محافظت موشهای BALB/c در مقابل لیشمانیوز پوستی با استفاده از لیپوزومهای حاوی گلیکوپروتئین سطحی اصلی لیشمانیا نوترکیب (rGP63) تهیه شده به روش انحلال با دترژنت

*دکتر محمود رضا جعفری، *دکتر کیوان صدری، *دکتر افروز عارفی، ** مهرناز امانی، **دکتر فریدون مهبودی

*مرکز تحقیقات علوم داروئی پژوهشکده بوعلی و گروه فارماسوتیکس دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ** بخش بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران

خلاصه

هدف اصلی این مطالعه تهیه یك فرآورده لیپوزومی حاوی rGP63 (major surface glycoprotein of Leishmania recombinant) است که بتواند در موشهای BALB/c به صورت اختصاصی باعث القاء ایمنی سلولی شود و موشها را در مقابل چالش با انگل زنده لیشمانیا ماژور محافظت کند. لیپوزومهای حاوی rGP63 با استفاده از لسیتین و کلسترول، با نسبت مولی ۱:۱ ، با استفاده از روش تبخیر حلال (Multilamellar vesicles, MLV-rGP63)، تبخیر فازمعکوس (Large unilamellar vesicles, LUV-rGP63) و انحلال با دترژنت (Small unilamellar vesicles, SUV-rGP63) تهیه شدند. فرآورده های لیپوزومی حاوی rGP63 (۲μg) ، rGP63 خالص به تنهایی در PBS (۲μg) و لیپوزوم خالی (لیپوزوم بدون rGP63) به عنوان کنترل به صورت زیر جلدی به موشهای BALB/c در گروههای 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 ۲μg از rGP63 در کف پای چپ موش و PBS (Phosphate buffer saline) به عنوان کنترل در کف پای راست به صورت زیر جلدی انجام گرفت و میزان تورم حاصل در پای موشها ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت پس از تزریق اندازه گیری شد. یك هفته بعد از تست DTH موشها با تزریق پروماستیگوتهای زنده لیشمانیا ماژور(۱۰/۵۰μl ×۱۰^{۶}) در کف پای چپ به صورت زیرجلدی تحت چالش قرار گرفتند. میزان تورم و زخم در پای موشها به صورت هفتگی به مدت ۱۰ هفته اندازه گیری شد. آنالیز نتایج DTH نشان داد که در بین گروههای مختلف فرآورده لیپوزومی SUV-rGP63 درمقایسه با گروههای کنترل بیشترین تاثیر را در ایجاد پاسخ DTH مثبت در هر سه نوبت اندازه گیری دارد ($p<$ ۰/۰۱)، پاسخ گروههای LUV-rGP63 و rGP63 نیز در هر سه نوبت مثبت بود ($p<$ ۰/۰۵) ، ولی پاسخ MLV-rGP63 نسبت به بقیه گروهها کمتر بود و پاسخ DTH مثبت این گروه فقط در زمانهای ۲۴و۴۸ ساعت بارز بود ($p<$ ۰/۰۵) . در تست چالش با انگل زنده گروه SUV-rGP63 اثر محافظتی کامل داشت ($p<$ ۰/۰۰۱) ولی دو فرآورده لیپوزومی LUV-rGP63 و MLV-rGP63 اثر محافظتی جزئی نشان دادند که ازنظر آماری بارز نبود و خود rGP63 به تنهایی فقط به صورت نسبی ($p<$ ۰/۰۵) باعث محافظت موشها شد. این نتایج نشان می دهد که لیپوزومهای تهیه شده به روش انحلال با دترژنت می توانند ایمونوادجوانتهای مناسب برای rGP63 برای تحریك ایمنی سلولی و محافظت موشها در مقابل لیشمانیوز پوستی باشند.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز پوستی، لیپوزوم ، rGP63 ، ایمنی سلولی، DTH.

مقدمه

لیشمانیازیس یك بیماری تك 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 یك زخم پوستی می شود که در اغلب موارد خود به خود خوب می شود ولی باعث به جاماندن یك زخم معمولا" بد شکل بر روی پوست می شود. درمان لیشمانیازیس بر اساس ترکیبات آنتی موان می باشد که عوارض جانبی ناخواسته زیادی دارد. درمان این بیماری معمولا" 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

Archive of SID

www.SID.ir

کشته شده با اتوکلاو، آنتی ژنهای استخراج شده از غشاء انگل و آنتی ژنهای محلول انگل باعث محافظت با درجات مختلف شده است (۲۳، ۲۴، ۳۵، ۴۴،۳۷).

در تمام این تحقیقات محافظت در مقابل لیشمانیازیس همراه با پاسخ Th ۱ (ایمنی سلولی) و تولید interferon-γ (IFN-γ) بوده است ولی interleukin-4 (IL-4) و (IL-10) interleukin-10 تولید نشده است یا به مقدار کم ایجاد می شود که مشخصه ایمنی هومورال (Th ۲) است. بنابراین ایمنی مناسب برای مبارزه با سالك ایمنی از نوع سلولی می باشد که با آزمون بررسی ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed type hypersensitivity, DTH) می توان آن را نشان داد (۱، ۸، ۱۲، ۲۲،۱۸) .

گونه های مختلف لیشمانیا دارای یك گلیکوپروتئین برروی سطحشان هستند که گلیکوپروتئین سطحی اصلی لیشمانیا می باشد و Kilodalton major surface metalloproteinase -63) GP63 glycoprotein of Leishmania) نامیده می شود (۹). این گلیکوپروتئین یك متالوپروتئیناز ـ 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. GP63 همچنین یك واکسن کاندید برای مقابله با لیشمانیازیس می باشد (۲۴، ۳۰، ۴۵،۳۷). برای مقابله با لیشمانیوزیس و ابداع واکسن، نوع نوترکیب recombinant GP63 (rGP63) نیز تهیه شده است. rGP63 در مقایسه با GP63 طبیعی فاقد مولکولهای متصل قندی بوده و وزن مولکولی آن ۵۸-۵۴ کیلو دالتون می باشد (۱۰). نشان داده شده است که rGP63 باعث DTH مثبت در میمونهای Vervet می شود که زخمهای سالکی مشابه انسان ایجاد می کنند ولی به تنهایی یا به همراه BCG (Bacille Calmette Guerine) به عنوان ایمونوادجوانت برای القاء ایمنی سلولی، فقط به مقدار نسبی باعث محافظت میمونها در مقابل چالش با انگل زنده شده است (۳۳). 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 ایمونوادجوانتهای خیلی موثر برای آنتی ژنهای پروتئینی می باشند (۲، ۳، ۲۰،۱۹). این وزیکولها قادر به تحریك هم پاسخ هومورال و هم سلولی برای رنج مختلفی از آنتی ژنها می باشند (۴، ۱۸، ۳۶،۲۵). یکی از مهمترین ویژگیهای لیپوزومها به عنوان ایمونوادجوانت، توانایی آنها در تحریك سیستم ایمنی سلولی به صورت اختصاصی می باشد (۱۸). این هدف به وسیله روشهای مختلف مثل انتخاب فسفولیپید مناسب (۲۳، ۲۴،۳۴)، انتخاب بار مناسب برروی سطح لیپوزومها (۳۱،۳۰) ، پوشش دادن لیپوزومها با ترکیبات قندی حاوی اولیگومانوز نظیر مانان (۴۱،۳۹) و تهیه لیپوزومها طوری که آنتی ژن در سطح لیپوزومها یا در قسمت دو لایه لیپوزوم ها (به جای اینکه در فازآبی داخلی لیپوزومها انکپسوله شود) قرار گیرد (۱۶) ، قابل دست یابی است. علاوه بر این لیپوزومها به عنوان ادجوانت مورد تائید اداره دارو و غذای آمریکا است، در مطالعات کلینیکی کاملا بی خطر بوده و توسط افراد داوطلب به خوبی تحمل شده است (۱۷).در مطالعه حاضر از لیپوزومها به عنوان ایمونوادجوانت برایrGP63 استفاده شد و اثر محافظتی آنتی ژن rGP63 انکپسوله شده در لیپوزومهای چند لایه ای بزرگ (Multilamellar vesicles, MLV) تهیه شده به روش تبخیر حلال، لیپوزومهای تك لایه ای بزرگ (Large unilamellar vesicles, LUV) تهیه شده به روش تبخیر فاز معکوس و لیپوزومهای تك لایه ای کوچك (Small unilamellar vesicles, SUV) تهیه شده به روش انحلال بادترژنت در مدل موشی لیشمانیازیس با استفاده از موشهای BALB/c مورد بررسی قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

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 Leishmania major : 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 کشتها به وسیله 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 °C تکثیر شدند.

مواد: کیسه دیالیز با Cut off برابر با ۱۲-۱۰ کیلو دالتون، Triton X -۱۰۰ و استاندارد وزن مولکولی با دامنه کم از سیگما (آمریکا) خریداری گردیدند. لسیتین زرده تخم مرغ (با درجه خلوص بالا و حاوی ۶۵٪ فسفاتیدیل کولین طبق برچسب فرآورده)، کوماسی بلو، نیترات نقره ، کلسترول، کلروفرم، متانول، اتر، ایزوپروپیل الکل، اسید استیک و تریس محصول مرك (آلمان) بودند. BSA(Bovine serum albumin) از Fluka (سوئیس) خریداری گردید. گریدزس (دیسکهای مشبک مخصوص میکروسکوپ الکترونی ,Grids) مسی ۳۰۰ مش، فسفوتنگستیك اسید و فورموار (Formrar) محصول شرکت ProSciTech (استرالیا) بودند. استاندارد وزن مولکولی پروتئین ، ژل Superdex 75 (preparative grade) وDEAE-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.

محلولها : محلولهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از:

بافر PBS (Phosphate buffer saline) : ۷/۵ میلی مول $Na H_2 PO_4$ ، ۲/۵ میلی مول $Na_2 HPO_4$ ،$7H_2O$ ، ۱۴۵/۳ میلی مول NaCl .

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

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

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

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

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

محلول ۶: بافر حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۸ مول اوره، ۱۲۰ میلی مول کلرورسدیم و یك میلی مول EDTA با pH ۸/۸.

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

تولید ، جداسازی و تخلیص rGP63 : آنتی ژن GP63 به صورت نوترکیب به وسیله بیان در سلولهای Recombinant E.Coli BL21 (DE3) کشت داده شده در محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین ۱۰۰ µg/ml تولید گردید (۲۸،۱۰). 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 مجددا 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 یك ساعت برروی یخ نگهداری شد و سپس تحت امواج ماورای صوت از نوع میله ای

Archive of SID

www.SID.ir

(Ultrasonic, MSE, UK) قرار گرفت. سپس به رسوبی که از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm به دست 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، پنج تا شش 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 یك سری آلوده کننده ها باشد. رسوب که حاوی Inclusion bodies می باشد در محلول ۵ دوباره سوسپانسیون گردید. بعد از نگهداری به مدت نیم ساعت در محیط اتاق به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید، محلول روئی حاوی rGP63 می باشد. در اولین مرحله تخلیص از ستون (۱۶/۱۰۰ mm) DEAE-Sepharose استفاده گردید (۱۸،۶)، و به ازای هر ۰/۱ ml رزین DEAE-Sepharose ، ۱۵–۱۰ mg از نمونه پروتئینی به ستون اضافه گردید و سپس با دو حجم از محلول ۵، ستون شستشو شد و 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-PAGE تایید گردید، به ستون (۱۶/۱۰۰ 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 برابر با ۱۲–۱۰ کیلو دالتون که در محلول (۸ M) Urea بود، به بافر فسفات با pH ۷/۲ منتقل گردید و غلظت پروتئین به روش Lowry (۲۷) و یا Bradford (۱۱) اندازه گیری شد.

تهیه لیپوزومهای حاوی rGP63: لیپوزومهای حاوی rGP63 با سه روش متفاوت تبخیر حلال، تغییر فاز معکوس و انحلال با دترژنت تهیه شدند. به طور خلاصه در روش تبخیر حلال (۵)، لسیتین تخم مرغ و کلسترول با نسبت مولی ۱:۱ در حلالهای آلی (کلروفرم: متانول، ۱:۲) در یك بالن ته گرد حل گردیدند. حلال های آلی تحت خلاء چرخان توسط دستگاه روتاری (Buchi, Switzerland) تبخیر شد که منجر به نشستن لیپیدها برروی دیواره ظرف به صورت یك فیلم نازك می شود. برای اطمینان از تبخیر کامل حلالهای آلی، فیلم لیپیدی حاصل به مدت ۲ ساعت در دستگاه (Heto Drywinner, DW3, Allerod, Denmark) Freeze-Dryer در ۵۰ °C و فشار ۰/۵ hpa خشك گردید. سپس بافر حاوی آنتی ژن خالصrGp63 به فیلم لیپیدی اضافه شد و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ سانتی گراد تحت تکانهای شدید توسط ورتکس (Velp Scientifica Srl, Milan, Italy) Vortex قرار گرفت تا لیپوزومهای MLV حاوی آنتی ژن تشکیل شوند.

در روش تبخیر فاز معکوس (۴۰) لسیتین تخم مرغ و کلسترول با نسبت مولی ۱:۱ در حلالهای آلی (اتر و کلروفرم ۱:۵) در یك بالن ته گرد حل گردید. سپس بافر حاوی آنتی ژن rGP63 اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه تحت امواج ماورای صوت ازنوع حمامی (Kerry Ultrasonic, PUI 125, UK) قرار گرفت تا امولسیون یکنواخت شفاف تشکیل گردید. سپس حلال آلی تحت خلاء چرخان با استفاده از دستگاه روتاری حذف گردید. پس از تکان دادن شدید توده ژلی حاصل به وسیله ورتکس، سوسپانسیون روان لیپوزومهای LUV در آب تشکیل شد که حاوی آنتی ژن rGP63 می باشند.

در روش انحلال با دترژنت (۴۲،۱۵) لایه های لیپیدی با استفاده از لسیتین تخم مرغ و کلسترول (نسبت مولی۱:۱) به روش ذکر شده در روش تبخیر حلال تهیه شد. به فیلم های لیپیدی حاصل بر روی جداره بالن ته گرد بافر حاوی آنتی ژن rGP63 و به میزان ۱٪ از Triton X–۱۰۰ افزوده گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی گراد تحت امواج ماورای صوت از نوع حمامی قرار گرفت تا محلول هموژن و شفاف حاصل شود. سپس محلول حاصل با استفاده از کیسه دیالیز با Cut off برابر با ۱۲–۱۰ کیلو دالتون در مقابل PBS، هشت مرتبه هر بار ۱۲ ساعت در ۴ °C دیالیز گردید تا به

Archive of SID

www.SID.ir

طور کامل دترژنت از محلول خارج شود و لیپوزومهای SUV حاوی آنتی ژن rGP63 تشکیل شدند.

برای جداسازی آنتی ژن rGP63 محصور نشده از لیپوزومهای MLV ، LUV و SUV تهیه شده از اولترا سانتریفوژ، (Beckman Optima 1901, USA) ۱۰۰/۰۰۰× g به مدت یك ساعت استفاده شد. 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 به روش Lowry (۲۷) و یا Bradford (۱۱) با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد. به این ترتیب که پس از جداسازی آنتی ژن rGP63 محصور نشده از لیپوزومها به وسیله اولترا سانتریفوژ مقدار کل آنتی ژن موجود در مایع شفاف رویی به وسیله اندازه گیری پروتئین تعیین شد و از مقدار کل آنتی ژن استفاده شده برای تهیه لیپوزومها کسر گردید و درصد محصور سازی با استفاده از فرمول ذیل تعیین گردید.

[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 = محصور سازی ٪

کارآیی محصور سازی آنتی ژن در لیپوزومهای MLV ،۱۲٪ ، در لیپوزومهای LUV ،۵۵٪ و در لیپوزومهای SUV ،۵۳٪ بود.

پس از جداسازی آنتی ژن rGP63 محصور نشده از لیپوزومها و محاسبه درصد محصور سازی، رسوبهای لیپوزومی در PBS طوری دوباره سوسپانسیون گردیدند که غلظت آنتی ژن rGP63 درتمام فرمولاسیونها به صورت ۲ µg/۱۰۰ µl باشد و برای تزریقات لیپوزومهای تازه تهیه شده استفاده گردید.

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 به عنوان ژل متراکم کننده و ۱۰٪ آکریل آمید به عنوان ژل جدا کننده انجام شد (۴۳). 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.

بررسی میکروسکوپ الکترونی لیپوزومها به روش رنگ آمیزی منفی: انواع لیپوزومها (۱۰ µl) با ۱۰ µl محلول فسفوتنگستات سدیم ۱٪ با pH ۷ به مدت ۱۵–۱۰ ثانیه مخلوط گردیدند. سپس به روی گریدزهای مسی پوشش داده شده با فورموار قرار داده شدند. بعد از خارج نمودن رنگ اضافی با فیلتر کاغذی، نمونه ها به وسیله بررسی میکروسکوپ الکترونی گذرا (LEO, 910 Oberkochen Germany) مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند.

واکسیناسیون موشهای BALB/c : موشهای BALB/c ماده ۱۲–۸ هفته ای در گروههای ده تایی (کلا ۶ گروه) سه مرتبه با فاصله های سه هفته ای توسط فرآورده های لیپوزومی حاوی r-GP63 (LUV – rGP63, MLV – rGP63) و (SUV – rGP63) و rGP63 به تنهایی (rGP63 خالص) با غلظت ۲ µg /۱۰۰µl / mouse از آنتی ژن در ناحیه پشت به روش زیرجلدی (Subcutaneous, SC) واکسینه شدند و در ضمن دو گروه به عنوان کنترل منفی، لیپوزوم فاقد آنتی ژن (control-liposome) و PBS به میزان ۱۰۰ µl (SC) دریافت کردند (۶، ۲۳، ۲۴، ۳۸،۳۷).

آزمون بررسی ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH) : سه هفته پس از آخرین تزریق ایمن سازنده، آنتی ژن rGP63 (۲ µg / ۵۰ µl / mouse) در کف پای چپ موشها به صورتSC 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، ۴۸و ۷۲ ساعت با کولیس اندازه گیری شد و اختلاف اندازه در ضخامت

Archive of SID
www.SID.ir

کف پای راست و چپ به میلی متر بیان و درصد افزایش ضخامت در کف پای موش با فرمول زیر حساب شده و در محاسبات آماری مورد استفاده قرار گرفت(۶، ۲۳، ۲۴، ۳۸،۳۷).

[(ضخامت کف پای مبتلا شده) - (ضخامت کف پای کنترل)] ÷ (ضخامت کف پای کنترل) × ۱۰۰ =افزایش ضخامت در کف پا ٪

آزمون چالش (Challenge) با انگل لیشمانیاماژور : یك هفته پس از انجام تست DTH موشهای BALB/c واکسینه شده، با مقدار ۱×۱۰^{۶}/۵۰µl/mouse از پروماستیگوتهای انگل لیشمانیاماژور (MRHO/IR/75/ER) در فاز ایستا، در کف پای چپ به صورتSC تحت چالش قرار گرفتند. به کف پای راست هم پنجاه میکرولیتر PBS به صورت SC تزریق شد. موشها به طور هفتگی تحت معاینه قرار گرفتند و میزان ورم و التهاب حاصله در کف پای موشها به وسیله کولیس به مدت ۱۰ هفته اندازه گیری شد. اختلاف اندازه در ضخامت کف پای راست و چپ به میلی متر بیان شده و در نهایت این اندازه با استفاده از فرمول ذکر شده در قسمت DTH به صورت درصد افزایش ضخامت در کف پا بیان شد (۶، ۲۳، ۲۴، ۳۸،۳۷).

ارزیابی آماری : برای ارزیابی آماری داده ها، آزمون آنالیز واریانس یك طرفه برای مشخص شدن همگن بودن انحراف استانداردها انجام گرفت و در صورت همگن بودن انحراف استانداردها آزمون Tukey-Kramer برای مقایسه گروهها به صورت جداگانه انجام شد و $p<۰/۰۵$ به منزله معنی دار بودن اختلاف بین دو گروه در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی SDS-PAGE لیپوزومهای حاوی rGP63

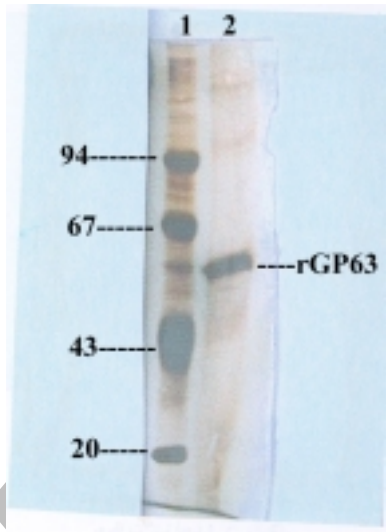
شکل ۱ آنالیز SDS-PAGE نمونه تخلیص شده آنتی ژن rGP63 را نشان می دهد. در این شکل باند مربوط به آنتی ژن rGP63 در فاصله باندهای ۶۷ و ۴۳ کیلو دالتون پروتئین استاندارد قرار دارد و براساس محاسبات R_f وزن مولکولی این نمونه rGP63 ، ۵۵ کیلو دالتون می باشد. از آنجا که وزن مولکولی پروتئین rGP63 سنتزی در محدوده ۵۸-۵۴ کیلو دالتونی است (۱۳) وجود پروتئین rGP63 تخلیص شده به اثبات می رسد. به منظور اثبات کیفی وجود آنتی ژن rGP63 در لیپوزومها، پس از جداسازی لیپوزومها از محلول شفاف رویی به وسیله اولترا سانتریفوژ، لیپوزومهای حاصل تحت بررسی SDS-PAGE قرارگرفتند (شکل ۲). 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 (شکل ۲، ستونهای ۳، ۴و۵) . باند پروتئینی rGP63 موجود در لیپوزومها دقیقا همردیف باند rGP63خالص در PBS می باشد (شکل ۲، ستون ۲، ۳، ۴و ۵). هم در فرآورده های لیپوزومی حاوی rGP63 و هم در rGP63 خالص مقدار ناچیزی تجمع های یا وزن مولکولی بالا از rGP63 مشاهده می شود (شکل ۲، ستونهای ۲، ۳، ۴و ۵). برای ستونهای ۳، ۴و ۵ 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 لیپوزومها از rGP63 انکسپوله نشده به وسیله سانتریفوژ در لیپوزومها به اثبات می رسد.

بررسی میکروسکوپ الکترونی لیپوزومهای حاوی r-GP63

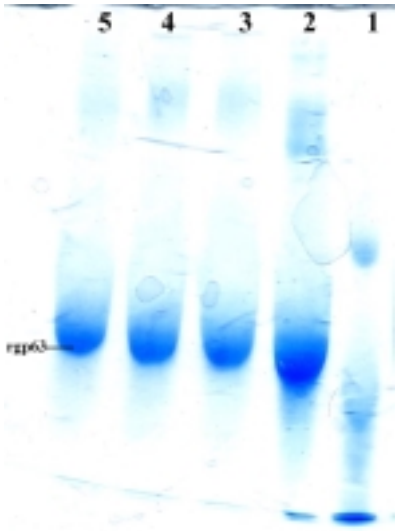
مطالعات میکروسکوپ الکترونی برروی لیپوزومهای تهیه شده به روش رنگ آمیزی منفی انجام شد تا مورفولوژی لیپوزومهای تهیه شده با سه روش مختلف مشخص شود. لیپوزومهای تهیه شده به روش تبخیر حلال (شکلA -۳) چند لایه ای (MLV) بودند و محدوده اندازه ذره ای خیلی وسیع داشتند (۳۰۰-۲۰۰۰ nm). لیپوزومهای تهیه شده به روش تبخیر فاز معکوس اغلب تك لایه ای بزرگ (LUV) بوده و محدوده اندازه ذره ای حدود ۶۰۰-۲۰۰ نانومتر و با اندازه ذره ای متوسط حدود ۴۵۰ نانومتر داشتند (شکل B-۳) روش انحلال با دترژنت لیپوزومهای تك لایه ای کوچك (SUV) خیلی هموژن با محدوده اندازه ذره ای ۱۳۰-۸۰ نانومتر و اندازه ذره ای متوسط ۱۰۰ نانومتر فراهم آورد (شکل C-۳).

Archive of SID

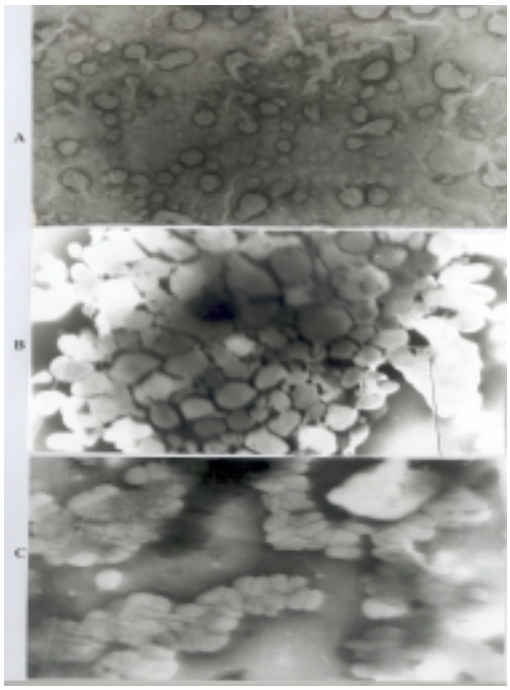
www.SID.ir



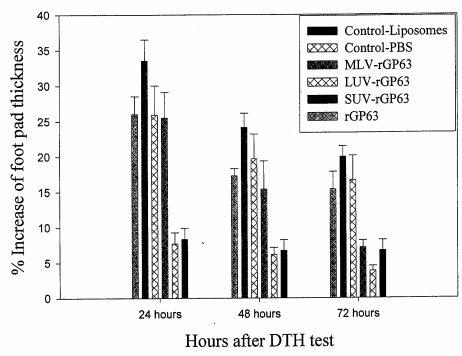
شکل ۱: آنالیز SDS-PAGE نمونه تخلیص شده آنتی ژن rGP63 (۳٪ ژل متراکم کننده، ۱۰٪ ژل جداکننده، رنگ آمیزی با نیترات نقره)
۱- استاندارد وزن مولکولی پروتئینی فارماسیا (از بالا ۹۴، ۶۷و۴۳و۲۰ کیلو دالتون)
۲- پروتئین rGP63 تخلیص شده



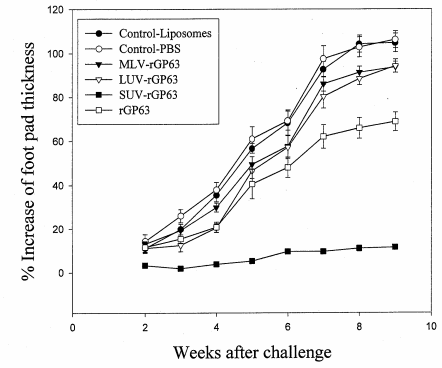
شکل ۲: آنالیز SDS-PAGE لیپوزومهای حاوی rGP63 (۳٪ ژل متراکم کننده، ۱۰٪ ژل جداکننده رنگ آمیزی با کوماسی بلو)
۱- استاندارد وزن مولکولی پروتئینی با دامنه کم سیگما (از بالا ٦٦ ، ٤٥، ٣٦، ٢٩و٢٤ کیلو دالتون)
۲- پروتئین rGP63
۳- لیپوزومهای SUV حاوی rGP63 پس از جداسازی از پروتئین انکپسوله نشده با اولتراسانتریفوژ
٤- لیپوزومهای MLV حاوی rGP63 پس از جداسازی از پروتئین انکپسوله نشده با اولتراسانتریفوژ
٥- لیپوزومهای LUV حاوی rGP63 پس از جداسازی از پروتئین انکپسوله نشده با اولتراسانتریفوژ



شکل ۳: عکسهای میکروسکوپ الکترونی MLV- rGP63 (C, 57000×) SUV-rGP63و(B, 25000×) LUV-rGP63 ,(A, 12600×)



شکل ٤:پاسخ DTH درموشهای BALB/C بعد از واکسینه شدن با فرآورده های مختلف لیپوزومی حاوی rGP63 ، PBS، کنترل لیپوزوم و خود rGP63 به تنهایی ٢٤و٤٨و٧٢ ساعت



شکل٥: میانگین اندازه زخمها در گروههای مختلف موشهای BALB/C واکسینه شده پس از چالش با انگل لیشمانیا طی هفته های متوالی

www.SID.ir

تاثیر لیپوزومهای حاوی rGP63 در پاسخ DTH

با توجه به نمودار ۴ بررسی نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت نشان می دهد که تمام فرآورده های لیپوزومی حاوی rGP63 و خود rGP63 به تنهایی، به طور بارزی ($p< ۰/۰۱$) باعث افزایش پاسخ DTH در مقایسه با گروههای لیپوزوم کنترل و کنترل PBS شده است. درصد افزایش ضخامت در کف پای موشها در گروههای MLV-rGP63، LUV-rGP63 و SUV-rGP63 و rGP63 در مقایسه با گروه کنترل منفی PBS به ترتیب ۴/۳،۳۶/۳،۳۷/۳۲ و ۳/۳۹ برابر بود.

بین گروههای کنترل PBS و لیپوزوم کنترل و همچنین بین گروههای MLV-rGP63، LUV-rGP63 و rGP63 اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p< ۰/۰۵$). ولی گروه SUV-rGP63 در مقایسه با گروههای MLV-rGP63، LUV-rGP63 و rGP63 بیشتر باعث پاسخ DTH در موشها گردید (نمودار ۴). شدت پاسخ DTH پس از گذشت ۴۸ساعت اگرچه کمتر از ۷۲ ساعت بود ولی در کل شبیه ۲۴ ساعت بود (نمودار ۴).

اختلاف معنی دار در بین گروههای ($p< ۰/۰۱$) SUV-rGP63، LUV-rGP63 و rGP63 ($p< ۰/۰۵$) با گروههای کنترل وجود داشت. بین گروههای کنترل و همچنین بین گروههای MLV-rGP63، LUV-rGP63 و rGP63 اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p< ۰/۰۵$). ولی تاثیر گروه SUV-rGP63 در ایجاد پاسخ DTH بیشتر از گروههای LUV-rGP63، LUV-rGP63 و rGP63 بود (نمودار ۴).

بررسی نتایج پس از گذشت ۷۲ ساعت نشان می دهد که گروههای SUV-rGP63، LUV-rGP63 و rGP63 باعث افزایش پاسخ DTH در مقایسه با گروههای کنترل و MLV-rGP63 ($p< ۰/۰۵$) شده است. ولی بین گروههای کنترل PBS، لیپوزوم و MLV-rGP63 اختلاف معنی دار وجود نداشت ($p< ۰/۰۵$) و تاثیر گروه SUV-rGP63 در ایجاد پاسخ DTH بیشتر از گروههای LUV-rGP63 و rGP63 بود (نمودار ۴).

تأثیر لیپوزومهای حاوی rGP63 در تست چالش با L.Major

نمودار ۵ روند پیشرفت ضخامت در کف پای موشها را در گروههای مختلف پس از تزریق ۱×۱۰^{۶} 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 موشها ایجاد و به تدریج پیشرفت نمود. در گروههای MLV-rGP63 و LUV-rGP63 نیز نظیر گروههای کنترل ۲ هفته پی از تزریق انگل تورم و زخم در پای موشها ایجاد و به تدریج پیشرفت نمود. این دو گروه عملاً" محافظتی در مقابل چالش با انگل زنده ایجاد ننمودند. میزان تورم در این دو گروه به ترتیب ۱۱/۷۵٪ و ۱۱/۳۰٪ در هفته نهم در مقایسه با گروه کنترل PBS کمتر بود ولی این کاهش از نظر آماری بارز نبود ($p< ۰/۰۵$) (نمودار ۵). در گروه rGP63 خالص نیز نظیر گروههای کنترل۲ هفته پس از تزریق انگل تورم در پای موشها ایجاد و به تدریج پیشرفت نمود ولی شدت تورم به نسبت در این گروه کمتر بود و واکسیناسیون با rGP63 به تنهایی به صورت نسبی باعث محافظت موشها در مقابل چالش با انگل زنده شد. میزان تورم در این گروه در هفته نهم در مقایسه با گروه کنترل PBS ۳۵/۲۹٪ کمتر بود ($p< ۰/۰۵$) (نمودار۵).

برخلاف گروه های دیگر، واکسیناسیون با لیپوزومهای SUV-rGP63 محافظت نسبتاً" کامل در مقابل چالش با انگل زنده ایجاد نمود. در این 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 گروه در هفته نهم در مقایسه با گروه کنترل PBS ۸۹/۱۶٪ کمتر بود ($p< ۰/۰۰۱$). تأثیر این گروه نه تنها با گروههای کنترل اختلاف بارز داشت بلکه با گروههای MLV-rGP63، LUV-rGP63 و rGP63 خالص نیز اختلاف معنی دار داشت ($p< ۰/۰۵$). این اختلاف از ابتدای بررسی (هفته دوم) تا انتهای آزمایش (هفته نهم) مشهود بود (نمودار ۵).

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

ایمنی محافظتی موثر در پاسخ به عفونتهای لیشمانیایی ایمنی سلولی به واسطه سلولهای T، CD_4^+ از نوع Th_1 می باشد. ترکیبات بیولوژیکی حاصل از این سلولهای T فعال شده شامل IL-2 و IFN-γ می باشند که باعث محافظت میزبان در مقابل انگل می شود (۱، ۸، ۱۲، ۱۳، ۲۲،۲۱).

هدف اصلی مطالعه حاضر تعیین این مطلب بود که آیا لیپوزومها می توانند به عنوان ایمونوادجوانت موثر برای آنتی ژن rGP63 برای تحریک ایمنی سلولی و محافظت موش ها در مقابل چالش با انگل زنده عمل کنند و دیگر اینکه در بین سه روش متفاوت تبخیر حلال، تبخیر فاز معکوس و انحلال با دترژنت برای تهیه لیپوزومها، کدام روش مناسبترین از نظر تحریک ایمنی سلولی و محافظت برای ابداع واکسن مناسب علیه لیشمانیوز پوستی را فراهم می آورد. بنابراین با استفاده از لسیتین و کلسترول با نسبت مولی (۱:۱) لیپوزومهای حاوی rGP63 با ۳ روش متفاوت تهیه شدند و برای تعیین کارایی لیپوزومها در تحریک ایمنی سلولی و محافظت در مقابل لیشمانیوز پوستی از تست DTH (شکل۴) و چالش با انگل زنده (شکل ۵) استفاده شد.

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 (Dehydration-rehydration vesicles) تهیه شده از DSPC (Distearoylp hosphatidylcholin) و کلسترول نیز استفاده شده است (۲۴).

در این مطالعه برای نشان دادن تاثیر لیپوزومهای حاوی rGP63 ابتدا از تست DTH استفاده شد. تست DTH یک آزمون مناسب برای نشان دادن ایمنی سلولی و همچنین آزمایش معتبر برای میزان محافظت درمقابل لیشمانیوزیس است (۱۴، ۲۹،۲۶). در تست DTH بیشترین تاثیر را فرآورده لیپوزومی SUV- rGP63 در مقایسه با سایر گروهها داشت. تاثیر این فرآورده در هر ۳ نوبت اندازه گیری شده بارزتر از بقیه گروهها بود. بنابراین با تست DTH نتیجه گیری شد که بین تمام گروهها، فرآورده لیپوزومی SUV- rGP63 که باعث بیشترین پاسخ DTH شد، احتمالا بیشتر باعث سوق دادن ایمنی به طرف سلولی شده است و می تواند باعث محافظت بیشتر موشها در مقابل چالش با انگل زنده شود. علاوه بر گروه SUV-rGP63 گروههای LUV-rGP63، MLV – rGP63 و rGP63 نیز DTH مثبت از خود نشان دادند ولی تاثیر این گروهها کمتر از SUV- rGP63 بود. ازنظر شدت پاسخ DTH بین گروههای MLV- rGP63 ، LUV- rGP63 و rGP63 در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت اگرچه پاسخ MLV- rGP63 کمتر از LUV- rGP63 و rGP63 بود ولی این اختلاف از نظر آماری بارز نبود.

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 SUV- rGP63 ایجاد نمود. تاثیر این گروه در محافظت موشها در راستای تست DTH مثبت وقوی برای این فرآورده می باشد. ولی دو فرآورده لیپوزومی MLV- rGP63 و LUV- rGP63 فقط به صورت جزیی باعث محافظت موشها شدند که ازنظر آماری با گروههای کنترل تفاوت معنی داری نداشتند. تاثیر لیپوزومهای حاوی GP63 (خالص شده از پروماستیگوتهای L. mexicana) تهیه شده به روش انحلال با دترژنت در محافظت موشهای CBA/Ca, BALB/c لیشمانیوز پوستی به وسیله سایر محققین نیز گزارش شده است (۳۷). در این مطالعه آنتی ژنهای GP63 و LPG (Leishmania promastigote lipophosphoglycan) در لیپوزومهای تشکیل شده از لسیتین سویا و کلسترول با استفاده از روش انحلال با دترژنت انکپسوله شده اند. فرق

Archive of SID

www.SID.ir

لسیتین سویا با لسیتین تخم مرغ در این است که دمای عبور فاز (T_m) لسیتین سویا به دلیل داشتن فسفولیپیدهای غیراشباع بیشتر، مقداری کمتر است (T_m لسیتین تخم مرغ حدود ۱۰°C- و لسیتین سویا ۲۵°C - است) می باشد (۳۲). در این مطالعه نیز برای حذف دترژنت از دیالیز و برای تخلیص از اولتراسانتریفوژ (۱۰۰/۰۰۰g) و اثبات وجود GP63 در 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 به طور کامل باعث محافظت موشها درمقابل چالش با انگل L. mexicana شده است (۳۷) . تاثیر لیپوزومهای حاوی GP63 تخلیص شده از L. major علیه لیشمانیوز پوستی در مطالعه دیگر نیز نشان داده شده است (۲۴). در این مطالعه لیپوزومهای حاوی آنتی ژنهای L. major به وسیله روش DRV با استفاده از نسبتهای مولی مساوی DSPC و کلسترول تهیه شده اند و با استفاده از روشهای SDS-PAGE و ایمیونوبلات (Western blot) نشان داده اند که اگرچه این لیپوزومها با آنتی ژنهای تام L. major تهیه گردیده اند ولی به صورت ترجیحی GP63 و LPG در این لیپوزومها انکپسوله شده اند و با استفاده از تکنیک میکروسکوپ الکترونی گذرا همراه با رنگ آمیزی با آنتی بادیهای کنژوکه با طلا (Immunogold staining) نشان داده شده است که LPG و GP63 سطح لیپوزومها را می پوشاند. 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 (۲۴).

درمطالعه حاضر لیپوزومهای rGP63 - SUV در محافظت موشهای BALB/c کاملا موثر بود ولی rGP63 -MLV و rGP63 -LUV فقط تاثیر جزیی در محافظت موشها داشتند، اگرچه میزان آنتی ژن تزریق شده درتمام گروهها یکسان (۲ µg/mouse) بود. این اختلاف در تاثیر لیپوزومها احتمالا می تواند به دلیل اختلاف در چگونگی قرار گرفتن یا جایگزینی rGP63 در لیپوزومها باشد. طریقه قرار گرفتن آنتی ژنهای پروتئین در لیپوزومها بستگی به روش تهیه و همچنین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنتی ژن دارد (۳۲). در روشهای تبخیر حلال و تبخیر فاز معکوس آنتی ژن در فاز آبی داخلی لیپوزوم قرار می گیرد (۵، ۴۰،۷،۳۲) ولی در روش انحلال با دترژنت نشان داده شده است که آنتی ژن می تواند در قسمت دو لایه لیپوزوم جای گیرد (۱۵، ۴۲،۳۲). همچنین ازطرف دیگر نشان داده شده است که در استفاده لیپوزومها به عنوان ایمونوادجوانت اگر آنتی ژن انکپسوله شده در سطح لیپوزوم به صورت کووالانت متصل باشد یا در بخش دو لایه لیپوزوم قرار گیرد پاسخ ایمنی به صورت سلولی خواهد بود ولی اگر آنتی ژن در فاز آبی داخلی لیپوزوم باشد، ایمنی حاصل هومورال خواهد بود (۱۶). بنابراین در تحقیق حاضر احتمالا در لیپوزومهایی که به روش انحلال با دترژنت تهیه شده اند، rGP63 در قسمت دو لایه قرار گرفته و باعث تحریک پاسخ ایمنی سلولی و محافظت موشها در مقابل لیشمانیوز پوستی شده است و ازطرف دیگر در لیپوزومهایی که به روش تبخیر حلال و تبخیر فاز معکوس تهیه شده اند rGP63 در درون لیپوزوم قرار گرفته و بیشتر باعث تحریک پاسخ هومورال شده و محافظت چندانی در مقابل لیشمانیوز پوستی ایجاد نکرده است، اگرچه این دو به صورت ضعیف باعث DTH مثبت شدند. در دو مطالعه قبلی انجام شده با استفاده از لیپوزومها به عنوان ایمونوادجوانت برای GP63 تخلیص شده از انگل تام لیشمانیا که منجر به محافظت کامل موشها درمقابل لیشمانیوز پوستی شده است روش تهیه به گونه ای بوده است که آنتی ژن در قسمت دو لایه لیپوزوم باشد (۲۴،۳۷). درتحقیق اول روش تهیه لیپوزوم تکنیک انحلال با دترژنت بوده است که دقیقا مثل روش تهیه لیپوزومهای rGP63 -SUV می باشد با این تفاوت که دراین تحقیق نوع نوترکیب این آنتی ژن rGP63 به جای GP63 طبیعی استفاده شده است (۳۷). در تحقیق دوم اگرچه از روش DRV برای تهیه لیپوزومهای حاوی GP63 طبیعی

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شده است ولی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذرا و تکنیك رنگ آمیزی Immunogold نشان داده شده است که آنتی ژنها سطح لیپوزوم را پوشانده اند (۲۴).

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 به وسیله rGP63 توسط سایر محققین نیز نشان داده شده است (۳۳). در این مطالعه نشان داده شده است که میمونهای Vervet به دنبال واکسیناسیون با ۵۰ میکروگرم از rGP63 (۳مرتبه با فاصله دو هفته ازهم) به همراه BCG (به عنوان ایمونوادجوانت جهت سوق دادن ایمنی به طرف سلولی) پاسخ DTH مثبت ازخود بروز می دهند. همچنین وقتی این میمونهای واکسینه شده با پروماستیگوتهای L. major تحت چالش قرار گرفتند فقط به صورت نسبی باعث محافظت در مقابل لیشمانیوز پوستی شدند (۳۳). مطالعه حاضر نشان داد که rGP63 حتی بدون BCG 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.

به طور خلاصه، مطالعه حاضر نشان داد که اولا در استفاده از لیپوزومها به عنوان ایمونوادجوانت روش تهیه در تعیین تحریك نوع ایمنی موثر است و ثانیا نوع نوترکیب GP63 نیز می تواند به عنوان یك آنتی ژن کاندید برای ابداع واکسن علیه لیشمانیوز پوستی موثر باشد و همچنین در بین سه فرآورده لیپوزومی حاوی rGP63 تهیه شده به روشهای مختلف، فقط لیپوزومهای تهیه شده بروش انحلال دترژنت قادر به محافظت موشها می باشند، که این فرآورده می تواند به عنوان یك واکسن کاندید علیه سالك باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که در تامین بودجه این تحقیق دخیل بوده‌اند و بخش بیوتکنولوژی انیستیتو پاستور ایران جهت فراهم آوردن rGP63 تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A., 1996, Functional diversity of helper T lymphocytes, Nature, 383: 787-793.
2. Allison A. C., Gregoriadis G., 1974, Liposomes as immunological adjuvants, Nature, 252: 252-252.
3. Alving C. R., 1995, Liposomal vaccines: clinical status and immunological presentation for humoral and cellular immunity, Ann. N. Y. Acad. Sci., 754: 143-152.
4. Antimisiaris S. G., Jayasekera P., Gregoriadis G., 1993, Liposomes as vaccine carriers. Incorporation of soluble and particulate antigens in giant vesicles, J. Immun. Methods, 166: 271-280.
5. Bangham A. D., Hill M. W., Miller N. G. A., 1974, Preparation and use of liposomes as models of biological membranes, Methods Membr. Biol., 1: 1-68.
6. Barral-Netto M., Reed S. G., Sadigursky M., Sonnefeld G., 1987, Specific immunization of mice against Leishmania mexicana amazonensis using solubilized promastigotes, Clin. Exp. Immun., 67: 11-19.
7. Boggs J. M., Vail W. J., Moscarello M. A., 1976, Preparation and properties of vesicles of a purified myelin hydrophobic protein and phospholipid. A spin label study, Biochim. Biophys. Acta, 448: 517-537.
8. Boom W. H., Leibster L., Abbas A. K., Titus R.G., 1990, Patterns of cytokine secretion in murine leishmaniasis: Correlation with disease progression or resolution, Infect. Immun., 58: 3863-3870.
9. Bordier C., 1987, The promastigote surface of Leishmania, Parasitol. Today, 24: 73-79.
10. Botton L. L., McMaster W. R., 1988, Molecular cloning of the major surface antigen of Leishmania, J. Exp. Med., 167: 724-9.
11. Bradford M. N., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding, Analyt. Biochem., 72: 248-254.
12. Bretscher P. A., Wel, G., Menon J. N., Bielefeldt-Ohmann H., 1992, Establishment of stable cell-mediated immunity that makes susceptible mice resistant to Leishmania major, Science, 257: 539-542.
13. Carvalho E. M., Badaro R., Reed S. G., Johnson W. D., Jones C., 1985, Absence of gamma interferon and interleukin-2 production during active visceral leishmaniasis, J. Clin. Inves., 76: 2066-2069.
14. De Rossel R. A., Bray R. S., Alexander J., 1987, The correlation between delayed-type hypersensitivity, lymphocyte activation and

Archive of SID
www.SID.ir

protective immunity in experimental murine leishmaniosis, Parasit. Immunol., 9: 105-115.
15. Foldvari M., Mezei M., Mezei C., 1990, Reconstitution into liposomes of highly purified P0 glycoprotein from avian peripheral nerve myelin, Biochem. Cell Biol. 68: 499-511.
16. Fortin A., Shahum E., Krzystyniak K., Therien H. M., 1996, Differential activation of cell- mediated immune functions by encapsulated and surface-linked liposomal antigens, Cell. Immunol., 169: 208-217.
17. Fries L. F., Gordon D. M., Richards R. L., Egan J. E., Holingdale M. R., Gross M., Silverman C., Alving C. R., 1992, Liposomal malaria vaccine in humans: A safe and potent adjuvant strategy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 358-362.
18. Galdiero M., Carratelli C. R., Nuzzo I., Bentivoglio C., De-Martino L., Folgore A., Galdiero F., 1995, Enhanced cellular response in mice treated with a Brucella antigen-liposome mixture, FEMS. Immunol. Med. Microbiol., 10: 235-243.
19. Gregoridis G., 1990, Immunological adjuvants: A role for liposomes, Immunoloy Today, 11: 89-97.
20. Gregoriadis G., 1994, The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposomes., J. Drug Target. 2: 351-356.
21. Heinzel F. P., Sadick M. D., Holaday B. J., Coffman R. L., Locksley R. M., 1989, Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine cutaneous leishmaniosis, J. Exp. Med., 169: 59-72.
22. Heinzel F. P., Sadick M. D., Mutha S. S., Locksley R. M., 1991, Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4 and interleukin 10 by CD4 lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7011-7015.
23. Kahl L. P., Scott C. A., Lelchuk R., Gregoriadis G., and Liew F.Y., 1989, Vaccination against murine cutaneous leishmaniasis using Leishmania major antigen/liposemes: optimization and assessment of the requirement for intravenous immunization, J. Immuol., 142: 4441-4449.
24. Kahl L. P., Lelchuk R., Scott C. A., Beesley J., 1990, Characterization of Leishmania major antigen/liposemes that protect BALB/c mice against cutaneous leishmaniasis, Infec. Immun., 58: 3233-3241.
25. Latif N., Bachhawat B. K., 1984, The effect of surface charges of liposomes in immunopotentiation, Bioscience Reports, 4: 99-107.
26. Liew F. Y., Dhaliwal J. S., 1987, Distinctive cellular immunity in genetically susceptible BALB/c mice recovered from Leishmania major infection or after subcutaneous immunization with killed parasites, J. Immuol., 138:4450-4456.
27. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265-275.
28. Macdonald M. H., Morrison C. J., McMaster W. R., 1995, Analysis of the active site and activation mechanism of the Leishmania surface metalloproteinase GP63, Biochim. Biophys. Acta, 1253: 199-207.
29. Mauel J., Behin R., 1982, Leishmaniosis : immunity, immunopathology and immunodiagnosis, in: Cohen S. and Warren K.S. (eds), Immunity to parasitic infections, Blackwell Scientific, Oxford, 1982, P. 343-363.
30. McSorley S., Xu D., Liew F., 1997, Vaccine efficacy of salmonella strains expressing glycoprotein 63 with different promoters, Infect. Immunol., 65: 171-178.
31. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsuml Y., Kubo K., Nakagawa S., Forward H., Hamaoka T., Mayumi T., 1997, Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins, Bioch. Biophy. Res. Com., 240: 793-797.
32. New R. R. C., Liposomes: a practical approach, Oxford University Press, Oxford, 1997, 33-85.
33. Olobo J. O., Anjili C. O., Gicheru M. M., Mbati P. A., Kariuki T. M., Githure J. I., Koech D. K., McMaster W.R., 1995, Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniosis using recombinant Leishmania 'major surface glycoprotein' (gp63), Vet. Para., 60: 199-212.
34. Phillips N. C., Gagne L., Ivanoff N., Riveau G., 1996, Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens, Vaccine,14: 898-904.
35. Rachamin N., Jaffe C. L., 1993, Pure protein from leishmania donovani protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis, J. Immun., 150: 2322-2331.
36. Reddy R. F., Zhou S., Nair L., Huang L., Rouse B. T., 1992, In vivo cytotoxic T lymphocyte induction with soluble proteins administered in liposomes, J. Immun., 148: 1585-1589.
37. Russell D. G., Alexander J., 1988, Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes, J. Immunol., 140: 1274-1279.
38. Scott P., Pearce E., 1987, Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model, J. Immunol., 139: 221-227.
39. Sugimoto M., Ohishi K., Fukasawa M., Shikata K., Kawai H., Itakura H., Hatakana M., Sakakibara R., Ishiguro M., Nakata M., 1995, Oligomannose-coated liposomes as an adjuvant

Archive of SID

www.SID.ir

for the induction of cell- mediated immunity, FEBS- Lett., 363: 53-56.
40. Szoka F., Papahadjopoulos D., 1978, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse- phase evaporation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74: 4194-4198.
41. Toda S., Ishii N., Okada E., Kusakabe K. I., Arai H., Hamajima K., Gorai I., Nishioka K., Okuda K., 1997, HIV-1-spcific cell – mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti- interferon gamma antibody, Immunology, 92: 111-117.
42. Vainstein A., Herskovitz M., Israel S., Rabin S., Loyter A. 1984, A new method for reconstitution of highly fusogenic Sendai virus envelopes, Biochim. Biophys. Acta, 773: 181-188.
43. Weber K. *et al.*, 1969, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem. 244: 4406-4412.
44. White A.C.J.R. and McMahon–Pratt D., 1990, Prophylactic immunization against experimental Leishmania donovani infection by use of a purified protein vaccine, J. Infec. Dis., 161: 1313-1314.
45. XU D., McSorley S., Chatfield S., Dougan G., Leiw F., 1995, Protection against Leishmania major infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated Salmonella typhimurium. Immunology, 85: 1-7.

Archive of SID

www.SID.ir