بررسی میزان ایمنی زایی در برابر لیشمانیوز با استفاده از لیپوزوم های حاوی آنتی ژن rLmSTI1 در مدل موشی

[1]دکتر علی بدیعی،[2*] دکتر محمود رضا جعفری،[3] دکتر علی خامسی پور،[4] افشین سمیعی،[5] دینا سروش

تاریخ دریافت: ۸۴/۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۸۴/۷/۱۴

چکیده

هدف

مصونیت علیه لیشمانیوز با تحریک سیستم ایمنی از نوع ایمنی سلولی صورت می گیرد. آنتی ژن Recombinant Leishmania major Stress & Temperature Inducible Protein 1(rLmSTI1) به عنوان کاندیدای واکسن لیشمانیوز مطرح شده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر استفاده از لیپوزوم به عنوان یک حامل جهت ارائه آنتی ژن rLmSTI1 به منظور القای پاسخ ایمنی از نوع ایمنی سلولی در موش های BALB/c در برابر لیشمانیوز می باشد.

مواد و روش کار

لیپوزوم های حاوی rLmSTI1 با استفاده از فسفولیپید Distearoylphosphatidylcoline (DSPC) و کلسترول با روش دهیدراسیون-رهیدراسیون تهیه شدند. خصوصیات مورفولوژی و اندازه لیپوزوم ها توسط میکروسکپ نوری و دستگاه آنالیز کننده اندازه ذره ای ارزیابی گردیدند. فراورده های تهیه شده شامل فراورده لیپوزومی حاوی آنتی ژن rLmSTI1 ، محلول آنتی ژن rLmSTI1 ، محلول PBS (phosphate buffer saline) و لیپوزوم خالی به صورت زیر جلدی به موش های BALB/c ماده سه مرتبه به فاصله ۳ هفته تزریق شد. سه هفته بعد از آخرین تزریق یادآور، موش ها با تزریق پروماستیگوت های زنده لیشمانیا ماژور ($۱/۵\times۱۰^{۶}$) به صورت زیر جلدی تحت آزمون چالش قرار گرفتند. میزان تورم و بروز زخم در پای موش ها به صورت هفتگی به مدت ۱۲ هفته اندازه گیری شد. میزان آنتی بادی های ضد لیشمانیایی (IgG total, IgG1, IgG2a)در سرم موشهای واکسینه شده با تکنیک ELISA ، قبل و ۱۲ هفته بعد از آزمون چالش، مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین تعداد انگل موجود در طحال موشهای واکسینه شده مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در بین گروههای مختلف، لیپوزومهای حاوی آنتی ژن rLmSTI1 بیشترین تاثیر را در جلوگیری از تورم و زخم داشته و بیشترین تیتر آنتی بادی IgG2a را تولید کرده بودند. همچنین کمترین تعداد انگل در طحال مربوط به موشهای واکسینه شده با لیپوزومهای حاوی آنتی ژن rLmSTI1 بود.

نتیجه‌گیری

ارائه آنتی ژن rLmSTI1 توسط لیپوزوم می تواند سیستم ایمنی را به نحو موثرتری در مقایسه با زمانی که آنتی ژن به صورت محلول ارائه می شود، به سمت ایمنی سلولی سوق داده و باعث محافظت موشها در مقابل لیشمانیوز شود.

کلمات کلیدی: واکسن، لیپوزوم، LmSTI1، لیشمانیوز پوستی، ایمنی سلولی.

۱- دستیار گروه فارماسوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- دانشیار گروه فارماسوتیکس، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵-۰۵۱۱ نمابر، ۸۸۲۳۲۵۱ – ۰۵۱۱ ، mr_jaafari@yahoo.com

۳- استادیار ایمونولوژی، مرکز بیماریهای پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران

٤- کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پژوهشکده بوعلی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۵- کارشناس بیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پژوهشکده بوعلی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوز بیماری انگلی مشترک بین انسان و حیوان است که عامل آن گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا می باشد. تظاهرات بالینی بیماری بسته به گونه انگل و پاسخ ایمنی میزبان متفاوت می باشد، به طوری که از یک عفونت جلدی (سالک) خود به خود محدودشونده تا شکل احشایی کشنده متغیر است (۱). سالک از انواع دیگر بیماری (احشایی و مخاطی-پوستی) شایع تر بوده به طوری که هر ساله نزدیک به ۷۰٪ کل موارد جدید گزارش شده (حدود ۱/۵-۱ میلیون نفر) مربوط به این شکل بیماری می باشد . ۹۰٪ موارد سالک جهان از کشورهای ایران، افغانستان، عربستان سعودی، سوریه، برزیل و پرو گزارش شده است. این بیماری به دلیل انتشار وسیع، دشوار بودن درمان، مشکلات موجود در کنترل و پیشگیری بیماری یکی از مشکلات بهداشتی بعضی مناطق اندمیک محسوب می شود. لذا حل این مشکل جزء یکی از اولویت های سازمان بهداشت جهانی (WHO/TDR) قرار گرفته است (۲). درمان لیشمانیوز به کمک ترکیبات آنتی موآن صورت می گیرد که گرانقیمت بوده و همراه با عوارض جانبی است و متاسفانه همیشه موثر نیست. مبارزه با مخازن و ناقلین نیاز به بودجه کلان دارد و خصوصا در مواردی که مخزن بیماری انسان نیست تقریبا تاکنون نا موفق بوده است. بنا به دلایل متعدد از جمله مصونیت درازمدت بعد از بهبودی و جلوگیری از عفونت طبیعی با لیشمانیزاسیون، پژوهشگران را بر این باور داشته که یافتن واکسنی موثر در برابر لیشمانیوز امکان پذیر است (۲).

نوع پاسخ ایمنی ایجاد شده، تعیین کننده سرنوشت عفونت در مدل حیوانی می باشد. بدین معنی که عفونت با لیشمانیا ماژور در مدل موش های نژاد های مقاوم مثل C57BL/6 با بروز پاسخ Th_1 همراه است که باعث ایجاد زخم پوستی خود بخود بهبود یابنده شبیه سالک انسانی می گردد و بهبودی همراه با مصونیت در مقابل عفونت بعدی می باشد. عفونت با لیشمانیا ماژور در مدل موش های نژاد حساس BALB/c با بروز پاسخ Th_2 همراه است که باعث احشایی شدن عفونت و مرگ حتمی موشهای آلوده می گردد (۱، ۳، ۴). بروز پاسخهای Th_1/Th_2 را با الگوی سایتوکاینی نشان می دهند. IFN-γ با فعال سازی ماکروفاژها و در نتیجه از بین بردن انگل‌های داخل سلولی باعث کنترل بیماری می‌شود درحالی که وجود IL-4 در ابتدای عفونت یکی از عوامل مهم در بروز حساسیت در برابر بیماری و پاسخ Th2 می باشد (۴، ۵، ۶). همچنین با بررسی ایزوتایپ‌های مختلف ایمونوگلوبولینی می توان نوع واکنش ایمنی را مشخص کرد. به طور کلی غلبه تیتر IgG1، دلیل بروز پاسخ Th_2 است، در حالی که افزایش تیتر IgG2a دلیلی بر غلبه پاسخ Th_1 می باشد (۷، ۸).

تعدادی از آنتی ژن های نوترکیب انگل لیشمانیا به عنوان واکسنهای نسل دوم در مدلهای حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله آنتی ژن L. major Stress & Temperature Inducible Protein1 (LmSTI1) را می توان نام برد. این آنتی ژن جزء خانواده پروتئین های stress inducible بوده که در هر دو شکل پروماستیگوت و آماستیگوت انگل لیشمانیا وجود دارد. شکل نوترکیب این آنتی ژن (rLmSTI1) دارای وزن مولکولی حدود ۶۲ kDa و محلول در آب می باشد (۹). این آنتی ژن در مدل موشی، وقتی همراه با IL-12 به عنوان ادجوانت استفاده شود، باعث بروز پاسخ ایمنی از نوع Th_1 می گردد (۱۰). همچنین این آنتی ژن همراه با آنتی ژن T-cell Antigens Thiol-Specific Antioxidant (TSA) و Leishmania Elongation Initiation Factor (LeIF) به صورت سه گانه (trifusion) در مرحله فاز ۱ کارآزمایی بالینی در آمریکا می باشد.

لیپوزوم ها وزیکولهای میکروسکوپی، شامل دو لایه فسفولیپیدی می‌باشند و فضاهای مائی را در برمی‌گیرند (۱۱). این وزیکول‌ها سیستم‌های مناسبی جهت دارو رسانی برای داروهای محلول درآب یا محلول درچربی، پپتیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌باشند(۱۲).

بررسی ها نشان داده که لیپوزوم ها از طریق افزایش جذب (uptake) آنتی ژن توسط سلولهای عرضه کننده آنتی ژن (Antigen Presenting Cells - APCs) باعث بروز پاسخ قویتر سیستم ایمنی به آنتی ژن های پروتئینی می شوند (۱۳). عوامل مختلفی از قبیل نوع فسفولیپیدهای مصرف شده ، نوع و میزان بار سطحی لیپوزوم، اندازه و شکل لیپوزوم، میزان کلسترول موجود در فرمولاسیون لیپوزوم و نحوه استقرار آنتی ژن در لیپوزوم می توانند نوع و شدت پاسخ ایمنی را تحت تاثیر قرار دهد. مطالعات بسیاری در خصوص بیان تاثیر هر یک از این عوامل انجام شده است (۱۹-۱۴).

Archive of SID

www.SID.ir

بنابراین توجه به این نکته که یک واکسن موثر در برابر لیشمانیا می بایست به صورت انتخابی باعث القای پاسخ ایمنی از نوع Th_1 شود لذا می توان با انتخاب یک فرمولاسیون لیپوزومی مناسب به عنوان ایمونوادجوانت به همراه یک آنتی ژن کاندیدا به صورت انتخابی باعث تحریک پاسخ ایمنی مورد نظر گردید. در این مطالعه برای اولین بار، آنتی ژن نوترکیب LmSTI1 که در مطالعات مختلف به عنوان آنتی ژنی مناسب جهت تحریک پاسخ ایمنی سلولی معرفی شده است (۱۰-۷ و ۲۰) به شکل لیپوزومی ارائه شده و میزان تاثیر لیپوزوم به عنوان ایمونوادجوانت در افزایش اثر این آنتی ژن مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

حیوان: موش BALB/c ماده ۶-۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور واحد کرج خریداری شد. موشها در دمای ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند.

انگل *Leishmania major*: انگل لیشمانیا ماژور (سویه MRHO/IR/75/ER)، از موش BALB/c جدا گردید. ابتدا انگلها در محیط آگار خوندار (NNN) کشت داده شد و سپس به محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FCS, ۱۰۰ U/ml پنی سیلین G و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین انتقال داده شد. انگلها در مرحله ایستای رشد برداشت و جهت آزمون چالش استفاده گردید.

مواد: فسفولیپید دی استئاریل فسفاتیدیل کولین (DSPC) و کلسترول(.Chol) از شرکت Avanti (آمریکا) خریداری شد. کوماسی بلو، گلایسین، تریس، سدیم دودسیل سولفات، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، آمونیوم پر سولفات، N,N,N,N- تترامتیل اتیلن دی آمین (Temed)، ۲-مرکاپتواتانل، نیترات نقره، تیوسولفات سدیم، کربنات سدیم، اسید سولفوریک، دی متیل سولفوکساید (DMSO) و سایر حلالهای مورد استفاده از نوع تجزیه ای (Analytical grade) بوده و از شرکت MERCK (آلمان) خریداری گردید. آلبومین سرم گاوی(BSA) از شرکت FLUKA (سوئیس)، استاندارد پروتئین با وزن مولکولی پایین از شرکت SIGMA (آمریکا)، پودر محیط کشت RPMI-1640 از شرکت IMEDIA (هند)، Fetal Calf Serum (FCS) از شرکت EUROBIO، استرپتومایسین و پنی سیلین از شرکت داروسازی جابربن حیان (ایران) تهیه گردید.

تهیه لیپوزوم به روش دهیدراسیون-رهیدراسیون (Dehydration Rehydration Vesicle): در این روش در یک بالن ته گرد فسفولیپیدDSPC (20µmol/ml) و کلسترول به نسبت مولی ۲ به ۱ توسط حلال آلی (کلروفرم: متانول به نسبت حجمی ۲ به ۱) حل گردید. سپس در دستگاه خلاء چرخان (Heidolph, Germany)، حلال آلی تبخیر شد. به فیلم لیپیدی حاصله در دمای بالاتر از Tm (Transition temperature) فسفولیپید (۵۵ ºC) آب مقطر استریل اضافه گردید تا تشکیل MLV (Multilamellar Vesicle) اولیه را بدهد. لیپوزوم‌های MLV به کمک دستگاه Extruder (Avestin, Canada) از فیلتر ۱۰۰ نانومتری گذرانده شده تا به LUV (Large Unilamellar Vesicle) با اندازه حدود ۱۰۰ نانومتر تبدیل شود. سپس آنتی ژن به LUV های خالی حاصل افزوده شد. مخلوط به مدت ۲ ساعت در فریزر ۷۰- ºC منجمد و توسط دستگاه Freeze-Drier خشک شد. فرآورده پس از خشک شدن با یک دهم حجم کل LUV های اولیه توسط آب مقطر استریل هیدراته شد. در نهایت لیپوزوم های حاصل که معمولا لیپوزوم های چند لایه‌ای کوچک می‌باشند با بافر PBS (Saline Phosphate Buffer) به حجم رسانده شد. حجم نهایی بعد از شستشوی لیپوزومها و جدا نمودن rLmSTI1 انکپسوله نشده، با توجه به نتایج به دست آمده از اندازه گیری آنتی ژن به گونه‌ای تنظیم شد که در هر ۵۰ µl فرآورده نهایی ۲ µg آنتی ژن rLmSTI1 وجود داشته باشد.

بررسی مورفولوژی و اندازه لیپوزوم‌های تهیه شده: برای بررسی شکل، اندازه و Lamellarity لیپوزوم‌های به دست آمده از میکروسکوپ نوری استفاده گردید. در این روش ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لیپوزومی توسط بافر PBS، ۱/۱۰ رقیق شد. اندازه‌گیری لیپوزومها به کمک یک میکرومتر موجود روی عدسی چشمی میکروسکوپ صورت گرفت. همچنین از دستگاه آنالیز اندازه ذره ای (Particle Size Analyzer) (Klotz, Germany) جهت بررسی توزیع اندازه ذره ای لیپوزوم های تهیه شده استفاده شد. ۱۰۰ µl سوسپانسیون لیپوزومی با ۸ ml آب مقطر رقیق و به دستگاه تزریق شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی، تعیین مقدار و محاسبه درصد انکپسولاسیون آنتی ژن rLmSTI1 در لیپوزوم های تهیه شده: برای جداسازی آنتی ژن انکپسوله نشده از میکروسانتریفوژ (Eppendorf, Germany) استفاده گردید. محلول حاوی لیپوزوم ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ ºC سانتریفوژ گردید. محلول شفاف بالای لیپوزوم ها به آرامی جدا و جهت شستشو به لیپوزوم های رسوبی بافر PBS افزوده شد. عمل مذکور سه مرتبه تکرار شد. بعد از جمع‌آوری محلول رویی حاصل از ۳ مرتبه شستشو، مقدار آنتی‌ژن موجود در آن اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری آنتی ژن به روش برادفورد به دلیل یک مرحله‌ای بودن، صرف زمان کمتر و همچنین حساسیت بیشتر صورت گرفت(۲۱). پس از اندازه گیری مقدار آنتی ژن درصد محصور سازی با استفاده از فرمول ذیل تعیین گردید.

سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) نمونه پروتئینی و لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌ژن: وجود rLmSTI1 در لیپوزومهای تخلیص شده توسط سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورزیس (SDS-PAGE) بررسی شد. آنالیز SDS-PAGE نمونه پروتئینی و لیپوزوم‌های حاوی rLmSTI1 در ژل حاوی ۳٪ آکریل آمید به عنوان ژل متراکم کننده و ۱۲/۵٪ آکریل آمید به عنوان ژل جداکننده انجام شد. بافر الکتروفورز حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۱۹۲ میلی مول گلایسین و ۰/۱٪ SDS با pH نهایی ۸/۳ بود. پس از الکتروفورز، ژلها برای ردیابی پروتئین با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد.

واکسیناسیون موشها: موش‌های BALB/c به گروه‌های ۱۰ تایی (۴ گروه) تقسیم شده و مشخصات، نوع آنتی ژن دریافتی و تاریخ تزریق‌ها روی هر قفس ثبت شد. هر موش در گروه نیز علامت گذاری گردید. ۵۰ µl از فرآورده های تهیه شده به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت موش تزریق شد. تزریق نوبت دوم و سوم (به عنوان تزریق های یادآور) با فواصل ۲۱ روزه با همان دوز صورت گرفت. در تمامی گروهها تزریق اول، روز صفر محسوب شد. فرآورده‌های تزریق شده به شرح ذیل بودند:

۱)گروه شاهد منفی: PBS Solution ، ۲)گروه شاهد لیپوزوم خالی: .DSPC/Chol، ۳)گروه آنتی ژن به صورت محلول: rLmSTI1 Solution، ۴)گروه آنتی ژن به صورت لیپوزومی: DSPC/Chol. / rLmSTI1

اندازه‌گیری تیتر IgG2a, IgG1, IgG: نمونه‌های سرمی ۲۱ روز بعد از آخرین تزریق واکسن و ۱۲ هفته بعد از چالش با انگل زنده جمع‌آوری شد و ارزیابی تیتر آنتی بادی IgG2a, IgG1, IgG اختصاصی در برابر آنتی ژن Soluble Leishmanial Antigen (SLA) به کمک روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) صورت گرفت. به طورخلاصه در این روش ابتدا چاهک های پلیت ۹۶ خانه‌ای با آنتی ژن SLA (۵۰ µl/well / ۰/۵ µg)پوشش داده شد و به مدت یک شب در دمای ۴ ºC انکوبه شد. پس از شستشوی چاهک ها با بافر شستشو دهنده، ۱۰۰ µl بافر بلوک کننده (محلول ۱٪ BSA داخل PBS) افزوده شد. نمونه‌های سرمی با محلول PBS-Tween، ۱/۲۰۰ رقیق شده و به هر چاهک ۵۰µl از این محلول اضافه شد. بعد از یک ساعت در دمای ۳۷ ºC پلیت‌ها به کمک بافر شستشو ۳ مرتبه شسته شدند. در مرحله بعد ۵۰µl از محلول ۱/۱۰۰۰ رقیق شده IgG2a یا HRP-Conjugated rabbit antimouse IgG1 و برای IgG , ۵۰µl از محلول ۱/۲۰۰۰۰ رقیق شده HRP-Conjugated rabbit antimouse IgG به هر چاهک (۳ تکرار) اضافه گردید. ارزیابی با افزودن ۱۰۰ µl سوبسترای TMB (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine) صورت گرفت و در پایان بعد از افزودن محلول Stopping (اسید سولفوریک N ۴) به میزان ۱۰۰ µl به هر چاهک، جذب چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ nm به کمک دستگاه ELISA Reader (Statfax, USA) اندازه‌گیری شد. طول موج ۶۳۰ nm به عنوان طول موج رفرانس استفاده شد.

چالش با انگل زنده: پس از اتمام مراحل ایمن سازی به منظور تعیین میزان مصونیت زایی فرآورده های تهیه شده، موشها ۲۱ روز بعد از آخرین تزریق یادآور، با انگل زنده لیشمانیا ماژور چالش شدند. به منظور انجام آزمون چالش، از پاساژ ۴-۳ انگل استفاده شد و انگل در مرحله ایستای رشد برداشت گردید.

پس از تکثیر و برداشت ، انگلها با PBS شسته شده و حجم محلول انگلی به گونه‌ای با PBS تنظیم شد که هر میلی لیتر آن حاوی ۳×۱۰^{۷} انگل لیشمانیا ماژور باشد. ۵۰ µl از محلول انگلی حاوی پروماستیگوتهای زنده به کف پای راست هر موش به صورت

Archive of SID
www.SID.ir

زیر جلدی تزریق شد و به عنوان شاهد همین حجم PBS به کف پای چپ تزریق گردید. اندازه ضایعه با اندازه گیری قطر پای راست و چپ موشها هر ۷ روز یک بار با استفاده از کولیس دیجیتالی (Mitutoyo , Japan) انجام شد. اندازه ضایعه به صورت اختلاف بین قطر پای راست و چپ بیان شد.

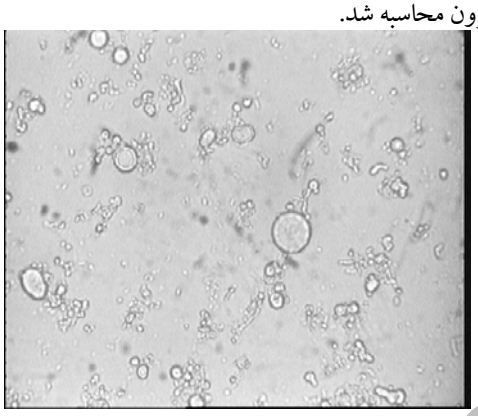
بررسی تعداد انگل موجود در طحال گروههای مختلف بعد از چالش با انگل زنده: به منظور تعیین تعداد انگلهای زنده در بافت آلوده سیستم دو فازی شامل فاز مایع حاوی محیط RPMI-1640، ۱۰٪ FCS, ۱۰۰U/ml پنی سیلین G و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (محیط RPMI-1640 کامل) بر روی یک لایه جامد از آگار خوندار تهیه گردید. محیط کشت آگار جامد (Bacto-agar, Difco) حاوی ۱۰٪ خون هپارینه استریل خرگوش و ۰/۶٪ نمک طعام تهیه شد و تحت شرایط استریل، محیط کشت(۵۰ میکرولیتر) داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای توزیع شد. به منظور بررسی تعداد انگلهای موجود در طحال موشهای آلوده به انگل، طحال موشها بعد از نخاعی شدن تحت شرایط استریل برداشته و داخل چاهک پلیت حاوی محیط کشت RPMI-1640 کامل قرار داده شد. پس از هموژن شدن طحال توسط پیستون سرنگ حجم چاهک ها با محیط کشت RPMI-1640 کامل به ۲/۵ میلی لیتر رسانده شد. از هر طحال ۸ رقت به صورت رقیق سازی سریال ۱/۱۰ تهیه شد. ۱۵۰ میکرولیتر از هر رقت (۱۲ تکرار) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حاوی آگار خوندار افزوده شد. پلیت های تهیه شده به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۶ ^{o}C نگهداری شدند. پس از انکوباسیون تمامی چاهکها از لحاظ وجود ویا عدم وجود انگل بررسی شد. نتایج به صورت مثبت (مشاهده انگل) و منفی (عدم مشاهده انگل) در رقت های مختلف یادداشت شد. نتایج به کمک نرم افزار آماری ELIDA به صورت تعداد انگل در طحال گزارش شده است.

ارزیابی آماری: برای ارزیابی آماری داده‌ها آزمون آنالیز واریانس یکطرفه 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.

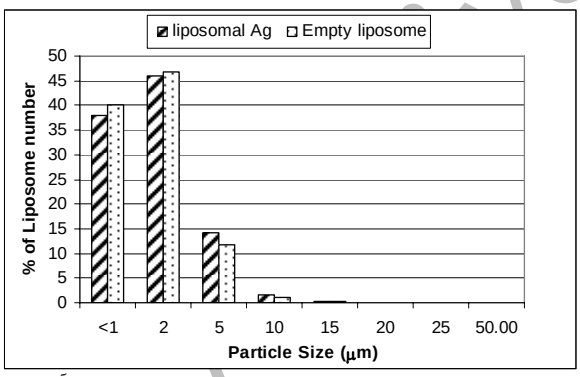
نتایج

بررسی مورفولوژی و اندازه لیپوزوم‌های تهیه شده

مطالعات انجام شده توسط میکروسکوپ نوری بر روی لیپوزومهای تهیه شده نشان داد که اغلب لیپوزوم‌های حاصله از نوع MLV های کوچک می باشند (شکل ۱). به کمک دستگاه آنالیز اندازه ذره ای، توزیع اندازه ذره‌ای لیپوزوم های تهیه شده بررسی شد (نمودار ۱). میانگین اندازه ذره ای برای لیپوزوم های حاوی آنتی ژن و لیپوزومهای خالی به ترتیب ۰/۲۵ ± ۱/۱۱ و ۰/۲ ± ۱/۰۲ میکرون محاسبه شد.



شکل ۱: عکس میکروسکوپ نوری مربوط به لیپوزمهای تهیه شده حاوی آنتی ژن LmSTI1 (بزرگنمایی ×۴۰).



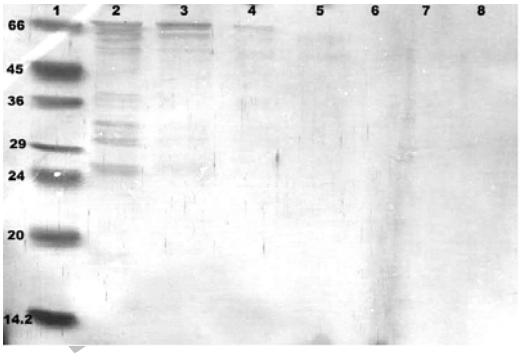
نمودار ۱: نمودار توزیع اندازه ذره ای لیپوزومهای حاوی آنتی ژن rLmSTI1 و لیپوزومهای خالی گروه کنترل، اندازه گیری شده توسط دستگاه Particle size Analyzer.

بررسی SDS-PAGE لیپوزوم‌های حاوی آنتی ژن rLmSTI1

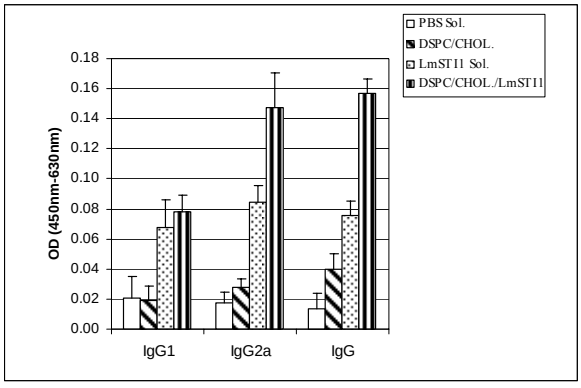
شکل ۲ آنالیز SDS-PAGE فرمولاسیون‌های مختلف لیپوزومهای حاوی آنتی ژن rLmSTI1 را نشان می‌دهد. به منظور اثبات کیفی وجود آنتی ژن rLmSTI1 در لیپوزوم، پس از جداسازی لیپوزوم‌ها به وسیله میکروسانتریفوژ، لیپوزوم‌های حاصل تحت

www.SID.ir

بررسی SDS-PAGE قرار گرفتند. باند واضحی در محدوده وزن مولکولی ۶۲ کیلو دالتون مربوط به آنتی ژن خالص rLmSTI1 وجود دارد که این باند در نمونه لیپوزومی تهیه شده نیز مشاهده می‌شود. همچنین این ژل مقادیر آنتی ژن موجود در مایع رویی حاصل از ۳ بار شستشوی فرمولاسیون لیپوزومی را نشان می‌دهد.



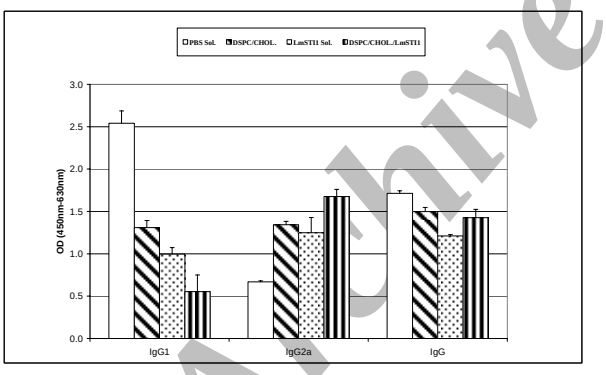
شکل۲: آنالیز SDS-PAGE لیپوزوم حاوی آنتی ژن rLmSTI1
۱- استاندارد وزن مولکولی پروتئینی با دامنه کم سیگما (از بالا ٦٦، ٤٥، ٣٦،٢٩،٢٤، ٢٠ و ١٤/٢ کیلو دالتون) ، ٢- پروتئین rLmSTI1 به مقدار 1µg، ٣- لیپوزوم حاوی rLmSTI1 پس از جداسازی از پروتئین انکپسوله نشده با میکروسانتریفوژ، ٤- مایع رویی حاصل از شستشوی بار اول لیپوزوم های ستون ٣ که حاوی پروتئین های انکپسوله نشده rLmSTI1 می باشد، ٥- مایع رویی حاصل از شستشوی بار دوم لیپوزوم های ستون ٣ که حاوی پروتئین انکپسوله نشده احتمالی rLmSTI1 می باشد ، ٦- لیپوزوم های خالی فاقد آنتی ژن، ٧- مایع رویی حاصل از شستشوی بار اول لیپوزوم های ستون ٦، ٨- مایع رویی حاصل از شستشوی بار دوم لیپوزوم های ستون ٦.



نمودار ۲: تیتر آنتی بادی های IgG،IgG1 و IgG2a در سرم گروه های مختلف موش های واکسینه شده (۳ هفته بعد از آخرین تزریق واکسن) در برابر آنتی ژن SLA (نتایج به صورت Mean ± SE ارائه شده است، n=۱۰). تیتر آنتی‌بادی IgG2a و IgG درگروهی که لیپوزوم‌های حاوی آنتی ژن rLmSTI1 را دریافت کرده‌اند نسبت به سایر گروهها اختلاف معنی‌دار دارد (p< ۰/۰۵).

بررسی تیتر آنتی بادی‌های IgG2a, IgG1, IgG

بررسی سرم موشهای ایمونیزه شده با فرمولاسیون لیپوزومی ۳ هفته بعد از آخرین تزریق واکسن نشان می‌دهد که تیتر IgG2a در موشهایی که به عنوان واکسن لیپوزوم‌های حاوی آنتی ژن rLmSTI1 را دریافت کرده‌اند نسبت به سایر گروهها اختلاف معنی داری دارد (p< ۰/۰۵) (نمودار ۲) . تیتر آنتی بادی IgG1 در این گروه نسبت به گروهی که آنتی ژن را به صورت محلول دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری نشان نداد (p> ۰/۰۵) (نمودار ۲). تیتر آنتی بادی IgG در مورد گروهی که آنتی ژن را به شکل لیپوزومی دریافت کرده بودند در مقایسه با سایر گروهها اختلاف معنی داری داشت (p< ۰/۰۵). نتایج نشان می دهد که وجود آنتی ژن به صورت لیپوزومی باعث افزایش ترشح IgG تام و IgG2a شده در حالی که تاثیر چندانی بر روی ترشح IgG1 در مقایسه با آنتی ژن محلول نداشته است (نمودار ۲). نتایج به دست آمده از بررسی تیتر آنتی بادی ها ۱۲ هفته بعد از چالش، افزایش قابل توجه تیتر آنتی بادی‌های IgG تام، IgG2a، IgG1 را در تمامی گروهها نسبت به قبل از چالش با انگل زنده نشان می دهد (نمودار ۳).

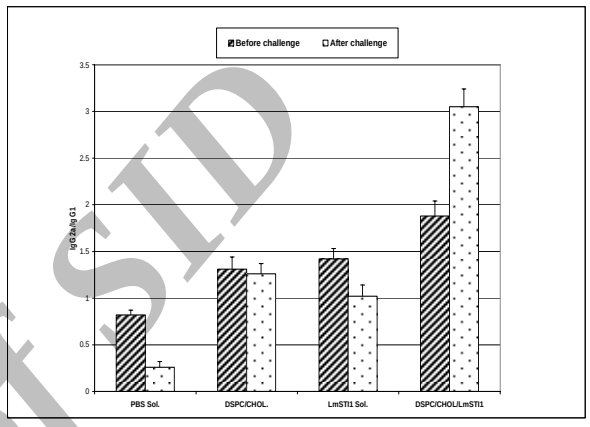


نمودار ۳: تیتر آنتی بادی های IgG2a,IgG1,IgG در سرم گروه های مختلف موش های واکسینه شده (۱۲ هفته بعد از چالش با انگل لیشمانیا ماژور) در برابر آنتی ژن SLA (نتایج به صورت Mean ± SE ارائه شده است، n= ۱۰). تیتر آنتی‌بادی IgG2a درگروهی که لیپوزوم‌های حاوی آنتی ژن rLmSTI1 را دریافت کرده‌اند نسبت به سایر گروهها اختلاف معنی‌دار دارد (p< ۰/۰۵). همچنین تیتر آنتی بادی IgG1 در گروهی که PBS را دریافت کرده‌اند نسبت به سایر گروهها اختلاف کاملا معنی‌دار دارد (p< ۰/۰۰۱).

نتایج نشان می دهد بیشترین تیتر آنتی بادی IgG1 بعد از چالش مربوط به گروه شاهد می باشد (p< ۰/۰۰۱) در حالی که موشهای گروهی که لیپوزوم‌های حاوی آنتی ژن rLmSTI1 را دریافت کرده‌اند، کمترین تیتر آنتی بادی IgG1 را تولید کرده

Archive of SID
www.SID.ir

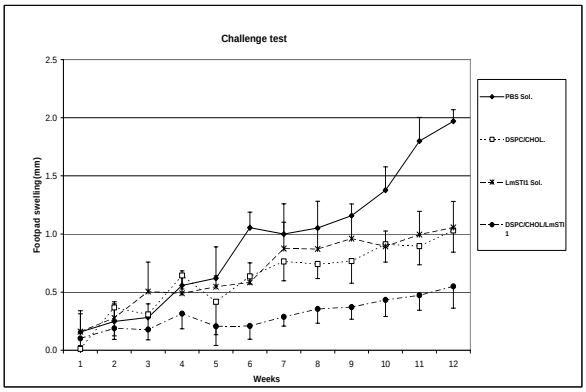
اند (p< ۰/۰۵). از سوی دیگر همین گروه بیشترین تیتر آنتی بادی IgG2a را تولید کرده است. از آنجائی که بالا بودن نسبت تیتر آنتی بادی IgG2a به IgG1 معرف تحریک پاسخ سیستم ایمنی نوع Th_1 می باشد لذا می توان نتیجه گرفت استفاده آنتی ژن به شکل لیپوزومی باعث بروز پاسخ ایمنی از نوع Th_1 شده است (نمودار۴).



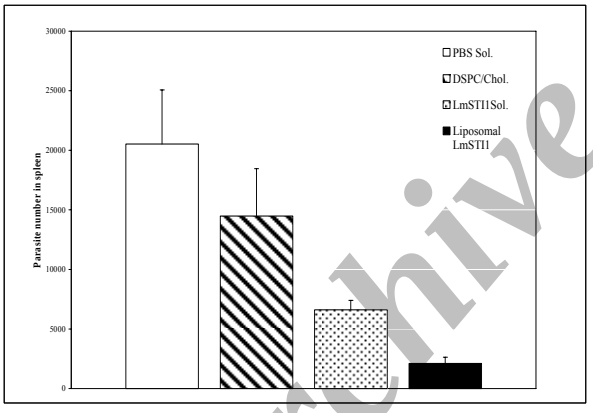
نمودار٤: نسبت تیتر آنتی بادی های IgG2a/IgG1 در سرم گروه های مختلف موش های واکسینه شده (قبل و بعد از چالش با انگل لیشمانیا ماژور)علیه آنتی ژن SLA. نسبت تیتر آنتی‌بادی / IgG2a IgG1 درگروهی که لیپوزوم‌های حاوی آنتی ژن rLmSTI1 را دریافت کرده‌اند، قبل و بعد از چالش با انگل لیشمانیا ماژور نسبت به سایر گروهها اختلاف معنی‌دار دارد (به ترتیب p< ۰/۰۵ و p< ۰/۰۰۱).

بررسی سیر بروز ضایعه بعداز چالش

ایمونیزاسیون موشهای حساس BALB/c با لیپوزومهای حاوی rLmSTI1 به صورت معنی داری (p<۰/۰۱) تورم کف پا را در مقایسه با گروهی که PBS (گروه کنترل) دریافت کرده بودند کنترل کرده است (نمودار ۵). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه دریافت کننده لیپوزومهای حاوی rLmSTI1 با گروه دریافت کننده آنتی ژنrLmSTI1 به صورت محلول و گروه لیپوزوم خالی دیده شد (p< ۰/۰۵). در حالی که استفاده از آنتی ژن rLmSTI1 به صورت محلول همانند گروه لیپوزوم خالی به صورت نسبی توانسته است از پیشرفت تورم در کف پا جلوگیری کند. نتایج حاصل از آنالیز آماری داده های به دست آمده اختلاف معنی داری بین گروه دریافت کننده آنتی ژن به صورت محلول و گروه دریافت کننده لیپوزومهای خالی نشان نمی دهد (p> ۰/۰۵).



نمودار ۵: میانگین اندازه افزایش ضخامت کف پای چپ در گروههای مختلف موش های BALB/c واکسینه شده ، پس از چالش با انگل لیشمانیا طی هفته های متوالی(نتایج به صورتMean ±SEM ارائه شده است،n=۱۰). میزان تورم کف پای موشهای گروهی که لیپوزوم حاوی آنتی ژن rLmSTI1 را دریافت کرده‌اند نسبت به سایر گروهها در کمترین مقدار بود (p< ۰/۰۵) در حالی که این مقدار برای گروهی که PBS را به عنوان واکسن دریافت کرده‌اند بیشترین مقدار بعد از ۱۲ هفته بود (p< ۰/۰۰۱).



نمودار ٦: تعداد انگل لیشمانیا ماژور موجود در طحال گروههای مختلف موشهای BALB/c واکسینه شده (۱۲ هفته بعد از چالش با انگل لیشمانیا ماژور) (نتایج به صورتMean ±SE ارائه شده است،n=۳). اختلاف معنی‌دار بین تعداد انگل در طحال گروهی که لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌ژن rLmSTI1 را دریافت کرده‌اند در مقایسه با سایر گروهها دیده می‌شود (p< ۰/۰۵).

بررسی تعداد انگل *L. major* در طحال موشهای واکسینه شده بعد از چالش

نمودار ۶ تعداد انگل در طحال موشهای واکسینه شده را ۱۲ هفته بعد از انجام آزمون چالش نشان می دهد. بررسی تعداد انگل در طحال به منظور بررسی سیر بیماری و احشایی شدن آن انجام گرفت. نتایج نشان می دهد که تعداد انگل در طحال

Archive of SID
www.SID.ir

موشهای واکسینه شده با لیپوزومهای حاوی آنتی ژن rLmSTI1 در مقایسه با گروه کنترل PBS به نحو بارزی کاهش یافته است. نتایج نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین تعداد انگل موجود در طحال گروهی که آنتی ژن را به صورت محلول دریافت کرده اند با گروهی که آنتی ژن را به صورت لیپوزومی دریافت داشتند وجود دارد ($p< ۰/۰۵$). همچنین اختلاف معنی داری بین گروهی که لیپوزومهای خالی را دریافت کرده اند با گروه کنترل PBS وجود نداشت ($P> ۰/۰۵$).

بحث و نتیجه گیری

واکسیناسیون موثر علیه لیشمانیوز به ایجاد پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 وابسته است(۲، ۴، ۵، ۶، ۸، ۲۲). مطالعات نشان داده که آنتی‌ژن LmSTI1 توانایی تحریک تولید IFN-γ و آنتی بادی IgG2a اختصاصی در برابر آنتی‌ژن LmSTI1 را داشته و مطالعات in vivo شامل تست ازدیاد حساسیت تاخیری و آزمون چالش با انگل زنده لیشمانیا ماژور در خصوص این آنتی ژن نیز همراه با پاسخ ایمنی سلولی بوده و توانسته باعث مصونیت نسبی موش‌های BALB/c در برابر لیشمانیوزگردد (۱۰-۷ ، ۲۰). در مطالعه ای توانایی این آنتی‌ژن در تحریک ایمنی سلولی در مدل non-human primate در میمون‌های rhesus به همراه آنتی ژن TSA به صورت نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این آنتی‌ژن به همراه آنتی ژن TSA تنها هنگامی که همراه ادجوانت IL-12 استفاده شود می تواند مصونیت ایجاد کند (۲۰). در مطالعه دیگری در موش BALB/c این آنتی‌ژن به همراه آنتی‌ژن‌های TSA و LeIf به صورت سه گانه (Trifusion) با نام leish-111f به همراه ادجوانت IL-12 و (monophosphoryl lipid A-squalene) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این آنتی‌ژن توانایی ایجاد پاسخ ایمنی سلولی را دارد و موشها در مقابل چالش با انگل لیشمانیا ماژور مصون بودند (۱۰).

مطالعات نشان داده که لیپوزومها توانایی تحریک سیستم ایمنی را داشته و حتی می‌توانند نوع پاسخ ایمنی را تعیین کنند. لیپوزوم ها به دلیل اندازه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاص به عنوان جسم خارجی برای بدن محسوب شده و توسط ماکروفاژهای سیستم رتیکولواندوتلیال فاگوسیته می شوند. در واقع لیپوزومها باعث هدف گیری غیرفعال (passive targeting) آنتی ژنها به سمت APCs می شوند (۲۴،۲۳،۱۳). به منظور رساندن موثرتر آنتی‌ژن به سلولهای APC، امروزه از مکانیسم هدف گیری فعال استفاده می‌شود. برای این منظور ایمونولیپوزومها استفاده می‌شوند. در این نوع بر روی سطح لیپوزوم آنتی بادی خاص که معمولا آنتی بادیهای ویژه در برابر یکسری از آنتی‌ژنهای سطحی سلولهای APC می باشد متصل می‌شود. در این سیستمها اختصاصا آنتی‌ژنها به سلولهای APC رسانده می‌شوند.

فسفولیپیدهای مختلف اثرات متفاوتی در تولید آنتی‌بادی‌ها و حتی میزان ترشح آنها دارند. به طوری که DSPC باعث ایجاد تیتر بالاتری از ایزوتیپ‌های IgG در مقایسه با DMPC (Dmyristoyl phosphatidyl choline) و PC (Phosphatidyl choline) می‌شود (۱۸، ۱۹). درصد کلسترول در فرمولاسیون هم می‌تواند بر روی میزان تحریک پاسخ سیستم ایمنی موثر باشد. به طوری که اگر مقدار کلسترول در فرمولاسیون لیپوزومی از ۳۰٪ مولی بیشتر باشد، بیشترین تحریک سیستم ایمنی و ترشح سایتوکاین IFN-γ را خواهد داشت (۲۵) . لذا در مطالعه حاضر فرمولاسیون لیپوزومی حاوی DSPC و کلسترول تهیه گردید. مقایسه توزیع اندازه ذره ای لیپوزومهای خالی با لیپوزومهای حاوی آنتی ژن rLmSTI1 نشان داد که محبوس کردن آنتی ژن داخل لیپوزوم تاثیری بر روی اندازه و مورفولوژی لیپوزومهای تشکیل شده نداشته است. عدم تغییر اندازه و مورفولوژی لیپوزومها بعد از انکپسولاسیون ماده موثره توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۲۶،۲۴). در این مطالعه برای تهیه لیپوزومها از روش DRV استفاده شد. این روش یکی از بهترین روشهای تهیه لیپوزومهای حاوی پروتئین می باشد زیرا میزان محصور سازی در این روش بالا است (۲۶). لیپوزومهای DRV حاوی rLmSTI1 تهیه شده در این مطالعه از نوع LUV و یا MLV کوچک غیر هموژن با میانگین اندازه ۱/۱ میکرون بوده و میزان محصور سازی ۷۴٪ محاسبه گردید. درصد محصور سازی بالا در روش DRV به شکل گیری سریع لیپوزوم ها در حضور مقادیر کم فاز مائی در حین مرحله رهیدراسیون نسبت داده می شود. در واقع در

Archive of SID

www.SID.ir

حین مرحله Freeze Drying لیپوزومها دچار شکستگی در ساختمان دو لایه خود شده و مولکولهای فسفولیپید تشکیل دهنده لیپوزوم به شکل خیلی منظم کنار هم قرار می گیرند که در این صورت رهیدراسیون با مقدار کمی آب صورت می پذیرد. علاوه بر این از نظر حفظ پایداری پروتئین این روش نسبت به روشهای دیگر تهیه لیپوزوم ارجح است (۲۶).

استفاده از روش SDS-PAGE در آنالیز نمونه های لیپوزومی حاوی rLmSTI1 به منظور نشان دادن آنتی ژن موجود داخل لیپوزومهای تهیه شده صورت گرفت. روش SDS-PAGE جهت نشان دادن انکپسولاسیون آنتی ژن GP63 جداسازی شده از پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور در لیپوزومهای DRV تهیه شده از DSPC و کلسترول نیز استفاده شده است (۲۴). بررسی میزان خلوص و شناسایی آنتی ژن نوترکیب rLmSTI1 توسط Webb و همکارانش با روش SDS-PAGE برای اولین بار صورت گرفت (۹). همچنین وجود چند قطعه پروتئینی با وزن مولکولی کمتر از ۶۲ کیلودالتون در ژل رنگ آمیزی شده مشابه با قطعات مشاهده شده در شکل ۲ نیز گزارش شده است. وجود قطعات پروتئینی به ناپایداری نسبی پروتئین rLmSTI1 نسبت داده شده است (۹). مطالعات بسیاری در خصوص استفاده از لیپوزوم به منظور افزایش تحریک پاسخ ایمنی سلولی در برابر لیشمانیوز با استفاده از آنتی‌ژن‌های (Leishmania Antigen) LAg, (Autoclaved Leishmania major) ALM, SLA, rGP63 و (Soluble Leishmania donovani Antigen) SDLA صورت گرفته است. در تمام مطالعات فوق نشان داده شده زمانی که آنتی ژن به صورت لیپوزومی ارائه شود سیستم ایمنی به نحو موثرتری تحریک می‌شود(۲۴، ۳۰-۲۷). در یک مطالعه که به منظور بررسی نقش نوع فسفولیپید مصرفی در فرمولاسیون لیپوزومی بر روی میزان تحریک سیستم ایمنی صورت گرفته نشان داده شده که از بین ۳ فسفولیپید PC، DPPC و DSPC مصونیت موش‌های BALB/c در برابر لیشمانیوز زمانی ایجاد می‌شود که آنتی‌ژن لیشمانیا همراه لیپوزوم‌های حاوی فسفولیپید DSPC استفاده شود. فسفولیپید DSPC به علت داشتن Tm بالاتر لیپوزوم‌های محکمتر و با استحکام بیشتر تولید می‌کند. این لیپوزومها در محیط in vivo به راحتی شکسته نشده و محتویات خود را آزاد نمی‌کنند. لذا آنتی‌ژن‌های محبوس داخل لیپوزوم نشت نکرده و نهایتا مقدار آنتی‌ژنی که همراه لیپوزوم در دسترس سلولهای APC قرار می‌گیرد، بیشتر خواهد بود(۲۹).

به منظور بررسی نحوه تاثیر شکل لیپوزومی آنتی ژن rLmSTI1 در محافظت موشهای BABL/c در برابر لیشمانیوز بعد از انجام مراحل ایمونیزاسیون ابتدا سرم موشهای واکسینه شده جمع‌آوری و سپس آزمون چالش انجام گرفت. بررسی تاثیر لیپوزوم‌های حاوی آنتی ژن های مختلف انگل لیشمانیا در محافظت موشهای BALB/c و CBA/ca در برابر لیشمانیوز به کمک آزمون چالش توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است (۲۰، ۲۴، ۳۰-۲۷). ۱۲ هفته بعد از چالش به منظور ارزیابی سرنوشت عفونت ایجاد شده مجددا سرم موشهای چالش شده با انگل زنده جمع‌آوری شده و عیار آنتی بادی‌های مربوطه در آنها بررسی گردید. در این مطالعه نسبت IgG2a/IgG1 در گروه لیپوزوم حاوی آنتی‌ژن هم قبل از چالش و هم بعد از آن بیشتر از یک بود (نمودار۴) که نشان دهنده القاء پاسخ Th_1 در این گروه می‌باشد، این گروه در تست چالش با انگل زنده بیشترین مصونیت را از خود نشان داد. ولی در گروه آنتی ژن محلول نسبت IgG2a/IgG1 حدود یک بود که نشان دهنده تحریک نسبی هم Th_1 و هم Th_2 می‌باشد، این گروه به همین دلیل در تست چالش مصونیت نسبی نشان داد. علاوه بر این نشان داده شده است که موش حساس BALB/c وقتی با لیشمانیا ماژور عفونی می شود یک پاسخ Th_2 القاء شده و آنتی‌بادیهای IgG1 ایجاد می‌شود، در حالی که موشهای مقاوم C57BL/6 این فعالیت را تضعیف نموده و باعث افزایش پاسخ Th_1 به همراه تولید آنتی‌بادیهای IgG2a می‌شوند (۶،۴) که این مطلب به وضوح در گروه کنترل PBS که قبل از چالش تیتر IgG1 آن خیلی پایین است ولی بعد از آن خیلی بالا می‌رود قابل مشاهده است. همچنین با توجه به این موضوع که انگل لیشمانیا ماژور در موشهای BALB/c باعث بروز پاسخ Th_2 و احشایی شدن لیشمانیوز می گردد لذا تعداد انگل‌های موجود در طحال موشهای واکسینه شده نیز بررسی شد. در صورتی که بر اثر واکسیناسیون پاسخ Th_1 تحریک شده باشد، میزان رشد انگل در احشاء خصوصا طحال کاهش می یابد و در صورتی که پاسخ Th_2

Archive of SID

www.SID.ir

غلبه کرده باشد، لیشمانیوز احشایی شده و تعداد زیادی انگل لیشمانیا ماژور در طحال موشها قابل ردیابی خواهد بود. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که شکل لیپوزومی آنتی ژن rLmSTI1 توانسته تا حد زیادی از پیشرفت احشایی شدن بیماری جلوگیری کند. تعداد انگلهای موجود در طحال این گروه از موش‌ها در مقایسه با گروهی که آنتی‌ژن را به صورت محلول دریافت کرده اختلاف معنی داری ($p< ۰/۰۵$) دارد. بررسی تعداد انگل در طحال به منظور بررسی سیر بیماری و احشایی شدن آن توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است(۲۸،۲۷).

نتایج حاضر نشان می‌دهد که می‌توان از لیپوزوم به عنوان ادجوانت تحریک پاسخ ایمنی سلولی در برابر لیشمانیوز مدل موشی استفاده کرد. از سوی دیگر نتایج نشان می دهد که قدرت ایمنی زائی آنتی‌ژن rLmSTI1 زمانی که به صورت لیپوزومی مصرف می‌شود افزایش یافته و لذا این امکان وجود خواهد داشت که بتوان واکسنی موثر در برابر لیشمانیوز با استفاده از لیپوزوم و آنتی ژن rLmSTI1 تهیه کرد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از حمایتهای مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مشهد تشکر و قدردانی می شود. همچنین از آقای Dr. J. Webb جهت اهدای آنتی ژن rLmSTI1 و آقای Dr. R. Titus جهت ارسال نرم افزار ELIDA تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Reed S. G., 2001, Leishmaniasis vaccination: Targeting the source of infection, J. Exp. Med., 194, F7-F9.
2. Handman E., 2001, Leishmaniasis: current status of vaccine development, Clinic. Microbiol. Rew., 14, 229-243.
3. Roberts L. J., Handman E., Foote S. J., 2000, Science, medicine and the future of leishmaniasis, B. M. J., 321, 801-804.
4. Sacks D., Noben-Trauth N., 2002, The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice, Nat. Rev. Immunol., 2, 845-858.
5. Reiner S. L., Locksley R. M., 1995, The regulation of immunity to leishmania major, Annu. Rev. Immunol., 3,151-177.
6. Mcsorley S., Proudfoot L., O`Donnell C. A., Liew F., 1996, Immunology of murine leishmaniasis, Clinics in Dermatology., 14, 451-464.
7. Campos-Neto A., Webb J. R., Greeson K, Coler R. N., Skeiky Y. A., Reed S. G., 2002, Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against leishmania major infection in susceptible BALB/c mice, Infect. Immun., 70, 2828-2836.
8. Coler R. N., Skeiky Y. A., Bernards K., Greeson K., Carter D., Cornellison C. D., Modabber F., Campos-Neto A., Reed S. G., 2002, Immunization with a polyprotein vaccination consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, leishmania major stress-inducible protein 1, and leishmaniasis, Infect. Immun., 70, 4215-4225.
9. Webb J. R., Kufmann D., Campos-Neto A., Reed S. G., 1996, Molecular cloning of a novel protein antigen of leishmania major that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis, J. Immunol., 157, 5034-5041.
10. Skeiky Y. A., Coler R. N., Branon M., Stromberg E., Greeson K., Crane R. T., Campos-Neto A., Reed S. G., 2002, Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (leish-111f) formulated in MPL adjuvant, Vaccine., 20, 3292-3303.
11. Daonilo D. L., 1997, Liposome in Gene Delivery, Raton B., (ed.), CRC Press, 67-91.
12. Gregoriadis G., 1987, Liposomes as immunological adjuvants: antigen incorporation studies, Vaccine., 5, 145-151.
13. Gregoriadis G., 1990, Immunological adjuvant: a role for liposomes, Immunology Today., 11, 89-97.
14. Brewer J. M., Tetley L., Richmond J., Liew F.Y., Alexander J., 1998, Lipid vesicle size determines the Th_1 or Th_2 response to entrapped antigen, J. Immunol., 161, 4000-4007.
15. Katragadda A., Bridgman R., Betageri G., 2000, Effect of liposome composition and cholestrol on the cellular uptake of stavudine by human monocyte/macrophages, Cellular and Molecular Biology Letters., 5, 483-493.
16. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Tanaka K., Mayumi T., 1999, Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins, J. Cont. Rel., 61, 233-240.

Archive of SID
www.SID.ir

17. Oussoren C., Stom G., 2001., Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration, Adv. Drug Deliv., 50, 143-156.
18. Phillips N. C., Gagne L., Ivanoff N., Riveau G., 1996, Influence of phospholipid composition on antibody response to liposome encapsulated protein and peptide antigens, Vaccine., 14, 898-904.
19. Vadolas J., Wijburg O. L., Strugnell R. A., 1997., Liposomes as systemic and mucosal delivery vehicles. In Antigen Delivery System: Immunological and Technological Issues, ed.(s) Gander B., Merkle H. P., Gorradin G., PP.73-101. London: Harward Academic Publishers.
20. Campos-Neto A., Porrozzi R., Greeson K., Coler R. N., Webb J. R., Seiky Y. A. W., Reed S. G., Grimaldi G., 2001, Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease, Infec. Immun., 69, 4103-4108.
21. Bradford M. N., 1976, A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding, Analyt. Biochem., 72, 248-254.
22. Kemp M., Theander T. G., Kharazmi A., 1996, The contrasting roles of $CD4^+$ Tcells in intercellular infections in humans: leishmaniasis as an example, Immunol. Today., 17, 13-16.
23. Frezard F., 1999, Liposome: from biophysics to the design of peptide vaccines, Brazil. J. Med. Biolog. Res., 32, 181-189.
24. Kahl L. P., Lelchuk R., Scott C. A., Beesley J., 1990, Characterization of Leishmania major antigen-liposomes that protect BALB/c mice against cutaneous leishmaniasis, Infect. Immun., 58, 3233-3241.
25. Batenjany M. M., Boni L. T., Guo Y., Neville M. E., Bansal S., Robb R. J., Popescu M. C., 2001, The effect of cholesterol in a liposomal Muc1 vaccine, Biochimica et Biophysica Acta., 1514, 280-290.
26. Kirby C., Gregoriadis G., 1984, Dehydretion-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes, Biotechnology., 2, 979-984.
27. Shimizu Y., Yamakami K., Gomi T., Nakata M., Asanuma H., Tadakuma T., Kojima N., 2003, Protection against Leishmania major infection by oligomannose-coated liposomes, Bioorg. Med. Chem., 11, 1191-1195.
28. Mazumdar T., Anam K., Ali N., 2004, A mixed Th_1/Th_2 response elicited by a liposomal formulation of Leishmania vaccine instructs Th_1 responses and resistance to Leishmania donovani in susceptible BALB/c mice, Vaccine., 22, 1162-1171.
29. Kahl L. P., Scott C. A., Lelchuk R., Gregoriadis G., Liew, F. Y., 1989, Vaccination against murine cutaneous leishmaniasis by using Leishmania major antigen/liposomes, J. Immunol., 142, 4441-4449.
30. Russell D. G., Alexander J., 1988, Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes, J. Immunol., 140, 1274-1279.

Archive of SID

www.SID.ir