Archive of SID

بررسی ایمنی زایی موشهای BALB/c با سارولیشمانیا درمقابل عفونت ناشی از لیشمانیا ماژور

*دکتربهرام کاظمی ، *دکتر محمد بیات، ** فرزانه لبیبی

*مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

** گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

خلاصه

در این تحقیق به منظور بررسی کسب مقاومت احتمالی موشهای بالب سی به روش لیشمانیزاسیون با سویه غیر بیماری زا، پروماستیگوت سارولیشمانیا (سارولیشمانیا) که برای پستانداران غیر بیماری زا است، به موشهای فوق تزریق شد. تحقیق به روش تجربی صورت پذیرفت. انگل سارولیشمانیا که از خزنده ای به نام آگاما کوکازیکا میکرولپیس جدا شده است ، در محیط کشت تکثیر شد و تعداد چهارصد هزار پروماستیگوت زنده سارولیشمانیا به هر یك از ۲۸ موش بالب سی به صورت زیر جلدی تزریق شد و بعد از ۲۰ روز دز یاد آور دریافت کردند. ورود پروماستیگوت به ماکروفاژهای صفاق با آسپیراسیون مایع صفاق و مشاهدات میکروسکوپی تایید شد. گروه شاهد۲۰ سر موش از همان نوع بود که هیچ گونه تیماری روی آنها انجام نشد. سپس به همه موشها لیشمانیا ماژور تزریق شد. بعد از گذشت ۳۰ روز از تزریق لیشمانیا ماژور از ۵ سر از موشهای گروه تجربی و شاهد نمونه خون گرفته و کشت داده شد و ریه ، طحال و قلب تعدادی از آنها مورد معاینه میکروسکوپی قرار گرفت. موشهای گروههای شاهد و تجربی از نظر وجود یا عدم وجود زخمهای جلدی احتمالی به روش t-test مقایسه شدند. از ۲۸ موش گروه تجربی فقط در یکی زخم جلدی ایجاد شد. درکشت نمونه خون و احشای موشهای تجربی مورد بررسی انگل مشاهده نشد، ولی در شاهد مشاهده شد. در همه موشهای گروه شاهد زخم جلدی ایجاد شد ($P > ۰/۰۰۰$) و در کشت خون موشهای گروه شاهد انگل مشاهده شد. تزریق انگل سارولیشمانیا به موشهای بالب سی موجب بروز مقاومت در برابر لیشمانیا ماژور شد .

کلمات کلیدی : سارولیشمانیا، لیشمانیا ماژور، ایمنی زایی، موش بالب سی

مقدمه

لیشمانیوزجلدی (به خصوص لیشمانیا ماژور) بیماری مشترك انسان و دام و یك مشکل بهداشتی است. هرچند نتایج مطالعاتی که برای تعیین شیوع عفونت انسانی در مناطق خاص انجام شده از نظر زمانی و مکانی قابل تعمیم نیست اما بر اساس استقراء اطلاعات موجود، لیشمانیازیس جلدی درحدود ۳۵۰ میلیون نفر را در دنیا تهدید می کند و سالانه درحدود ۱۲ میلیون نفر در مخاطره هستند و یك میلیون نفر مبتلا می شوند (۱۹). عامل این بیماری تك یاخته ای از راسته کینتوپلاستیدا (Kinetoplastida) است که انگل جانوران وحشی است (۳). در زندگی این انگل دو میزبان نقش دارد، یك پشه خاکی (ناقل) که شکل تاژك دار انگل در آن دیده می شود و یك جانور پستاندار که شکل بدون تاژك انگل در آن تکامل می یابد و انسان به طور اتفاقی در چرخه زندگی این انگل قرار می گیرد. بعد از بهبودی ضایعات لیشمانیوز جلدی بافت جوشگاهی (Scar) باقی می ماند. تلاشهای گسترده ای برای پیشگیری از بیماری توسط محققین انجام گرفته است که می‌توان لیشمانیزاسیون (۲) و استفاده از سویه های غیر بیماری زا را نام برد (۱۱). هدف این تحقیق بررسی کسب مقاومت احتمالی موشهای بالب سی در برابر لیشمانیوز تزریق شده به روش لیشمانیزاسیون با سویه

www.SID.ir

Archive of SID

غیربیماری زای پروماستیگوت سارولیشمانیا است. این سویه برای پستانداران بیماری زا نیست.

مواد و روش کار

این تحقیق به صورت Interventional–Experimental انجام شد. انگل سارولیشمانیا از کشت خون قلب خزنده ای به نام آگاما کوکا زیکا میکروله‌پیس ازمنطقه شاهرود استان سمنان جدا شده است (۱). برای نگهداری انگل درآزمایشگاه از محیط کشت NNN و برای کشت انبوه آن از محیط $RPMI_{1640}$ با ۲۰ درصد سرم گوساله جنینی (۹) استفاده شد و شمارش پروماستیگوت انگل به کمك لام توما انجام گرفت. باتوجه به اینکه موش بالب سی (BALB/c mouse) به لیشمانیا ماژورحساسیت زیادی نشان می دهد (۱۰)، در این تحقیق از این نوع موش استفاده شد. تعداد ۴۸ سر موش بالب سی نر و ماده با سن چهار هفته به صورت تصادفی به دو گروه تجربی (۲۸سر) و شاهد (۲۰سر) تقسیم شدند. به منظور لیشمانیزاسیون تعداد چهارصد هزار پروماستیگوت زنده سارولیشمانیا به صورت زیرجلدی (Subcutaneous) درانتهای دم همه موشهای گروه تجربی تزریق شد و ۲۰ روز بعد هر حیوان یك دز یاد آور (Booster dosc) در یافت نمود. لازم به ذکر است که برای بررسی توانایی حمله انگل به ماکروفاژهای میزبان، سلولهای صفاق موش با تزریق نیم میلی لیترگلیسرول یا تیوگلیکولات حساس شدند. دو روز بعد پروماستیگوت زنده سارولیشمانیا داخل صفاق تزریق شده و ۲، ۴، ۶ و ۱۲ ساعت بعد مایع صفاق آسپیره گردید و با عدسی ۴۰× میکروسکوپ مشاهده شد. تضعیف سیستم ایمنی موش به کمك Hydrocortison sodium succinate انجام گرفت. هیچ گونه تیماری روی موشهای گروه شاهد انجام نشد، در ادامه به همه موشهای گروههای شاهد و تجربی لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/ 64/ Nadim1) تزریق شد. سی روز بعد از تزریق از ۵ سر موشهای گروه تجربی و شاهد نمونه خون گرفته شد و در محیط کشت NNN کشت داده شدند. سپس این موشها کشته شدند و نمونه هایی از قلب و طحال آنها مورد مطالعه قرار گرفتند. همه موشهای گروههای شاهد و تجربی از نظر وجود زخم لیشمانیایی جلدی کنترل شدند. موشهای دچار زخم جلدی گروههای شاهد و تجربی با روش t- test با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

از ۲۸ موش گروه تجربی فقط در یك موش زخم جلدی مشاهده شد(X=۰/۰۳۵ و SD= ۰/۱۸۸) ولی در همه موشهای گروه شاهد زخم ایجاد شد(X= ۱ و SD= ۰) و آزمون t- test این ارقام را نشان داد: T=۱۱۸/۳ و P= ۰ که نمایانگر اختلاف معنی دار بین دو گروه شاهد و تجربی می باشد.

بحث

ایمنی سلولی میزبان مسئول مقاومت بدن در مقابل لیشمانیوز(جلدی و احشایی) است و مشاهده شده که بین تست جلدی دیررس (Delayed skin test) و بهبودی عفونت در انسان و حیوان ارتباط وجود دارد. تست حساسیت جلدی منفی نشانه اشکال منتشر و غیر بهبود یابنده بیماری است. مثبت شدن پاسخ تست جلدی در بیماران مبتلا به کالا آزار هندی بعد از بهبودی با کسب ایمنی علیه عفونت همراه است (۱۲). این مطالعه نشان می دهد که سارولیشمانیا با ورود به سلولهای رتیکولواندوتلیال و تخریب آنها حفاظت متقاطع در برابر لیشمانیا ماژور ایجاد می کند. پدیده حفاظت متقاطع بین گونه های لیشمانیا توسط Gicheru و همکاران در مورد حفاظت میمون Vervet در برابر لیشمانیا دونوانی گزارش شده (۶)، همچنین مطالعاتی توسط Manson Bahr و Heish در مورد حفاظت متقاطع لیشمانیا دونوانی توسط لیشمانیا آدلری انجام گرفته است(۱۱). پدیده واکنش متقاطع (Cross-Reaction) بین گونه های لیشمانیا از نظرسرولوژی گزارش شده است (۴، ۷، ۸، ۱۶).

احتمالاً آنتی ژنهای لیشمانیا ماژور و سارولیشمانیا اپی توپ های مشترکی روی T-cell ها دارند (۶). واکنش سلولی

www.SID.ir

Archive of SID

متقاطع بین گونه های لیشمانیا بـا مطالعـه حساسیت دیـررس (۱۲) و در in vitro توسط Nurit و Jafee (۱۳) نشان داده شده است. سیستم ایمنی موشها ی بالب سی که سارولیشمانیا و نیز دز یادآور دریافت داشته اند، تحریك شـد، یعـنی انـگل وارد ماکروفاژها شده و مدت زیادی به سیسـتم ایـنی عرضـه گردیده است. در نتیجه سیستم ایمنی مانع ورود انـگل لیشـمانیا ماژوربه ماکروفاژ شده و از بروز زخم جلوگیری کرده اسـت. با وجودی که موشهای بالب سی در برابرلیشمانیا ماژورحساس هستند (۱) اما موفـق بـه جلـوگیری از عفونـت شـده اسـت، درحالی که درموشهای شاهد زخـم بروزکـرده اسـت. اتصـال پروماستیگوت به ماکروفاژ در in vitro (۱۵) و در in vivo (۱۴) مطالعه شـده اسـت و یـك آنـتی ژن عمـده روی سـطح پروماستیگوت و آماستیگوت نیز معرفی شده است(۵).

در مطالعه‌ای به ۵۰ نفر داوطلـب پروماسـتیگوت کشـت ۵ روزه لیشمانیا آدلـری (سارولیشـمانیا) را بـه صـورت زیـر جلدی و داخل جلـدی تزریـق نمودنـد (۱۴). در سـه نفـر آنهـا ندولهایی ایجاد شد که بعد از یك هفته ندولها کوچك شـده، ولی به مدت یك ماه ندولهای کوچك شده باقی ماندند. یك هفته بعد از تزریق توانستند پروماستیگوت لیشـمانیا را از کشـت مـایع سروزیته ندول محل تزریق درمحیط NNN جدا کنند(۱۴).

با تستهای سرولوژی اشتراك آنتی ژنی بین لیشمانیا آدلـری (سارولیشمانیا) و لیشـمانیاهای دیـگر را تعیـین نمـوده ونشـان داده اند که لیشـمانیا آدلـری بـا لیشـمانیا دونـوانی ، لیشـمانیا اینفانتوم، لیشمانیا برازیلینسیس و لیشمانیا تروپیکا آنتی ژنهـای مشترك دارد (۱۶).

گزارش شده که بین لیشمانیاهای انسان و خزندگان واکنش متقاطع وجود دارد. آنها پروماستیگوت لیشمانیای خزنده را بـه صورت زیر جلدی به افراد داوطلب تزریق نمودنـد کـه درمحـل تزریق یك واکنش آلرژیك ایجاد گردید. واکنش مشابهی در دو فردی که از زخم شرقی بهبود یافته بودند، مشاهده شد امـا در افراد کنترل که به سـالك (زخـم شـرقی) مبتـلا نشـده بودنـد واکنش مشاهده نگردید(۱۸). Outhgate و Manson Bahr منطقه ای را در کنیا مورد مطالعه قرار دادند کـه درآن منطقـه کالا آزاردیده نشده بود، ولی تعداد زیـاد افـرادی را بـا تسـت لیشمانین مثبت مشاهده نمودند (۱۷).

نتیجه گیری

تزریق انگل سارولیشمانیا به موشهای بالب سـی موجـب بروز مقـاومت در برابـر لیشـمانیا مـاژور گردیـد و پیشـنهاد می شود که به جای کاربرد انگل کامل از فراکشنهای آنتی ژنی آن استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه متبوع که بودجه این تحقیق را تامین نمودند، قدردانی می شود.

منابع

۱. کـاظمی بهـرام ، تحویلـدار بیـدرونی، هـاشمی فشـارکی سیدرضا، جوادیان عزت الدین، ۱۳۷۸، لیشمانیای مارمولك در ایران، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ضمیمـه شماره ۲، سال هفتم ، ۶۸-۶۳.

۲. محقـق حضـرتی صـالح، ۱۳۶۶، ارزشـیابی لیشمانیزاسـیون، پایان نامه برای دریافت MPH دانشکده بهداشـت دانشگاه علوم پزشکی تهران.

3. Beaver P. C., Jung R. C., Clinical Parasitology, 9th edition, Lea & Febigen, Philadelphia ,1984 , p. 55-100.
4. Bray R. S., Immunodiagnosis, in: Cohen S., Sadun E.(eds), Immunology of parasitic infection, Blackwell Scientific Publication, 1982, 60 - 70.
5. Colomber G., 1985, A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of Leishmania spp., J. Exp. Med., 162: 902– 916.
6. Gicheru M. M., Olobo J. O., Anjilic O., 1997, Heterologos protection by Leishmania donovani for Leishmania major infection in the Vervet monkey model of the disease, Exp. Parasitol., 85: 109 - 116.
7. Harith A. E., Kolk A. H., Kager O. A., Leewen bure G. L., Muigai R. and Laurme, 1986, A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral Leishmaniasis, Trans. Soc. Trop. Med. Hyg., 48: 422-427.
8. Jaffe C. I., Zalis M., 1985, Use of purified parasite protein from Leishmania donovani for rapid serodiagnosis of visceral Leishmaniasis., J. Infec. Dis., 157: 1212- 1220.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Jaffe C., 1989, The cultivation and cloning of Leishmania, in: Morel C. M.(ed), Genes and antigens of parasites , 47-90.
10. Kahl L. P., Scott C. A., Leichuk R., Gregoriadis G., Liew F. Y., 1989, Vaccination against murine cutaneous Leishmaniasis by using Leishmania major antigen /liposome, J. Immunology, 147: 4441- 4449.
11. Manson B., Heish R. B., 1961, Transient infection of man with a Leishmania of lizard (L. adleri), Ann. Trop. Med. Parasitol., 55:381-382.
12. Mauel J., Behm R., Leishmaniasis, Immunity, immunopathology and immunodiagnosis, in: Cohen S., Sadun E.(eds), Immunology of parasitic infection, Blackwell Scientific Publication, 1982, 299-354.
13. Nurit R., Jaffe C. L., 1993, Pure protein protect from Leishmania donovani protect mice against both cutaneous and visceral Leishmaniasis, J. Immunol., 150: 2322 - 2330.
14. Olobo J. O., Mutinga M. J., 1983, Uptake of promastigotes of lizard Leishmania spp. and Leishmania donovani by mouse peritoneal macrophage, Acta Tropica, 40: 89 - 91.
15. Rizvi F., 1988, The major surface protein of Leishmania promastigotes is a fibronectin - like molecule, European J. Immunology, 18:473 - 476.
16. Southgate B. A., 1967, Leishmania adleri and natural immunity, J. Trop. Med. Hyg., 70:33-6.
17. Southgate B. A., Manson - Bahr P. L. C., 1961, Studies in the epidemiology of east African Leishmaniasis 4 . The significance of the positive leishmania test, J. Trop. Med. Hyg., 70:29-32.
18. Latyshev N. I., Kryukova A. P., 1955, The genetic relationship between various spacies of Leishmania, Tropical Disease Bulletin, 52 (6) : 522-523.
19. WHO, 1990, Control of Leishmaniasis. Technical report series, No.793.

www.SID.ir

Archive of SID

during chick embryo development. A using lectin affinity and a high resolution chromatography study, Eur. J. Biochem., 149:433-460.

5. Faraggiana T., Villari D., Jagirdar J., Patie J., 1986, Expression of sialic acid on the alveolar surface of adult and fetal human lungs, J. Histochem. Cytochem., 34: 811- 816.
6. Fenderson B. A., Eddy E. M., Hakomori S. I., 1990, Glycoconjugate expression during embrygenesis and its biological significance, Bio. Essary., 12: 173-179.
7. Gheri G., Gheri Beryx S., Sgambati E., Gulisano M., 1993, Characterization of the glycoconjugate sugar residues in developing chick esophageal epithelium, Histol. Histopathol., 8: 351-358.
8. Landmesser L., Dahm L., Tang J., Rutishauser U., 1990, Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development, Neuron, 4: 655- 667.
9. Rutishauser U., 1992, NCAM and its polysialic acid moiety: A mechanism for push/pull regulation of cell intractions during development, Development (Suppl.): 99-104.
10. Rutishauser U., landmesser L., 1996, Polysialic acid in the vertebrate nervous system: A promotor of plasticity in cell- cell interaction, Trends Neurosci., 19: 422- 427.
11. Varky A., 1992, Diversity in the sialic acids, Glycobiology, 2: 25-40.
12. Vmir E. R., Mccoy R. D., Vollger H. F., Wilkin Son N. C., Troy F. A., 1984, Use of prokaryotic- derived probes to identify poly (sialic acid) in neonatal neuronal membranes, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 1971-1975.
13. Zhang H., Miller R. H., Rutishauser U., 1992, Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate, J. Neurosci., 12:3107-3114.