها**

موشهای ماده BALB/c ۶ تا ۸ هفته ای به وزن ۲۵-۳۰ گرم(تهیه شده از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) در ۸ گروه ۵ تایی تقسیم شدند و مواد زیر را در دو ناحیه زیر بغل به‌طور زیر جلدی دریافت کردند:

گروه ۱ : بافر M ۰/۱ Tris – HCl ، گروه ۲ : TT ، گروه ۳: ادجوانت کامل فروند (CFA) (Sunteb Co) ، گروه ۴ : ویتامین D3 (داروپخش) (µg ۸۰۰) داخل صفاقی، گروه ۵ : GP63 (۵ µg) در µl ۵۰ بافر تریس M ۰/۱+µl ۵۰۰ CFA، گروه ۶ : GP63 (۵ µg) در µl ۵۰۰ بافر تریس M ۰/۱ + µl ۵۰۰ CFA + µg ۸۰۰ ویتامین D3، گروه ۷ : کنژوگه (۵ µg) در µl ۵۰۰ بافر تریس M ۰/۱ + µl ۵۰۰ CFA ، گروه ۸ : کنژوگه (۵ µg) در µl۵۰۰ بافر تریس M ۰/۱ و ویتامین D3 (µg ۸۰۰ داخل صفاقی) + µl ۵۰۰ CFA[۱۲] .

۲ هفته بعد به موشها همین مقادیر تزریق شد فقط ادجوانت ناقص فروند (Sunteb Co) به جای ادجوانت کامل فروند جایگزین شد.

**۵- آلوده کردن موشها**

۴ هفته بعد از تزریق دوم، تعداد $10^6$ پروماستیگوت فرم Stationary در قاعده دم موشها تزریق شد و از زمان ظهور ندول


www.SID.ir

Archive of SID



و زخم، وزن و قطر زخم موشها به‌طور هفتگی تا سیر کامل بیماری ثبت گردید.

**٦- بررسی سیستمیک شدن بیماری**

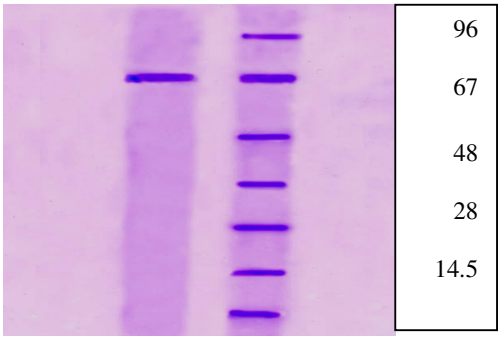
برای این منظور در هفته ۱۴ و ۱۵ از شروع زخم موشهایی به‌طور تصادفی از همه گروهها انتخاب شدند و طحال آنها داخل محیط NNN در شرایط استریل انداخته شد و در انکوباتور ۲۵°C نگهداری گردید و بعد از ۷۲ ساعت از نظر حضور انگل مورد بررسی قرار گرفت.

## آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از روشهای آماری مقایسه چندگانه مثل آزمون Tukey HSD و روش Repeat Measure مانند آزمون Hotelling's Trace برای نتایج به دست آمده در محیط in vivo استفاده شد و $P<0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

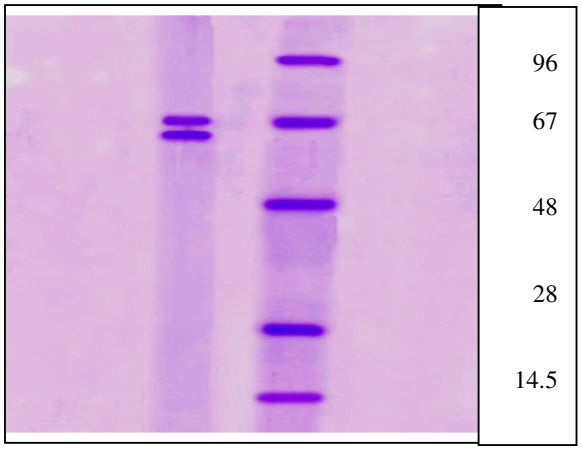
## نتایج

در این مطالعه $۵ \times ۱۰^{۹}$ انگل فرم لگاریتمی جمع‌آوری گردید و از این تعداد انگل، میزان ۱۰۰ µg GP63 تخلیص گردید. پس از تخلیص و تغلیظ GP63 ابتدا برای مشخص نمودن تعداد اجزای پروتئینی در شرایط طبیعی ( بدون احیای نمونه) از روش PAGE با رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل و ظهور باندها تک باند مشاهده گردید و این نشان دهنده خلوص پروتئین بودکه در شکل ۱ تصویرآن پس از رنگ آمیزی آمده است.




**شکل ۱ : CBBR-250 Stained PAGA gel . سمت راست نمونه استاندارد، سمت چپ GP63 قبل از احیا**

شکل ۱ : CBBR-250 Stained PAGA gel . سمت راست نمونه استاندارد، سمت چپ GP63 قبل از احیا برای تعیین وزن ملکولی پروتئین موردنظر از روش SDS-PAGE با رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو استفاده شد که بعد از ظهور باندها و برآورد وزن ملکولی دو ایزوفرم ۶۳ و ۶۷ کیلودالتونی مشاهده گردید که حاصل احیای پروتئین بودند که در شکل ۲ تصویر آن آمده است.




**شکل ۲ : CBBR-250 Stained SDS-PAGE . سمت راست نمونه استاندارد، سمت چپ GP63 بعد از احیا**

برای نشان دادن خلوص GP63 روش DOT-ELISA به کار رفت که یک روش نیمه کمی است و رنگ تولید شده را می توان با چشم دید و در اینجا فاز جامد به جای پلیت پلی استیرن، کاغذ نیتروسلولز است. در این روش برای نشان دادن GP63 خالص از آنتی بادی مونوکلونال ضد GP63 و anti-mouse IgG کنژوگه با HRP و سوبسترای دی آمینو بنزیدین استفاده گردید و پس از ظهور رنگ مشاهده گردید که هر چه غلظت GP63 بیشتر بود رنگ بیشتری ظاهر شد که تصویر آن در شکل ۳ آمده است.

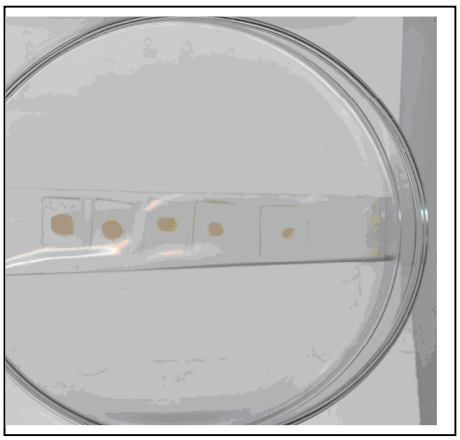
پس از مشخص شدن خلوص GP63 با توکسوییدکزاز کنژوگه شد و کنژوگه با روش ژل فیلتراسیون در ستون حاوی سفاکریل S-300 از سایر مواد جدا گردید که میزان جذب فراکشنهای جمع‌آوری شده توسط دستگاه جمع‌آوری فراکشن از ستون سفاکریل S-300 ، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید.



www.SID.ir

Archive of SID

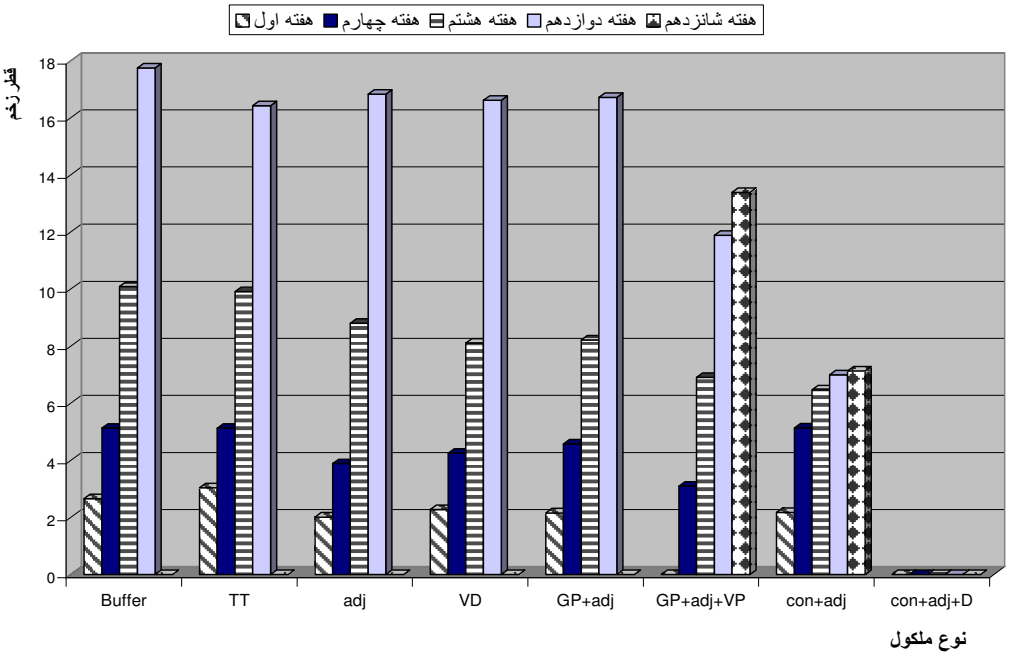




**شکل ۳: DOT-ELISA GP63 از راست به چپ با افزایش غلظت GP63 پررنگ‌تر می‌شود.**

بعد از به دست آوردن کنژوگه GP63 و توکسویید کزاز ایمن سازی و آلوده کردن موشها انجام شد. از زمان شروع ندول و زخم از هفته سوم پس از آلوده‌سازی موشها وزن موشها به طور هفتگی با ترازوی (Sartorious) اندازه‌گیری شد و این کار تا سیر کامل بیماری ادامه یافت. در مقایسه میانگین وزن موشها در طی ۱۶ هفته از شروع زخم گروه ۸ که کنژوگه و ویتامین D3 دریافت کردند با گروه هایی که بافر، TT، ادجوانت، ویتامین D3 و GP63 دریافت داشتند اختلاف معنی‌دار نشان دادند. ($P\leq 0.05$) که در نمودار ۱ نتایج به صورت هر چهار هفته یک بار آمده است.

از زمان شروع ندول و زخم از هفته سوم پس از آلوده‌سازی موشها قطر زخم موشها با کولیس ورنیه (China) اندازه گیری شد و این کار تا سیر کامل بیماری ادامه یافت. در مقایسه میانگین قطر زخم موشها در ۱۶ هفته از شروع زخم گروهی که کنژوگه و ویتامین D3 دریافت کردند هیچ زخمی ایجاد نکردند و با ۷ گروه دیگر اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P\leq 0.05$). در این ۷ گروه در ۳۵ موش بیماری بصورت سیستمیک در آمد و در هفته بیست و چهارم تمام این موشها مردند. در نمودار ۲ نتایج به صورت هر چهار هفته یک بار آمده است.



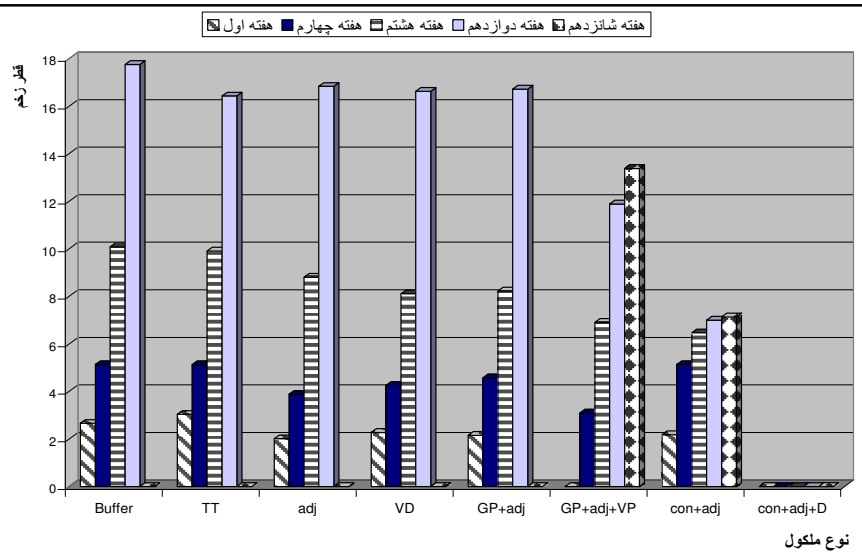

**نمودار۱: میانگین وزن گروههای مختلف موشهای BALB/c برحسب گرم در طی ۱۶ هفته پس از شروع زخم**



www.SID.ir

Archive of SID






**نمودار۲: میانگین قطر زخم گروههای مختلف موشهای BALB/c بر حسب میلی متر در طی ۱۶ هفته پس از شروع زخم**

## بحث

از آنجا که آخرین تلاشها جهت تهیه واکسن مؤثر علیه لیشمانیوز به نتیجه مطلوب نرسیده است بنابراین تحقیقات در این زمینه ادامه دارد. از جمله این تحقیقات استفاده از ملکول مؤثر و فراگیر سطح انگل است که در بیماری زایی نقش مؤثر دارد [۲۳ و۲۲]. ولی ملکول GP63 خالص به تنهایی قادر به ایجاد پاسخ حفاظتی کامل علیه لیشمانیوز نمی‌باشد [۲۴، ۱۳،۱۲].

از طرف دیگر واکسنهای کنژوگه به خصوص در مورد ملکولهای پلی‌ساکاریدی و گلیکوپروتئینی امروزه مورد توجه محققین قرار گرفته است از جمله این تحقیقات، وسلز و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که اتصال پلی‌ساکاریدهای استرپتوکوک گروه B تایپ V به توکسوییدکزاز قادر به ایجاد پاسخهای مؤثر و محافظت کننده علیه این میکروارگانیسم بوده است [۲۴]. دوی و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند اتصال پلی‌ساکاریدهای کریپتوکوکوس نئوفرمانس به توکسوییدکزاز قادر به ایجاد محافظت علیه این میکروارگانیسم بوده است [۲۵]. کارلسون و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند اتصال پلی‌ساکاریدهای کپسولی استرپتوکوک گروه B تایپ V قادر به ایجاد محافظت علیه این میکروارگانیسم بوده است [۲۶].

در ضمن توکسوییدکزاز یک آنتی‌ژن بی‌ضرر بوده و به‌عنوان واکسن علیه کزاز در تمام افرادی که بر ضد این بیماری واکسینه می‌شوند استفاده می‌گردد. بنابراین ما در این تحقیق ملکول GP63 را با توکسوییدکزاز کنژوگه کردیم و همراه ویتامین D3 به کار بردیم. زیرا همانطور که تحقیقات نشان داده‌اند ویتامین D3 ، کشتن مایکوباکتریوم بویس را توسط افزایش تولید NO می‌افزاید و نیز بیان کردند که افزودن ویتامین D3 به کشت‌های منوسیت / ماکروفاژ آلوده به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس رشد باکتری و درصد سلولهای زنده باکتری را می‌کاهد [۲۷]. همچنین نشان داده شده است که ویتامین D3 در محل التهاب برای محدود کردن فعالیت سلولهای T و برای فعال کردن سلول کشی ماکروفاژها عمل می‌کند [۱۵].

در مطالعه‌ای که توسط آغولی و همکاران در سال ۱۳۷۶ صورت گرفت نشان داده شد که گروهی از موشها که غلظت ۸۰۰ µg ویتامین D3 و لیشمانیا را ۲۴ ساعت قبل از کشت ماکروفاژهای صفاقی دریافت کردند اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان دادند [۲۸]. در این تحقیق نیز همین غلظت به صورت in vivo براساس وزن موش به‌طور داخل صفاقی تزریق شد و براساس مقایسات و مطالعات آماری نشان داده شد که گروهی از موشها که کنژوگه و ویتامین D3 دریافت کردند اختلاف معنی‌داری از لحاظ اندازه قطر زخم با سایر گروهها داشتند ($P\leq0.05$) و هیچ زخمی در آنها ایجاد نشد و در بررسی سیستمیک شدن بیماری


www.SID.ir

Archive of SID


هم انگلی در محیط کشت دیده نشد اما در گروهی از موشها که GP63 تنها دریافت کردند روند بیماری مثل گروه دریافت کننده بافر بود و در گروههایی که GP63 و ویتامین D3 و کنژوگه بدون ویتامین D3 دریافت داشتند روند گسترش و کاهش وزن هر دو وجود داشت و با اینکه این روند کندتر بود و اندازه زخمها از یک حدی بزرگتر نشد ولی بیماری سیستمیک شد و موشها در نهایت تلف شدند.

## نتیجه‌گیری

متصل کردن ملکول GP63 که به تنهایی قادر به برانگیختن پاسخ حفاظتی کامل علیه لیشمانیا نمی‌باشد به یک ملکول حامل مثل توکسویید کزاز که فعال کننده سیستم ایمنی سلولی می‌باشد و به کار بردن آن همراه ویتامین D3 که محرک فعالیت ماکروفاژ است می‌تواند نویدبخش تولید یک فراورده مناسب علیه لیشمانیوز به منظور پیشگیری از ایجاد عفونت باشد.

## *References*


*1-* Versa P.S.T, Brodskyn C.I, Balestieri F, Freitas L, Romas A, Queiroz A. ***Adhfr-ts Leishmania Major Knockout Mutant Cross-protects Against Leishmania Amazonensis***. Mem Inst Oswado Cruz, Riode Janeiro 1999; 94(4): 491-496.

*2-* Hepburn N.C. ***Cutaneous Leishmaniasis. ClinicalDermatology.*** 2000; 25: 363-370.

*3-* Hey A.S, Theander T.G, Hviid L, Hazrati S.M, Kemp M, Kharazm A. ***The Major Surface Glycoprotein (GP63) from Leishmania Major and Leishmania Donovani Cleaves CD4 Molecules on Human T cells.*** Journal of Immunology. 1994; 152: 4542-4549.

*4-* Tapia E, Perez-Jimenez E, Lopez-Fuertes L, Gonzalo R, Gherardi M.M, Esteban M. ***The Combination of DNA Vectors Expressing IL-12 + IL-18 Elicites High Protective Immune Response Against Cutaneous Leishmaniasis after Priming with DNA-P63/LACK and Cytokines, Followed by a Booster with a Vaccina Virus Recombinant Expressing P63/LACK.*** Microbes and Infection. 2002; 5: 73-84.

*5-* Brittingham A, Chen G, McGwrie B.S, Chang K, Mosser DM. ***Interaction of Leishmania GP63 with Cellular Receptors for Fibronectin.*** Infection and Immunity. 1999; 67(9): 4477-4484.

*6-* Brittingham A, Morrison C.J, McMaster W.R, McGwire B.S, Chang K.P, Mosser DM. ***Role of the Leishmania Surface Protease GP63 in Complement Fixation, Cell Adhesion and Resistance to Complement-Mediated Lysis. Journal of Immunology.*** 1995; 155(6): 3102-3111.

*7-* Russell D.G, William H. ***The Involvement of the Major Surface Glycoprotein (GP63) of Leishmania Promastigotes in Attachment to Macrophages.*** Journal of Immunology. 1986; 136(7): 2613-2620.

*8-* Bogdan C, Rollinghoff M. ***The Immune response to Leishmania : Mechanisms of Parasite Control and Evasion.*** International Journal for Parasitology. 1998; 28: 121-134.

*9-* Walker P.S, Scharton-Kersten T, Rowton ED,



www.SID.ir

Archive of SID


Hengge U, Bouloc A, Udey M.C, Vogel J.C. ***Genetic Immunization with Glycoprotein 63 cDNA Results in a Helper T cell Type 1 Immune Response and Protection in a Murine Model of Leishmaniasis.*** Human Gene Therapy. 1998; 9(13): 1899-1908.

***10-*** Paraguai de Souza E, Bernardo R.R, Palatnik M, ***Palatnik de Sousa C.B. Vaccination of Balb/c Mice Against Experimental Visceral Leishmaniasis with the GP63 Glycoprotein Antigen of Leishmania Donovani .*** Vaccine. 2001; 19: 3104-3115.

***11-*** River D, Bovay P, Shah R, Didisheim S, Mauel J. ***Vaccination Against Leishmania Major in a CBA Mouse Model of Infection: Role ofAadjuvants and Mechanism of Protection.*** Parasite Immunology. 1999; 21: 461-473.

۱۲- فتاحی بافقی علی. ***ارزیابی پاسخهای ایمنی سلولی بر ضد مولکولهای LPG و GP63 تخلیص شده از : Leishmania (L.) major در موش BALB/c و بیماران انسانی بهبود یافته و بهبود نایابنده،*** پایان‌نامه دکتری رشته انگل‌شناسی، ۱۳۸۲ : ۷۶-۸۶.

***13-*** Janeway C.A, Travers P, Wal ort M, Shlomchik M. J. ***Immunobiology the immune system in health and disease.*** USA. Garland Publishing. 2001; 5th edition: 581.

***14-*** Clavreul A., D'hellencourt C.L, Montero-menei C, Potron G, Couse D. ***Vitamin D Differentially Regulates B7.1 and B7.2 Expression on Human Peripheral Blood Monocytes.*** Immunology. 1998; 95: 272-277.

***15-*** Rigby W.F.C. ***The Immunobiology of Vitamin D.*** Immunology Today. 1988; 57: 159-163.

***16-*** Kharazi S., Zavaran H.A., Tiraihi T. ***The Role of Over Production of Nitric Oxide in Apoptosis of BALB/c Mice Macrophages Infected with Leishmania Major in Vitro.*** Iranian Journal of Allergy Asthma and immunology. 2003; 2(4): 209-214.

***17-*** James D, Bangs D. A, Ranson M. N, Gary C, Hooper N.M. ***In Vitro Cytocidal Effects on Trypanosoma Brucei and Inhibation of Leishmania Major GP63 by Peptidomimetic Metaloproteas Inhibitors.*** Molecular and Biochemical Parasitology. 2001; 57: 159-163.

***18-*** Bradford M.M, Thrope R. ***Immunochemistry in Practice. Britain***, Cambridge University Press. 1990, 2nd edition: 252-266.

۱۹- مصطفایی علی. ***راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل.*** تهران، انتشارات تزکیه، ۱۳۷۸ ؛ ۴۰-۹۳.

***20-*** Gores J. ***Immunochemical Techniques Laboratory.*** 1993, Manul Ed. Academic.

***21-*** Aslem M, Alastair D. ***Bioconjugation protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences.*** USA, Mc millian Reference Ltd: 41-43.

***22-*** Joshi P.B, Kelly B.I, Kamhawi S, Sacks L, McMaster W.R. ***Targeted Gene Deletion in Leishmania Major Identifies Leishmanolysin (GP63) as a Virulance Factor***. Molecular and Biochemical Parasitology. 2002; 120: 33-40.

***23-*** River D, Shah R, Bovey P. ***Vaccine Development Against Cutaneous Leishmaniasis Subcutaneous Administration of Radioattenuated parasite Protects CBA Mice Against Virulant Leishmania Major Challenge.*** Parasite Immunology. 1993; 15: 75.

***24-*** Wessels M.R, Paoletti L.C, Pinel J, Kasper D.L. ***Immunogenicity and protective Activity in Animals of Type V Group B Streptococcal Activity in Animals of Type V Group B Streptococcal polysaccaride-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine***. Journal of Infective disease. 1995; 4: 879-884.

***25-*** Devi S. J. ***Preclinical Efficacy of a***


www.SID.ir

Archive of SID


***Responses of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells by 1,25-Dihydroxy Vitamin D3.*** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2001; 8(6): 1204-1212.

۲۸- آغولی محمود. ***بررسی اثر ویتامین D3 و اینترفرون گاما، بر تکثیر لیشمانیا ماژور و تولید نیتریک اکساید (NO) در ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c به روش In vitro***. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته انگل‌شناسی، ۱۳۷۶ : ۱۰۶-۱۰۷.

***Glucuronoxylomannan-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine of Cryptococaus Neoformans in Murine Model***. Vaccine. 1996; 14(13): 1298.

***26-*** Carlsson R, Claesson B.A, Käyhty H. ***Studies on a Hib-tetanus Toxoid Conjugate Vaccine, of Administration Route and of Combined Administration with an Inactivated Polio Vaccine***. Vaccine 2000; 18: 468-478.

***27-*** Waters W.R, Nonnecke B.J, Rahner T.E. ***Modulation of Mycobacterium Bovis-Specific***


www.SID.ir