

## بررسی مصونیت زایی و ایمنی زایی واکسیناسیون با Alum-ALM مخلوط با Mycobacterium vaccae و BCG در لیشمانیوزیس مدل موش

محمود ناطقی رستمی<sup>۱</sup>، دکتر حسین کشاورز<sup>۲</sup>، اکرم میرامین محمدی<sup>۳</sup>، دکتر علی خامسی پور<sup>۴</sup>

۱- کارشناس ارشد انگل شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، ۲- استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، ۳- کارشناس قارچ شناسی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، ۴- دانشیار، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام؛ دانشگاه علوم پزشکی تهران

**زمینه و هدف:** لیشمانیازیس گروهی از بیماری‌های ناشی از تک یاخته جنس لیشمانیا است. به علت دشواری روش‌های کنترل این بیماری، به نظر می‌رسد که یافتن واکسنی مؤثر تنها راه‌برد کنترل این بیماری باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان مصونیت‌زایی واکسن L.major کشته شده به وسیله حرارت و رسوب در آلوم (Alum-ALM) مخلوط با Mycobacterium vaccae به عنوان یاور در موش بود.

**روش اجرا:** غلظت‌های مختلف واکسن Alum-ALM مخلوط با غلظت‌های مختلف M.vaccae یا BCG در سه نوبت به ۱۱ گروه ۱۰ تایی موش ماده Balb/c تزریق شد. روند افزایش ضخامت کف پای موش‌ها بعد از چالش با انگل عفونت‌زای L.major و بار انگل در بافت زنده در گروه‌های مختلف مقایسه شد. آزمون جلدی لیشمانین و میزان سایتوکاین‌ها IFN- $\gamma$  و IL-4 در کشت سلولی و پادتن IgG total و ایزوتوپ‌های IgG1 و IgG2a در سرم، مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در گروه‌هایی که دوز پایین Alum-ALM مخلوط با M.vaccae دریافت کرده بودند افزایش IFN- $\gamma$  و کاهش IL-4 مشاهده شد. در گروه‌هایی که BCG دریافت کرده بودند اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد در آزمون جلدی و اندازه IFN- $\gamma$  وجود داشت و کاهش بار انگل نیز مشاهده شد. در گروهی که دوز بالا Alum-ALM همراه با دوز بالا M.vaccae دریافت کرده بودند، اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد در ضخامت کف پا، میزان IL-4، آزمون جلدی و پادتن IgG1 وجود داشت. در یک موش از این گروه بار انگل، افزایش چشم‌گیری نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس این مطالعه تزریق M.vaccae همراه با دوز پایین Alum-ALM گرچه قادر به ایجاد مصونیت در موش‌های Balb/c نبود، ولی الگوی سایتوکاینی را به نفع پاسخ Th1 تغییر داد. هم‌چنین دوزهای مختلف Alum-ALM مخلوط با BCG سیستم ایمنی را به نفع پاسخ Th1 تغییر داد و در این مورد بین دو یاور BCG و M.vaccae تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. از طرفی، تزریق دوز بالای Alum-ALM همراه با دوز بالای M.vaccae پاسخ سیستم ایمنی را به سمت تحریک نوع Th2 پیش برد.

**واژه‌های کلیدی:** لیشمانیا ماژور، مایکوباکتریوم وکئی، Alum، ALM، واکسیناسیون

فصلنامه بیماری‌های پوست ۱۳۸۴؛ دوره ۸ (۵): ۳۶۳-۳۷۲

دریافت مقاله ۱۵/۹/۸۲ اعلام قبولی: ۱/۱۱/۸۲

## مقدمه

لیشمانیازیس به گروهی از بیماری‌های انگلی ناشی از گونه‌های مختلف جنس *Leishmania* اطلاق می‌شود که اشکال بالینی متعددی دارد (۱). سالانه تقریباً ۲ میلیون مورد جدید از این بیماری بروز می‌کند که بخش عمده آن از نوع جلدی (سالک) است. تقریباً ۹۰ درصد از موارد سالک محدود به ایران و ۵ کشور دیگر جهان است. به علت مشکلات فراوان در کنترل لیشمانیازیس، نظیر انتشار وسیع مخازن (جوندگان) و مشکل مبارزه با آن‌ها، دشواری درمان و بروز موارد عفونت‌های همراه *HIV-Leishmania* این بیماری که جز معضلات بهداشتی است هر روزه بیش از پیش مورد توجه مسوولان امور بهداشتی قرار می‌گیرد. دلایل متعددی، محققان را در تلاش برای یافتن واکسنی مؤثر به عنوان تنها ابزار مبارزه با بیماری تشویق کرده است. مطالعه‌های وسیعی روی لیشمانیازیس تجربی در مدل حیوانی وجود دارد که نشان می‌دهد پاسخ ایمنی از نوع *Th1* همراه با ترشح *IFN-γ* و *IL-2*، با بهبود و مصونیت و پاسخ ایمنی از نوع *Th2* با ترشح *IL-4* و *IL-5*، با پیش‌رفت ضایعه و مرگ صد در صد موش‌های حساس همراه است (۲-۴).

در دو دهه اخیر دانشمندان با همکاری سازمان جهانی بهداشت به منظور دستیابی به واکسنی مؤثر علیه لیشمانیازیس کوشش‌های بسیار و حتی کارآزمایی‌های بالینی متعددی را در مناطق اندمیک آغاز کرده‌اند (۵). در این زمینه ابتدا تک دز واکسن‌های *L.major* کشته شده به وسیله حرارت (*ALM*) مخلوط با *BCG* در ایران مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج چشم‌گیری داشت و سپس کارآزمایی‌های بالینی چند دوز همین واکسن‌ها در ایران و پاکستان و سودان ارزیابی شد که نسبت به تک دز کارآیی افزونی نداشت (۶). به منظور یافتن یاوری جدید، هیدروکسید آلومینیوم (*Alum*) که مدت‌ها در صنعت

واکسن‌سازی استفاده می‌شد با واکسن *ALM* مخلوط شد و تک دوز *Alum-ALM* مخلوط با *BCG* علیه سالک و علیه کالاآزار در میمون ۱۰۰٪ مصونیت ایجاد کرد (۶). فاز I و II واکسن *Alum-ALM* مخلوط با *BCG* در سودان بر روی داوطلبان در دو نوبت تزریق شد و نتایج درخشانی را نشان داده است (۷).

از سوی دیگر، مطالعه‌های مختلف حاکی از خاصیت تحریک سیستم ایمنی وسیله *Mycobacterium vaccae* در درمان بعضی سرطان‌ها و نیز برخی از بیماری‌های عفونی وجود دارد و نشان داده شده است که دوزهای خاصی از *M.vaccae* کشته می‌تواند به طور انتخابی باعث افزایش پاسخ ایمنی از نوع *Th1* یا افزایش سایتوکاین‌های *IFN-γ* و *IL-2* یا موجب تحریک پاسخ *Th2* با افزایش ترشح *IL-4* و *IL-5* شود (۸ و ۹). ایمونوتراپی در آسم مزمن در موش با استفاده از *M.vaccae* کشته باعث مهار ضایعه‌های مجاری ریوی شده است (۱۰). هم‌چنین، *M.vaccae* کشته در پسروریازیس (۱۱)، در سرطان پروستات رات (۱۲) و در برخی موارد دیگر مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی میزان مصونیت زایی و ایمنی‌زایی واکسن *Alum-ALM* مخلوط با *M.vaccae* است.

## روش اجرا

ایمونیزاسیون:

واکسن مرکب از دوزهای مختلف *Alum-ALM* (تولید موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک، ایران) و غلظت‌های مختلف *M.vaccae* (هدیه از سوی دکتر John Stanford به آقای دکتر یحیی دولتی ریاست محترم مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام) و *BCG* (تولید انستیتو پاستور ایران) در سه نوبت به فاصله ۲۱ روز به طور زیر جلدی به ۱۱ گروه ۱۰ تایی موش

کشت سلولی و سنجش سایتوکاین‌ها:

در روز ۳۵ پس از آخرین تزریق از هر گروه ۳-۴ موش کالبد شکافی شد و کشت سلولی غدد لنفاوی و طحال موش‌های Balb/c به علاوه یک موش C57BL/6 با سابقه سالک (شاهد مثبت)، به طور جداگانه در حضور غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن لیشمانیا مازور (تهیه شده به روش ذوب و انجماد) و Con-A (۰/۵ میکروگرم به ازای هر چاهک) و شاهد منفی به صورت سه گانه (triplicate) صورت پذیرفت (۱۴ و ۲۰). پس از ۴۸ ساعت محلول رویی (سوپرناتانت) چاهک‌ها برداشت و تا زمان استفاده برای سنجش سایتوکاین‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور بررسی میزان سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$  و IL-4 روی سوپرناتانت‌ها روش الایزا ساندویچ به کار گرفته شد (۱۴ و ۲۰).

سنجش بار انگل به روش LDA

(Limiting dilution analysis):

مجموعه غدد لنفاوی هر موش به طور جداگانه وزن و سپس هوموژنیزه و در محیط کشت اشنایدر غنی شده کشت داده شد (۱۵). نتایج حاصله با نرم افزار ELIDA مورد تحلیل قرار گرفت و با به کارگیری Single-hit Poisson model و Chi-squared minimization تأیید شد. نتایج نهایی به صورت تعداد انگل در میلی‌گرم بافت زنده گزارش شد (۱۵).

#### یافته‌ها

پس از چالش با انگل زنده، ضخامت کف پا به طور هفتگی با کولیس اندازه‌گیری شد (نمودار شماره ۱). در آنالیز آماری با استفاده از آزمون ANOVA بین گروه ۱ با گروه شاهد (میزان افزایش در گروه ۱ بیش‌تر بوده است) ( $P < 0/05$ ) و گروه‌های ۲ و ۴ ( $P < 0/05$ ) با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. هم‌چنین، میزان

Balb/c ماده ۸ تا ۱۰ هفته‌ای خریداری شده از انستیتو پاستور ایران تزریق شد. به منظور ارزیابی ایمونوژنیسیته واکسن یاد شده در ابتدا، میزان پادتن‌های IgG total و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a مورد بررسی قرار گرفت و سپس هر گروه از موش‌ها به دو دسته تقسیم شد. مطالعه‌های ایمونولوژیک *in vivo* بر یک دسته و مطالعه‌های *in vitro* بر دسته دوم صورت پذیرفت. دسته‌ای که در گروه مطالعه‌های *in vivo* بودند در کف پای چپ، تحت چالش با  $10^6 \times 1$  انگل L.major فاز ایستا قرار گرفتند و روند تغییرات ضخامت کف پا در آن‌ها ثبت شد. سپس واکنش به آزمون جلدی با تزریق  $10^7 \times 1$  انگل کشته شده به کف دست چپ در مقابل شاهد PBS در کف دست دیگر، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳۵ روز پس از چالش میزان بار انگل در غدد لنفاوی این دسته از موش‌ها بررسی شد. در دسته‌ای که مطالعه‌های *in vitro* روی آن‌ها صورت گرفت، میزان سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$  و IL-4 در کشت سلولی غدد لنفاوی و طحال آن‌ها اندازه‌گیری شد. در این مطالعه از لیشمانیا مازور سویه MRHO/75/IR/ER استفاده و میزان پروتئین انگل به روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۱۳). جدول ۱ ترکیبات و غلظت اجزای واکسن را نشان می‌دهد. سنجش پادتن‌ها:

در هفته سوم پس از آخرین تزریق واکسن در هر گروه از ۵ رأس موش خون‌گیری به عمل آمد و پادتن‌های IgG total و زیرگروه‌های IgG1 و IgG2a با روش الیزا (۱۴) بر روی سرم هر گروه اندازه‌گیری شد. میزان افزایش جذب نوری (OD) سرم گروه‌های مختلف آزمون، نسبت به گروه شاهد (از کم‌تر از ۲ برابر به عنوان  $\pm$  تا بیش از ۴/۵ برابر به عنوان  $6+$ ) به عنوان معیار در سنجش پادتن‌ها در نظر گرفته شد.

این پادتن در گروه ۶ مشاهده شد (جدول شماره ۳). از سوی دیگر، بررسی پادتن IgG2a معلوم کرد که در گروه ۸ و ۱۰ که BCG دریافت کرده‌اند میزان پادتن افزایش داشته است (جدول شماره ۳).

نتایج این مطالعه در خصوص سنجش سایتوکاین‌ها نشان می‌دهد که با استفاده از آزمون ANOVA، میان گروه‌های ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ با گروه شاهد از نظر میزان IFN- $\gamma$  اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/001$ ). هم‌چنین، گروه‌های ۵ و ۶ غلظت بالاتری را نسبت به گروه ۷ نشان داده‌اند ( $P < 0/001$ ) (نمودار شماره ۳). در بررسی میزان IL-4، آزمون‌های آماری معلوم کرده‌اند که اختلاف معنی‌داری میان گروه ۱ ( $P < 0/001$ ) و گروه ۷ ( $P < 0/05$ ) با گروه شاهد وجود دارد (نمودار شماره ۳). در ضمن گروه ۵ ( $P < 0/05$ )، ۶ ( $P < 0/001$ ) و ۸ ( $P < 0/05$ ) با گروه ۷ اختلاف معنی‌داری داشته است.

افزایش در گروه ۸ کم‌تر از گروه ۵ بوده است ( $P < 0/05$ ). میزان بار انگل در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، آزمون آماری ANOVA بین گروه‌های آزمون با یک‌دیگر و با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است. اما لازم است توجه شود که در یکی از موش‌های گروه ۱ میزان بار انگل، افزایش قابل توجهی داشته است. هم‌چنین، در موش‌های گروه‌های ۴، ۶ و ۸ کاهش بار انگل، مشاهده شده است.

نتایج آزمون جلدی پیش از چالش نشان داد که میزان ضخامت کف دست در گروه‌های ۴ و ۸ افزایش بارزی داشته است. هم‌چنین گروه‌های ۱ و ۵ نسبت به گروه شاهد، کاهش در آزمون جلدی را نشان داده‌اند (نمودار شماره ۲).

بررسی سیستم ایمنی هومورال در روز ۳۵ پس از آخرین تزریق یادآور، نشان داد که میزان پادتن IgG1 در سه گروه اول دارای افزایش بوده است. در مقابل، کاهش

جدول شماره ۱- غلظت و نوع واکنش‌های تزریق شده به ۱۱ گروه موش Balb/c

گروه	واکسن	Alum-ALM <sup>۱</sup>	M.vaccae <sup>۱</sup>	ALM <sup>۲</sup>	BCG <sup>۳</sup>
۱		بالا	بالا	-	-
۲		بالا	پایین	-	-
۳		بالا	-	-	-
۴		بالا	-	-	دوز منفرد
۵		پایین	بالا	-	-
۶		پایین	پایین	-	-
۷		پایین	-	-	-
۸		پایین	-	-	دوز منفرد
۹		-	پایین	پایین	-
۱۰		-	پایین	بالا	-
۱۱ (کنترل)		-	-	-	-

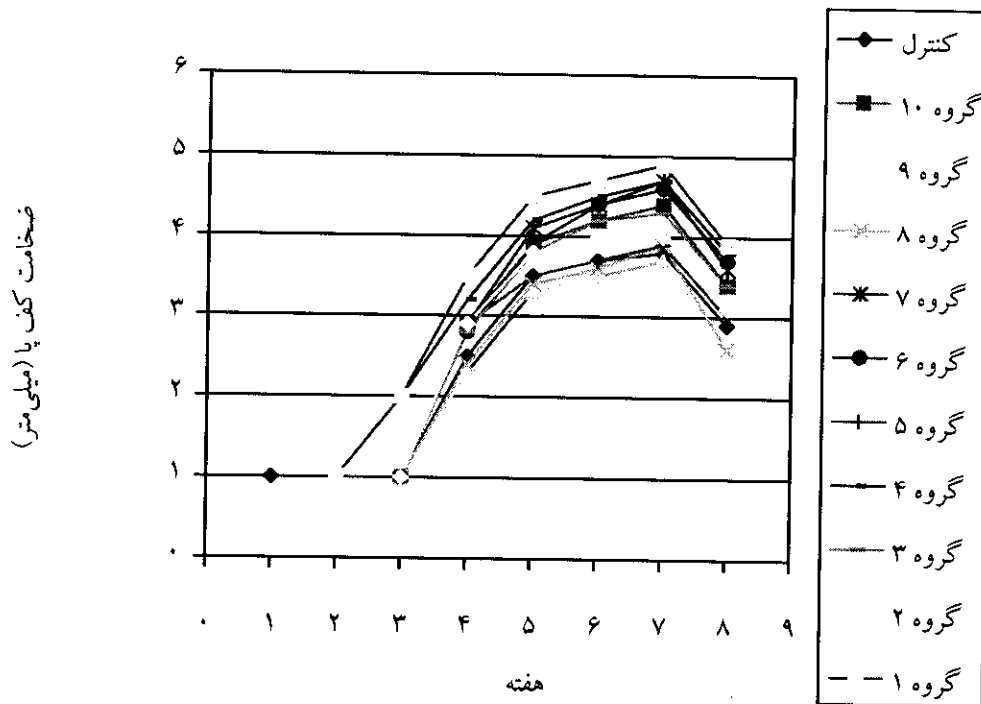
۱- دوز بالای واکسن Alum-ALM برابر ۲۰۰ میکروگرم و دوز پایین این واکسن در هر تزریق برابر ۵۰ میکروگرم بوده است.

۲- دوز بالای واکسن M.Vaccae حاوی  $1 \times 10^7$  میکروارگانیزم و دوز پایین این واکسن در هر تزریق حاوی  $1 \times 10^6$  میکروارگانیزم بوده است.

۳- دوز بالای واکسن ALM حاوی  $1/2 \times 10^8$  میکروارگانیزم و دوز پایین این واکسن در هر تزریق حاوی  $1 \times 10^6$  میکروارگانیزم بوده است.

۴- واکسن BCG به صورت دوز منفرد ۴۰۰ میکروگرمی تزریق شده است.

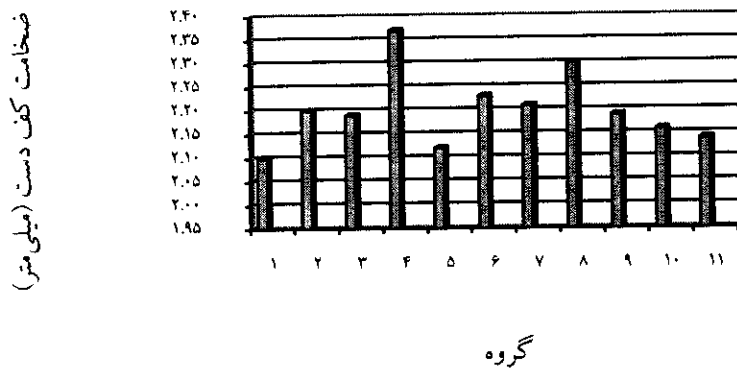
نمودار شماره ۱- روند افزایش ضخامت کف پا در اثر چالش با L.major در موش‌های Balb/c با سه تزریق واکسن



جدول شماره ۲- میزان بار انگل در بافت غدد لنفی با استفاده از روش LDA

تعداد انگل $\pm$ انحراف میانگین در میلی گرم بافت	موش	گروه	تعداد انگل $\pm$ انحراف میانگین در میلی گرم بافت	موش	گروه
$3638/7 \pm 1476 \times 10^2$	موش ۱	۶	$8250 \pm 3134/5 \times 10^2$	موش ۱	۱
$6521 \pm 2499/8 \times 10^2$	موش ۲		$4040 \pm 8061 \times 10^2$	موش ۲	
$807 \pm 485 \times 10^2$	موش ۳		$5250/5 \pm 2249 \times 10^2$	موش ۳	
$6514 \pm 2447 \times 10^2$	موش ۱	۷	$5681/3 \pm 2423 \times 10^2$	موش ۱	۲
$2132 \pm 1006 \times 10^2$	موش ۲		$1217 \pm 505 \times 10^2$	موش ۲	
$5013/8 \pm 1995/6 \times 10^2$	موش ۱	۸	$6401/5 \pm 2543/5 \times 10^2$	موش ۳	
$1009/5 \pm 518 \times 10^2$	موش ۲		$5257/4 \pm 2281 \times 10^2$	موش ۱	۳
$7058/3 \pm 2981/6 \times 10^2$	موش ۱	۹	$6663 \pm 2799/8 \times 10^2$	موش ۲	
$5213/2 \pm 2369 \times 10^2$	موش ۲		$4310 \pm 1866/5 \times 10^2$	موش ۱	۴
$4952 \pm 2067/4 \times 10^2$	موش ۳		$905/5 \pm 433 \times 10^2$	موش ۲	
$6673 \pm 2808/1 \times 10^2$	موش ۱	۱۰	$2900 \pm 1245/9 \times 10^2$	موش ۳	
$3096 \pm 1542 \times 10^2$	موش ۲		$5129/5 \pm 2139/5 \times 10^2$	موش ۱	۵
$7274/5 \pm 3003 \times 10^2$	موش ۱	۱۱	$3442/3 \pm 1541 \times 10^2$	موش ۲	
$3907/9 \pm 1665 \times 10^2$	موش ۲		$4361/5 \pm 1950/4 \times 10^2$	موش ۳	

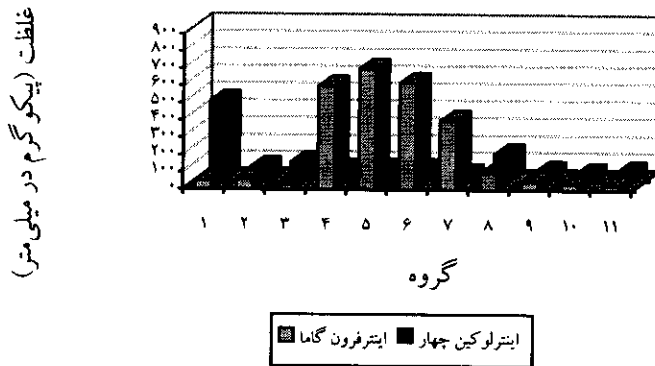
نمودار شماره ۲- متوسط اندازه آزمون جلدی پس از ۲۴ ساعت در موش‌های Balb/c



جدول شماره ۳- درجه افزایش جذب نوری سرم گروه‌های آزمون نسبت به گروه شاهد از نظر پادتن IgG2a و IgG1

گروه	درجه افزایش IgG1	درجه افزایش IgG2a
۱	+۵	+۱
۲	+۵	+۲
۳	+۶	±
۴	+۳	±
۵	+۳	±
۶	±	±
۷	±	±
۸	+۵	+۱
۹	±	±
۱۰	+۲	+۱

نمودار شماره ۳ - مقایسه غلظت IFN- $\gamma$  و IL-4 در سوپرناتانت کشت سلولی غدد لنفی موش های Balb/c



بحث

در دهه های اخیر دانشمندان به منظور دستیابی به واکسنی مؤثر علیه لیشمانیازیس کوشش های بسیاری را آغاز کرده اند. در این مطالعه دوزهای مختلف M.vaccae به عنوان یاور جدید یا BCG همراه با Alum-ALM در مدل موش، مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، اگرچه روند ضخامت کف پا در گروه های دریافت کننده M. vaccae با گروه شاهد اختلافی نداشت، اما در بررسی بار انگل در بافت که در مقایسه با اندازه گیری ضخامت کف پا از شدت عفونت شاخص دقیق تر و مطمئن تری به دست می دهد، در یک مورد از ۳ مورد موش دریافت کننده دوز پایین M.vaccae میزان بار انگل در واحد بافت زنده کم تر از میانگین آن در دو موش دیگر بود و این مشاهده از نظر مهار تکثیر و عفونت زایی انگل حایز اهمیت است. بنابراین، مخلوط M.vaccae با واکسن، هر چند توانسته است از بروز بیماری جلوگیری کند اما در کنترل بار انگل در بافت تأثیر مثبتی نشان داده است.

الگوی سایتوکاینی نشان می دهد که غلظت پایین Alum-ALM مخلوط با M.vaccae، روند واکنش

ایمنی را به سمت Th1 تغییر می دهد؛ به طوری که میزان سایتوکاین IFN- $\gamma$  در گروه هایی که M.vaccae دریافت کرده اند، افزایش معنی داری یافته است ( $P < 0/01$ ). نقش IFN- $\gamma$  در بهبود عفونت ناشی از لیشمانیا در مطالعه های فراوانی نشان داده شده است (۱۶، ۱۷). میزان IFN- $\gamma$  در گروه هایی که M.vaccae دریافت کرده اند بیش از گروه هایی است که BCG گرفته اند ( $P < 0/05$ ). برتری M.vaccae نسبت به BCG در خصوص فعالیت ضد سرطانی آن قبلاً نیز گزارش شده است (۱۸، ۱۹). در این مطالعه ها نشان داده شده است که استفاده از M.vaccae کشته شده می تواند در محدود کردن فعالیت نکروزه سلول های سرطانی در مقایسه با BCG نقش مؤثری داشته باشد. از سوی دیگر، کاهش سایتوکاین IL-4 در تزریق دوز بالا M.vaccae ( $P < 0/05$ ) و دوز پایین M.vaccae ( $P < 0/05$ ) هم نشان از مهار پاسخ Th2 دارد. در تحقیق های انجام شده روی ایمونوتراپی با M.vaccae در انسان، کاهش تعداد سلول های تولید کننده IL-4 به عنوان شاخص پاسخ به درمان شمرده می شود (۲۰).

بررسی حاضر نشان می دهد که تزریق BCG همراه با دوزهای مختلف Alum-ALM سیستم ایمونولوژیک را

ضعیف، می‌شود (۱۴).

از طرفی ضخامت کف پا ناشی از چالش در گروهی که دوز بالای Alum-ALM همراه با دوز بالای *M.vaccae* دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد که دال بر پاسخ سیستم ایمنی از نوع Th2 است. این پدیده در بررسی بار انگل در غدد لنفاوی نیز مشاهده شد. اگرچه آزمون‌های آماری اختلاف معنی‌داری را میان گروه‌ها از نظر متوسط بار انگل نشان نداد، اما در بین سه موش بررسی شده در این گروه در یک موش، میزان بار انگل در واحد بافت زنده چندین برابر میانگین بار انگل دو موش دیگر بود؛ که این مسایل از نظر تأثیر تزریق ترکیب یادشده در مهار پاسخ ایمنی سلولی و افزایش امکان تکثیر انگل در بافت، حایز اهمیت است. این اثر تقویت‌کننده ایمنی Th2 سبب کاهش در میانگین اندازه آزمون جلدی در این گروه شده است. بررسی سیستم ایمنی از نظر سایتوکاین‌های II-4 و IFN- $\gamma$  نشان داد که در این گروه میزان سایتوکاین IFN- $\gamma$ ، با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری نبوده است. حال آن‌که سایتوکاین IL-4 افزایش داشته است ( $P < 0.05$ ). این مشاهده تایید دیگری است بر این که تزریق دوز بالا Alum-ALM مخلوط با دوز بالا *M.vaccae* باعث تحریک ایمنی هومورال می‌شود. بحرانی بودن دوز تزریق در *M.vaccae* در مطالعه‌های دیگری نیز نشان داده شده است. در ارزیابی واکنشی متشکل از ALM همراه با *M.vaccae*، گزارش شده است که تزریق دز بالای این باکتری همراه با ALM سیستم ایمنی موش را به سمت Th2 سوق می‌دهد (۲۴).

در مجموع، از این مطالعه چنین به نظر می‌رسد که تزریق Alum-ALM با دوز پایین همراه با یاور BCG یا *M.vaccae* قادر است سیستم ایمنی را به سمت پاسخ Th1 پیش ببرد. به نظر می‌رسد بین این دو یاور از جنبه تأثیر

به سمت تحریک ایمنی سلولی و تضعیف ایمنی ناشی از Th2 پیش می‌برد. در آنالیز آماری نتایج حاصل از بررسی روند افزایش ضخامت کف پا معلوم کرد که BCG در مقایسه با *M.vaccae* تأثیر بیش‌تری در مهار افزایش ضخامت کف پا دارد. اگرچه هیچ کدام از این دو یاور با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداده‌اند. مطابق این بررسی، در گروه‌هایی که BCG را همراه با دوز بالا یا پایین Alum-ALM دریافت کرده‌اند اندازه ضخامت کف پا کم‌تر از گروه‌های همسانی بوده است که *M.vaccae* را گرفته‌اند ( $P < 0.05$ ). این تأثیر BCG در بررسی بار انگل نیز مشاهده می‌شود؛ به طوری که در هر دو گروه دریافت‌کننده BCG یک موش در واحد بافت میزان بار انگل کم‌تری را نسبت به متوسط بار انگل گروه خود نشان داد. بالاتر بودن اندازه ضخامت کف دست در آزمون جلدی در گروه‌های دریسافت‌کننده BCG، حاکی از تحریک قبلی سیستم ایمنی سلولی با انگل و واکنش سیستم ایمنی به آنتی‌ژن انگل در آزمون جلدی است. بررسی ایمونولوژیک روی سایتوکاین‌ها نشان داد که میزان IFN- $\gamma$  در گروه‌های دریافت‌کننده BCG، افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ) و IL-4 نیز کاهش معنی‌داری را نشان داده است ( $P < 0.05$ ). از طرفی بررسی پادتن‌ها نیز کاهش در میزان IgG1 را در گروه ۴ و نیز افزایش میزان IgG2a را در گروه ۸ نشان داد. این مشاهده‌ها تأثیر BCG را بر گرایش سیستم ایمنی به سمت Th1 نشان می‌دهد. به منظور تحریک واکنش ایمنی به سمت Th1 در مطالعه‌های بسیاری از BCG به عنوان یاور استفاده شده است (۲۱). از جمله در چندین کارآزمایی از BCG همراه با لیشمانیای کشته شده علیه سالک روستایی و شهری در مناطق اندمیک ایران استفاده شده است (۲۳ و ۲۲). بررسی‌ها نشان داده است که واکسیناسیون با مخلوط لیشمانیای کشته شده و BCG، موجب تحریک پاسخ ایمنی، هر چند



روی سیستم ایمنی تفاوتی وجود نداشته باشد.

رئیس محترم مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام به خاطر همکاری مؤثر در اجرای این تحقیق تشکر کنند.

بودجه انجام این طرح پژوهشی توسط مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران تأمین شده است

### تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دکتر John L. Stanford از دانشگاه میدلسکس لندن، دکتر Ricahard G. Titus از دانشگاه ایالت کلرادو ایالات متحده، دکتر Carl Taswell از ایالات متحده و دکتر یحیی دولتی

### References

- 1-Garcia LS, Old world leishmaniasis: Cutaneous leishmaniasis. In: Diagnostic medical parasitology. ASM Press: USA; 2001: 206.
- 2-Scott P, Pearce E, Cheever AW, et al. Role of cytokines and CD4+T cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. Immunol Rev 1989; 112: 161-82.
- 3-Scott P, Natovitz P, Coffman RL, et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. Tcell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T-helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J Exp Med 1988; 168: 1675-84.
- 4-Miller I, Pedrazzini TH, Louis JA. Experimentally induced cutaneous leishmaniasis are L3T4+Tcells that promote parasite growth distinct from those mediating resistance. Immunol Lett 1988; 19: 251-60.
- 5-Modabber F. First generation leishmaniasis vaccine clinical development: moving but what next? Curr Opin Anti Infect Invest Drug 2000; 2: 35-39.
- 6-Misra A, Dube A, Svivastava B, et al. Successful vaccination against Leishmania donovani infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved Leishmania major with BCG. Vaccine 2001; 19: 3485-92.
- 7-Khalil EAG. World's leish 2. 20-24 May 2001; Crete. Greece.
- 8-Assersohn L, Souberbielle BE, O'Brien ME, et al. A randomized pilot study of SRL 172 in patients with small cell lung cancer (SCLC) treated with chemotherapy. Clin Oncol 2002; 14: 23-27.
- 9-O'Brien ME, Saini A, Smith IE, et al. A randomized phase II study of SRL 172 combined with chemotherapy in patients with advanced inoperable non-small-cell lung cancer and mesothelioma. Br J Cancer 2000; 83: 853-57.
- 10-Ozdemir C, Akkoc T, Bahceciler NN, et al. Impact of M.vaccae immunization on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. Clin Exp Allergy 2003; 33: 266-70.
- 11-Balagon MV, Walsh DS, Tan PL, et al. Improvement in psoriasis after intradermal administration of heat-killed M.vaccae. Int J Dermatol 2000; 39: 51-58.
- 12-Hrouda D, Souberbielle BE, Kayaga J, et al. Mycobacterium vaccae (SRL172) a potential immunological adjuvant evaluated in rat prostate cancer. B J Urol 1998; 82: 870-76.

- 13-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- 14-Lagranderie MR, Balazuc AM, Deriaud E et al. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *M. bovis* BCG vaccine strains. *Infect Immun* 1996; 64: 1-9.
- 15-Taswell C. Methods and selected applications In: Pretlow TG, Pretlow TP (eds). *Cell separation*. Academic press, USA: 109-45.
- 16-Sacks DL, Louis JA, Lowis J, et al. Leishmaniasis In: Kenneths W (ed). *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1993; 12: 237-68.
- 17-Titus RG, Kelso A, Louis JA. Intracellular destruction of *Leishmania tropica* by macrophages activated with macrophage activating factor inteferon. *Clin Exp Immunol* 1984; 55: 157-65.
- 18-Pozniak A, Stanford JL, Grange JM. *M. Vaccae* immunotherapy *Lancet* 1991; 338: 1533-4.
- 19-Grange JM, Stanford JL, Rook GA. Tuberculosis and cancer: parallels in host responses and therapeutic approaches. *Lancet* 1995; 245: 1350-52.
- 20-Tian XX, Li A, Zhou W, et al. Isolation and biological activities of and antineoplastic protein polysaccharide complex (PS4A) obtained from *M.vaccae*. *Anticancer Res* 1999; 19: 237-43.
- 21-Convit J, Castellanos PL, Rondon A, et al. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1987; 21: 401-04.
- 22-Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, et al. A randomized double-blind controlled trial of a killed *L.major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 1999; 17: 466-72.
- 23-Sharifi I, Fekri AR, Aflantonian MR, et al. Randomized vaccine trial of single dose of killed *L.major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 1998; 351: 1540-3.
- ۲۴-خوشابه عبدالله کندی، ل. بررسی میزان مصونیت زایی لیشمانیای کشته شده همراه با مایکوباکتریوم و کتی در مقابل عفونت با لیشمانیا ماژور در مدل موشی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۹.