Archive of SID

بررسی میزان مصونیت زایی و پاسخ ایمنی نسبت به لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده محصور در لیپوزوم های دارای بار مثبت در مدل موشی

یحیی سهرابی[۱]، دکتر محمودرضا جعفری[۲]، دکتر علی بدیعی[۳]، دکتر سیدحسین حجازی[۴]، سیدابراهیم اسکندری[۵]، اکرم میرامین محمدی[۵]، دکتر علی خامسی پور[۶]

۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی، باشگاه پژوهش گران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی قم، ۲- دانشیار، ۳- دکترای تخصصی فارماسوتیکس، گروه فارماسوتیکس، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم دارویی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۴- دانشیار انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۵- کارشناس ارشد آزمایشگاه، ۶- دانشیار میکروبیولوژی و ایمونولوژی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران

زمینه و هدف : میزان اثربخشی واکسن ها به نوع یاور ایمونولوژیکی مورد استفاده بستگی دارد. یکی از مشکل های عمده ی کارایی ناکافی واکسن های لیشمانیوز، فقدان یاور ایمونولوژیک مناسب است. در این مطالعه لیشمانیا ماژور کشته شده با حرارت (ALM) در لیپوزوم های دارای بار مثبت محصور شده و پاسخ های ایمنی در مدل موشی نسبت به این فرمولاسیون و امکان القای پاسخ اختصاصی Th1 بررسی شده است.

روش اجرا : لیپوزوم های حاوی ALM به وسیله روش دهیدراسیون و هیدراسیون مجدد تهیه شد. موش های Balb/c در سه نوبت به فاصله سه هفته با فرمولاسیون لیپوزومی حاوی آنتی ژن یا گروه های شاهد به صورت زیرجلدی تزریق شدند. پاسخ های ایمنی با آزمون پوستی و تعیین تیتر آنتی بادی ضد لیشمانیا بررسی شد. میزان مصونیت با بررسی روند پیش رفت ضایعه در حیوانات عفونی شده مطالعه شد.

یافته ها : نتایج چالش با انگل زنده، نشان داد که قطر زخم کف پای موش های ایمونیزه شده با فرمولاسیون لیپوزومی دارای بار مثبت به صورت معنی داری ($P<۰/۰۵$) از گروه های شاهد کم تر بود. هم چنین تیتر IgG2a در این گروه به صورت معنی داری ($P<۰/۰۰۱$) از گروه های شاهد بالاتر بود. نتایج آزمون پوستی گروه های دریافت کننده فرمولاسیون لیپوزومی حاوی آنتی ژن به صورت معنی داری ($P<۰/۰۰۱$) ازگروه های شاهد بالاتر بود.

نتیجه گیری : کوچک تر بودن ضایعه در گروه واکسینه، بالاتر بودن تیتر ضد لیشمانیا IgG2a و نتایج آزمون پوستی نشان داد که لیپوزوم های دارای بار مثبت با توانایی قوی تر نسبت به لیپوزوم های بدون بار، سیستم ایمنی سلولی را تحریک می کند و می تواند برای آنتی ژن های لیشمانیا به منظور تحریک پاسخ Th1 یک یاور ایمونولوژیک مناسب باشد.

واژه های کلیدی : واکسن لیشمانیا، لیشمانیا ماژور، ALM ، لیپوزوم

وصول مقاله : ۸۴/۱۱/۲۱ پذیرش: ۸۵/۱۰/۷ فصلنامه بیماری های پوست بهار ۱۳۸۶؛ دوره ۱۰(۱): ۳۷-۵۳

مؤلف مسوول : دکترعلی خامسی پور – تهران، خیابان آیت ا... طالقانی غربی، شماره ۷۹، مرکز آموزش وپژوهش بیماری های پوست و جذام

پست الکترونیک : khamesipour_ali@ yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیشمانیازیس به وسیله انگل های جنس لیشمانیا ایجاد می شود. این بیماری مشکل بهداشتی ۸۸ کشور جهان است و به دلیل اهمیت کنترل و جلوگیری از گسترش آن جزو اولویت های مهم مجامع بین المللی از جمله سازمان جهانی بهداشت قرار گرفته است. لیشمانیا انگل اجباری سلول های فاگوسیت کننده تک هسته ای مانند سلول های فاگوسیت، نوتروفیل و سلول های دندرتیک است و وسیله پشه خاکی های جنس phlebotomus منتقل می شود(۲-۱).

این بیماری دارای تظاهرهای بالینی مختلف از زخم ساده سالک خود بهبود یابنده تا شکل احشایی کشنده است(۲). لیشمانیا ماژور، عامل سالک نوع روستایی است و به طور گسترده در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیای قدیم شایع است(۳و۲). عامل ایجاد مصونیت علیه انگل های داخل سلولی مانند تریپانوما پالیدوم، مایکو باکتریوم لپره، لیشمانیا و ... پاسخ ایمنی سلولی شامل واکنش افزایش حساسیت تأخیری و پاسخ لنفوسیت های T سیتوتوکسیک است(۳و۱). مصونیت در مدت کمی پس از ایجاد ضایعه به وجود می آید و تا سال ها پس از بهبودی باقی می ماند(۲و۱).

عفونت با لیشمانیا ماژور در مدل موشی مقاوم، با فعال شدن سلول های CD4 نوع Th1 و ترشح انترفرون گاما و IL-12 همراه است که بهبودی و مصونیت در برابر عفونت را موجب می شود در صورتی که در موش های حساس Balb/c با فعالیت رده سلولیTh2وترشح IL-5 ، IL-4 و IL-10 درارتباط است وبه مرگ تمامی موش ها می انجامد (۵و۴). ناکار آمد بودن روش های کنترل مخازن و ناقل، هزینه های درمانی، عوارض ناشی از درمان به کمک ترکیب های آنتی موان ، طولانی بودن دوره درمان و پاسخ نگرفتن از درمان های موجود، یافتن واکسنی مؤثر علیه لیشمانیوز را ایجاب می کند. دست یابی به واکسنی مؤثر به دلایل متعدد از جمله مصونیت مادام العمر بعد از بهبودی زخم سالک و کاربرد لیشمانیزاسیون به منظور پیش گیری از سالک میسر است(۸-۶).

در زمینه تولید واکسن های مختلف علیه لیشمانیوز در نقاط گوناگون جهان مطالعه های فراوانی صورت گرفته است و از انگل زنده (لیشمانیزاسیون)، انگل زنده ضعیف شده (۸)، واکسن های نسل اول انگل کشته شده (۱۱-۹و۷) و واکسن های نوترکیب(۱۷-۱۴) و واکسن های ژنتیکی(۱۸) استفاده شده است ولی هنوز واکسنی علیه هیچ یک از انواع لیشمانیوز انسانی وجود ندارد. علت اصلی کارآیی ناکافی واکسن های لیشمانیوز نبود یاور ایمنولوژیک مناسب است(۷و۶).

از لیشمانیا ماژور کشته شده با حرارت (ALM) به عنوان واکسن تجربی علیه شکل های مختلف لیشمانیازیس در ایران و سودان استفاده شده است(۸و۶). تولید انبوه این آنتی ژن در انستیتو واکسن و سرم سازی رازی ایران زیر نظر سازمان جهانی بهداشت WHO/TDR صورت پذیرفت (۲۱و۲۰) و در ایران، پاکستان و سودان مورد کارآزمایی قرا رگرفت(۸و۶). مطالعه های مختلف نشان می دهد که ALM به تنهایی نمی تواند علیه لیشمانیوز پاسخ ایمنی حفاظت بخش ایجاد کند و باید همراه با ایمونوادجوانت های مؤثر تزریق شود(۷و۶). این آنتی ژن، همراه BCG و Alum مورد کارآزمایی قرار گرفته و نتایج نشان داده است که ایمونیزاسیون همراه با این ترکیب ها می تواند پاسخ سلولی Th1 القا و ترشح IL12 و IFN-γ را تحریک کند(۸و۶) ولی این پاسخ برای ایجاد مصونیت کافی نیست. با وجود تلاش های به عمل آمده به دلیل فقدان ایمونو ادجوانت مناسب، واکسن مؤثری علیه لیشمانیازیس طراحی نشده است(۷و۶). با توجه به این که تعداد کمی از ایمونو ادجوانت ها در انسان قابل استفاده هستند و متأسفانه بسیاری از آن ها می توانند ایمنی هومورال را به خوبی تحریک کند و توانایی القا ایمنی سلولی را ندارند. خاصیت ایمونولوژیکی و پروفیلاکتیک ایمونو ادجوانت ها و حامل های مختلف مانند سایتوکاین ها،

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئوزوم ها، BCG ، Alum ، لیپوزوم و... برای استفاده در انسان در مدل های موشی کارآزمایی شده است که همه آن ها توانسته اند سیستم ایمنی را به صورت نسبی تحریک کنند. لیپوزوم ها وزیکول های میکروسکوپی هستند که از دو لایه فسفولیپیدی تشکیل می شوند و حاوی فازهای آبی هستند. داروها (هم محلول در آب و هم محلول در چربی) را می توان در لیپوزوم ها داخل کرده و کارآیی و اختصاصی بودن آن را افزایش داد. علاوه بر این لیپوزوم ها ایمونو ادجوانت های مؤثر برای آنتی ژن های پروتئینی هستند (۲۳و۲۲). این وزیکول ها برای طیف های مختلفی از آنتی ژن ها قادر به تحریک هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی هستند (۲۵و۲۴). یکی از مهم ترین ویژگی های لیپوزوم ها به عنوان ایمونو ادجوانت، توانایی آن ها درتحریک سیستم ایمنی سلولی به صورت اختصاصی است(۲۳). این هدف به وسیله روش های مختلف مانند انتخاب فسفولیپید مناسب (۲۸-۲۶)، انتخاب بارالکتریکی مناسب روی سطح لیپوزوم ها(۲۹)، پوشش دادن لیپوزوم ها با ترکیب های قندی حاوی اولیگومانوز نظیر مانان (۳۰) و تهیه لیپوزوم ها طوری که آنتی ژن در سطح لیپوزوم ها یادر قسمت دولایه لیپوزوم ها (به جای این که در فاز آبی داخلی لیپوزوم ها قرار گیرد) قابل دست یابی است(۳۱). علاوه بر این لیپوزوم ها به عنوان ادجوانت، مورد تأیید اداره دارو و غذای امریکا است. در مطالعه های کلینیکی کاملاً بی خطر و توسط افراد داوطلب به خوبی تحمل شده است(۳۲). مطالعه های مختلف نشان می دهد که خاصیت ایمونو ادجوانتی لیپوزوم ها با ترکیب فسفولیپید دیواره و درجه حرارت عبور فاز (Phase Transition temperature- Tm) رابطه مستقیم دارد(۳۲). درجه حرارت عبور فاز، درجه حرارتی است که در آن لیپوزوم ها از حالت کریستال مایع که در آن فسفولیپیدها نسبتاً نامنظم قرار می گیرند به حالت جامد شبه ژل (Solid like gel) تبدیل می شوند که به صورت کاملاً منظم در کنار هم قرار می گیرند.

طبیعت، نوع و میزان بار روی سطح غشا لیپوزوم از جمله پارامترهای مهم و تعیین کننده مکانیسم و شدت بر هم کنش غشاء سلولی و لیپوزوم است. لیپوزوم های خنثی در داخل بدن پایداری بیش تری دارند و علاوه بر این لیپوزوم های خنثی نمی توانند واکنش قابل توجهی با غشاء سلول داشته باشند و در اکثر موارد دارو در خارج از سلول آزاد و وارد سلول می شود(۳۲). از طرف دیگر بار الکترواستاتیکی بالا می تواند باعث افزایش واکنش لیپوزوم سلول روی غشاء شود(۳۲). لیپوزوم های دارای بار منفی عمدتاً وسیله مکانیسم اندوسیتوز جذب می شوند. در مقابل لیپوزوم های دارای بار مثبت عمدتاً وسیله مکانیسم فیوژن و در بعضی موارد از طریق برهم کنش الکتروستاتیک با غشاء سلولی واکنش می دهند(۳۲). تحقیق های مختلف نشان داده است که استفاده از بار مثبت روی سطح لیپوزوم ها نسبت به لیپوزوم های خنثی و دارای بار منفی می تواند ایمنی سلولی را به طور قابل توجهی تحریک کند(۳۲). لیپوزوم های با بار مثبت با DNA ی با بار منفی متصل و به انواع سلول ها منتقل می شوند(۳۲و۲۹). هم چنین لیپوزوم های باردار کاتیونی به عنوان یک حامل مناسب در DNA برای واکسیناسیون به کار می روند(۳۲و۲۹). در این مطالعه برای القا ایمنی سلولی در موش های Balb/c لیپوزوم ها با بار مثبت حاوی آنتی ژن ALM مورد استفاده قرار گرفت.

روش اجرا

آنتی ژن: لیشمانیا ماژور کشته شده با حرارت (ALM) در انستیتو واکسن و سرم سازی رازی ایران زیر نظر سازمان جهانی بهداشت WHO/TDR و وزارت بهداشت به صورت انبوه تولید شده است(۲۰و۱۲).

حیوان : موش های Balb/c ماده ۸-۶ هفته ای که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی -

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری شده اند.

انگل : انگل L.major سویه MRHO/IR/75/ER با پاساژ در موش Balb/c نگهداری شد. آماستیگوت های گرفته شده از ترشح های زخم موش ها ابتدا در محیط NNN کشت داده شد و سپس به محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین G و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین منتقل و در دمای ۲۵۰۱ درجه تکثیر شدند(۳۳).

مواد : محلول TMB (3,3', 5,5'-Tetramethyl benzidine)، استاندارد وزن مولکولی Tween 20 و پروتئینی با دامنه پایین از سیگما (امریکا) خریداری شدند. گلایسین، نیترات نقره، کلسترول، کلروفرم، متانول، اسید استیک و تریس محصول مرک آلمان بود. BSA (Bovine Serum Albumin)، PC از Fluka سوییس خریداری شد. کیت ایزوتایپینگ IgG موشی محصول شرکت Zymed (امریکا) بود. بقیه مواد از نوع تجزیه ای (analytical grade) بود.

پادتن های IgG total، IgG1، IgG2a کونژوگه با پراکسیداز بود. پادتن IgG total پیش از مصرف برابر دستورالعمل کارخانه سازنده به مقدار یک حجم در ۴۰ هزار حجم محلول PBS-Tween رقیق شد. سایر پادتن های زیر گروه IgG به اندازه یک در هزار با محلول یادشده رقیق شد.

تهیه لیپوزوم به روش دهیدراسیون – رهیدراسیون (DRV)

لیپوزوم هایی به وسیله روش دهیدراسیون – رهیدراسیون (Dehydration rehydration vesicle, DRV) حاوی Phosphatidyl cholin (PC) و کلسترول و DDAB (Dimethyldioctadecyle ammonium bromide) که دارای بار مثبت است به نسبت ۷:۲:۱ ساخته شد. در این روش به کمک یک بالن ته گرد مقادیر مورد نیاز از فسفولیپید و کلسترول به کمک حلال آلی حل شد. سپس در دستگاه خلاء چرخان حلال آلی تبخیر شد تا روی جداره بالن فیلم لیپیدی نازکی به وجود آید، به فیلم لیپیدی حاصله در دمای بالاتر از Tm مقادیر مناسبی از آب مقطر استریل اضافه شد و پس از ورتکس، لیپوزوم های MLV اولیه خالی تشکیل شد. لیپوزوم های MLV حاصله به وسیله سونیکاتور حمام به لیپوزوم های SUV تبدیل شد. سپس مقدار معینی ALM– به SUVهای خالی حاصل، افزوده و مخلوط وسیله گاز نیتروژن به سرعت منجمد شد. بعد از انجماد، بالن به دستگاه Freeze-Drier متصل و پس از خشک شدن مخلوط در Freeze-Drier فرآورده با یک دهم حجم کل SUVهای اولیه به کمک آب مقطر استریل هیدراته شد. عمل هیدراسیون مجدد به کمک ورتکس کردن ملایم صورت گرفت و سپس مخلوط به مدت نیم ساعت در درجه حرارت بالاتر از Tm قرار داده شد. در نهایت لیپوزوم های حاصل که معمولاً LUV و با لیپوزوم های چند لایه ای کوچک بودند با بافر PBS به حجم اولیه رسانده شدند.

جداسازی آنتی ژن های محصور نشده از لیپوزوم

برای جداسازی آنتی ژن های انکپسوله نشده از لیپوزوم های فرموله شده، نمونه ها سه مرتبه هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به کمک دستگاه میکروسانتریفوژ با دور g× ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی جدا شد.

محاسبه درصد محصور سازی

محاسبه درصد محصورسازی به روش غیرمستقیم صورت گرفت. در این روش مقدار آنتی ژن محصور نشده در محلول رویی لیپوزوم ها اندازه گیری می شود. برای تعیین مقدار پروتئین محصور شده در انواع لیپوزوم ها، از روش اندازه گیری پروتئین به روش Lowry با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد، استفاده شد. به این ترتیب که پس از جداسازی آنتی ژن محصور نشده در لیپوزوم ها به وسیله سانتریفوژ، مقدار کل آنتی ژن ALM موجود در مایع شفاف رویی به وسیله

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه گیری پروتئین تعیین شد و از مقدار کل آنتی ژن استفاده شده برای تهیه لیپوزوم ها کسر و درصد محصورسازی از فرمول ذیل تعیین شد. پس از جداسازی آنتی ژن ALM محصور نشده در لیپوزوم ها و محاسبه درصد محصور سازی، رسوب های لیپوزومی در PBS دو باره طوری سوسپانسیون شدند که غلظت آنتی ژن ALM در تمام فرمولاسیون ها به صورت ۱۸۰µl/۱۰۰µl شود. برای تزریق از لیپوزوم های تازه تهیه شده استفاده شد.

درصد محصورسازی = (ALM آزاد موجود در محلول شفاف رویی پس از اولتراسانتریفوژ – کل ALM استفاده شده در تهیه لیپوزوم) × ۱۰۰ / کل ALM استفاده شده در تهیه لیپوزوم

آنالیز سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمیدژل الکتروفورز (SDS-PAGE) نمونه های پروتئینی و لیپوزوم ها ی حاوی آنتی ژن

آنالیز SDS-PAGE نمونه های پروتئینی و لیپوزوم های حاوی ALM (پس از جداسازی ALM محصور نشده با اولترا سانتریفوژ و سوسپانسیون کردن رسوب لیپوزومی در PBS) در ژل حاوی ۳٪ اکریل آمید به عنوان ژل متراکم کننده و ۱۰٪ آکریل آمید به عنوان ژل جداکننده صورت گرفت(۳۴). بافر الکتروفورز حاوی ۲۵ میلی مول تریس، ۱۹۲ میلی مول گلایسین و ۰/۱٪ SDS با pH ۸/۳ بود. پس از اتمام الکتروفورز برای ردیابی پروتئین ژل ها با نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

واکسیناسیون موش های Balb/c

پس از محاسبه درصد محصورسازی ALM در لیپوزوم، غلظت آنتی ژن به صورتی تنظیم شد که در هر تزریق، میزان ۱۸۰ میکروگرم آنتی ژن ALM در فرآورده های لیپوزومی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر از مایع تزریق شود. موش ها در ۵ گروه ده تایی تقسیم و ۳ مرتبه با فاصله های ۳ هفته ای به کمک فرآورده های لیپوزومی DRV-PC/Chol-DDAB-ALM و DRV-PC/ChoL-ALM به روش زیر جلدی (Subcutaneous, SC) واکسینه شدند و در ضمن گروه های شاهد تنها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر (SC) لیپوزوم فاقد آنتی ژن (Empty liposome) و PBS و ALM دریافت کردند.

بررسی آزمون ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH)

سه هفته پس از آخرین تزریق واکسن، تعداد ۱×۱۰^{۷} انگل کشته شده به وسیله ذوب و انجماد لیشمانیا ماژور در حجم ۵۰ میکرولیتر مایع تزریقی به کف پای چپ هر موش و هم زمان مقدار ۵۰ میکرولیتر PBS به کف پای راست به صورت زیرجلدی (SC) تزریق شد. ضخامت کف هر دو پای موش ها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت با کولیس دیجیتالی (Mitutoyo) اندازه گیری شد و اختلاف اندازه در ضخامت کف پای راست و چپ به میلی متربیان ودرصدافزایش ضخامت کف پای موش ها با فرمول زیرمحاسبه و از نظرآماری مورد بررسی قرار گرفت.

درصد افزایش ضخامت در کف پا = (ضخامت کف پای کنترل – ضخامت کف پای مبتلا شده) × ۱۰۰ / ضخامت کف پای کنترل

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون چالش

چهار هفته بعد از آخرین تزریق و یک هفته پس از تست DTH، موش های Balb/c واکسینه شده، با مقدار ۵۰میکرو لیتر حاوی ۱×۱۰^{۶} از پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) برداشت شده در فاز ایستا، در کف پای چپ به صورت SC، تحت چالش قرار گرفتند. به کف پای راست هم پنجاه میکرولیتر PBS به صورت SC به عنوان کنترل تزریق شد. موش ها به طور هفتگی تحت معاینه قرار گرفتند و میزان ورم و التهاب حاصله در کف پای موش ها به وسیله کولیس به مدت ۱۰ هفته اندازه گیری شد. اختلاف اندازه در ضخامت کف پای راست و چپ به میلی متر بیان شد و نهایتاً این اندازه با استفاده از فرمول ذکر شده در قسمت DTH به صورت درصد افزایش ضخامت در کف پا ارایه شد.

اندازه گیری تیتر IgG، IgG_1، IgG_{2a}

قبل از هر تزریق و سه هفته بعد از آخرین تزریق خون گیری به عمل آمد و پس از جداکردن، سرم هر گروه به طور جداگانه درون ویال های اپندورف ریخته و تا زمان اندازه گیری پادتن ها در ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. تیتر آنتی بادی ضد لیشمانیا(IgG Total, IgG2a, IgG1) در نمونه های خونی به وسیله تکنیک ELISA تعیین شد. در این روش ابتدا چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای با آنتی ژن به دست آمده از انگل منجمد و ذوب شده سویه اشاره شده به ازای $۱۰^{۵}$-$۱۰^{۶}$ انگل در هر چاهک پوشش داده شد. پلیت ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از شست و شو با بافر PBS چاهک های حاوی آنتی ژن با بافر مسدودکننده پوشیده و در دمای ۳۷ به مدت یک ساعت انکوبه شد. چاهک ها با رقت های مناسب محلول حاوی سرم به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس آنتی بادی های باند نشده جدا و شسته شد. در نهایت چاهک ها با ۵۰ میکرولیتر آنتی بادی کونژوکه با HRP تهیه و در PBS-Tween20 پوشیده و در ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس پس از شست و شو ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا (TMB) به هر چاهک افزوده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. پس از این مرحله وبا افزودن ۲۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (اسیدسولفوریک یک مولار) واکنش تغییر رنگ متوقف شد و پلیت ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شدند.

ارزیابی آماری

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

یافته ها

خصوصیت های لیپوزوم ها

لیپوزوم ها در زیر میکروسکوپ، دارای اندازه های مختلفی بین ۰/۵ تا ۳ میکرومتر و اندازه متوسط ۱/۶ میکرومتر بود (تصویر شماره ۱). هم چنین به کمک تکنیک برادفورد میزان محصورسازی آنتی ژن ALM ۴۳.۵ درصد تعیین شد.

نتایج آنالیز SDS-PAGE

تصویر شماره ۲ نتایج آنالیز SDS-PAGE لیپوزوم های DRV-PC/Chol-ALM و DRV-PC/Chol-DDAB-ALM بعد از سانتریفوژ و جداکردن ALM اضافی و پخش کردن لیپوزوم ها در PBS را نشان می دهد. همان طور که در این شکل مشخص است آنتی ژن ALM در داخل لیپوزوم ها محصور شده است. هم چنین در آنالیز SDS-PAGE باند ALM مشاهده شد که این ماده دارای طیف وسیعی از آنتی ژن ها با وزن های مولکولی متفاوت است.

www.SID.ir

Archive of SID

تصویر شماره ۱- شکل میکروسکوپی لیپوزوم های حاوی ALM(بزرگ نمایی × ٤٠)

تصویر شماره ۲- آنالیز SDS-PAGE لیپوزوم های حاوی ALM (ژل متراکم کننده ۳٪ و ژل جداکننده ۱۲٪، رنگ آمیزی با نیترات نقره)

۱-استاندارد وزن مولکولی پروتئینی با دامنه کم سیگما

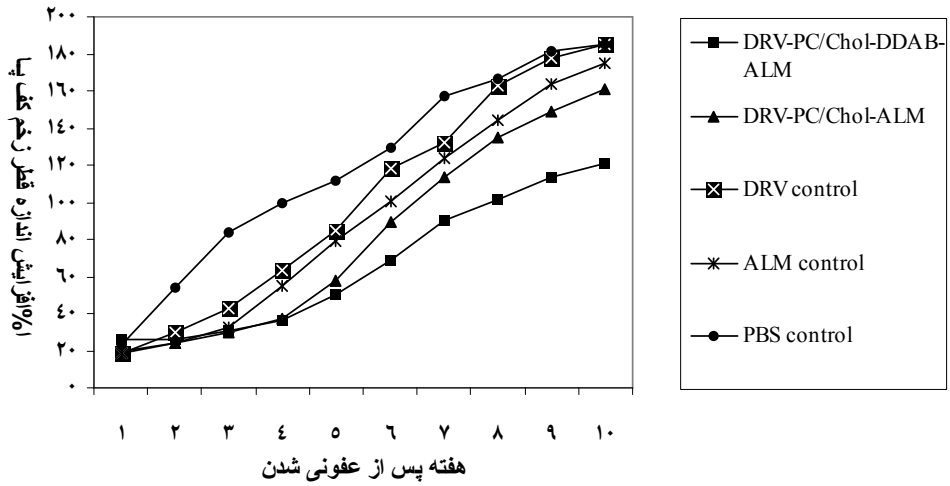
۲-ALM

۳-لیپوزوم های DRV-PC/Chol-DDAB-ALM پس از خالص سازی با سانتریفوژ

۴-لیپوزوم های DRV-PC/Chol-ALM پس از خالص سازی با سانتریفوژ

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۳- میانگین اندازه افزایش قطر زخم در کف پای گروه های مختلف موش های Balb/c واکسینه شده، پس از چالش با انگل لیشمانیا طی هفته های متوالی

تأثیر فرمولاسیون های لیپوزومی درکاهش اندازه زخم

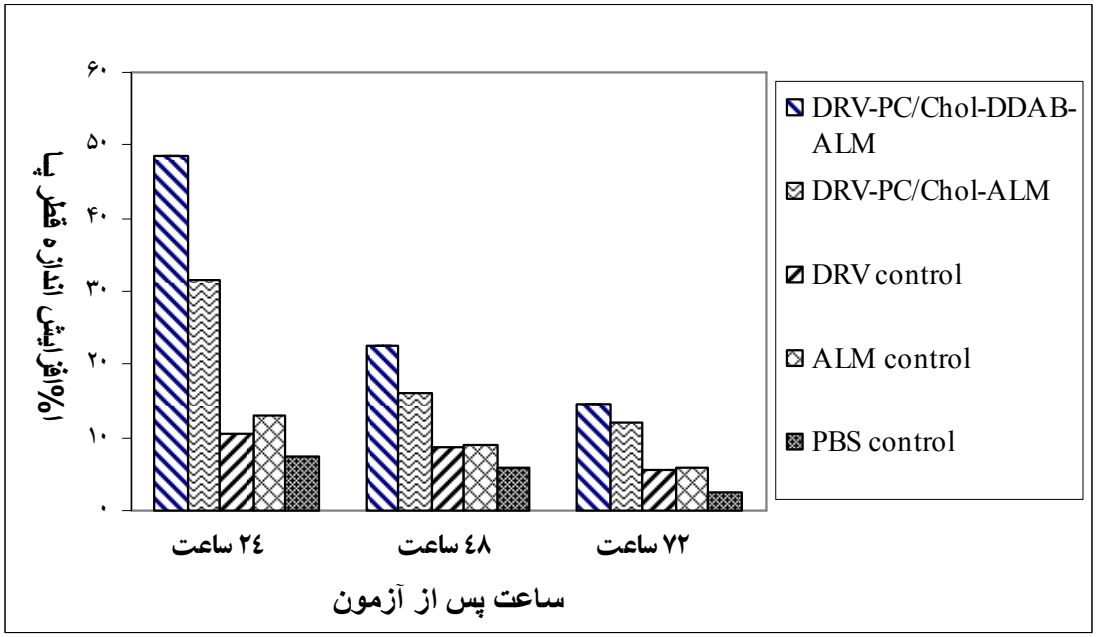
نتایج چالش با انگل زنده نشان داد که درصد افزایش اندازه زخم ها در گروهی که DRV-PC/Chol-DDAB-ALM گرفته بودند به صورت معنی داری کم تر از DRV-PC/Chol-ALM ($p<۰/۰۵$) و در گروه های شاهد ALM ($p<۰/۰۱$) و کنترل لیپوزوم ($P<۰/۰۰۱$) و کنترل PBS بود (تصویر شماره ۳). همین طور گروه دریافت کننده DRV-PC/Chol-ALM نسبت به گروه های کنترل ALM ($p>۰/۰۵$) و کنترل لیپوزوم ($p>۰/۰۵$) و کنترل PBS ($p>۰/۰۵$) اندازه زخم کوچک تری داشت ولی این اختلاف معنی دار نبود. درصد افزایش قطر پا در گروه های کنترل بارز نبود واختلاف معنی داری نداشت ($p>۰/۰۵$).

تأثیر فرمولاسیون های لیپوزومی حاوی ALM در پاسخ DTH

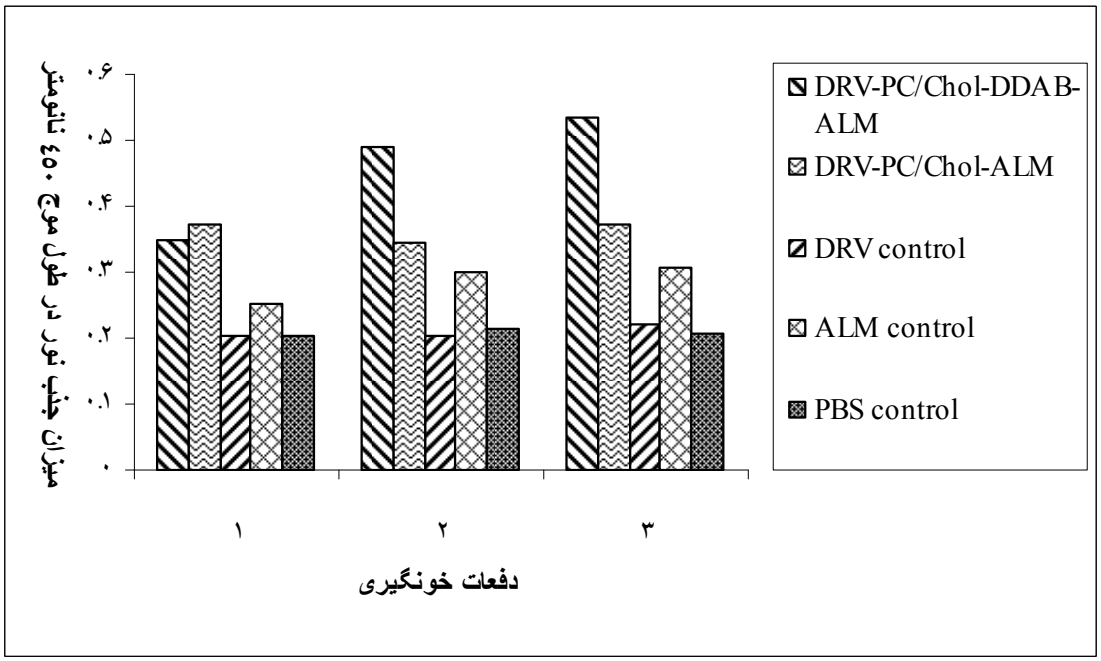
نتایج آزمون پوستی DTH نشان داد که درصد افزایش قطر پا بعد از ۲۴ ساعت در گروهی که DRV-PC/Chol-DDAB-ALM گرفته بودند، با گروه های شاهد ALM ($p<۰/۰۰۱$) و کنترل لیپوزوم ($p<۰/۰۰۱$) و کنترل PBS ($p<۰۰۱$) و DRV-PC/Chol-ALM ($p<۰/۰۰۱$) اختلاف معنی داری داشت (تصویر شماره ۴). همین طور بعد از این مدت گروه دریافت کننده DRV-PC/Chol-ALM نسبت به گروه های کنترل ALM ($p<۰/۰۱$)، لیپوزوم خالی ($p<۰/۰۰۱$) و PBS ($p<۰/۰۰۱$) اختلاف معنی داری را نشان داد. هم چنین بین گروه های کنترل، اختلاف معنی داری مشاهده نشد به ویژه گروه ALM نسبت به گروه های کنترل دیگر تنها افزایش بارزی را نشان نداد که حاکی از ناتوانی ALM تنها در تحریک سیستم ایمنی است ($p<۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID



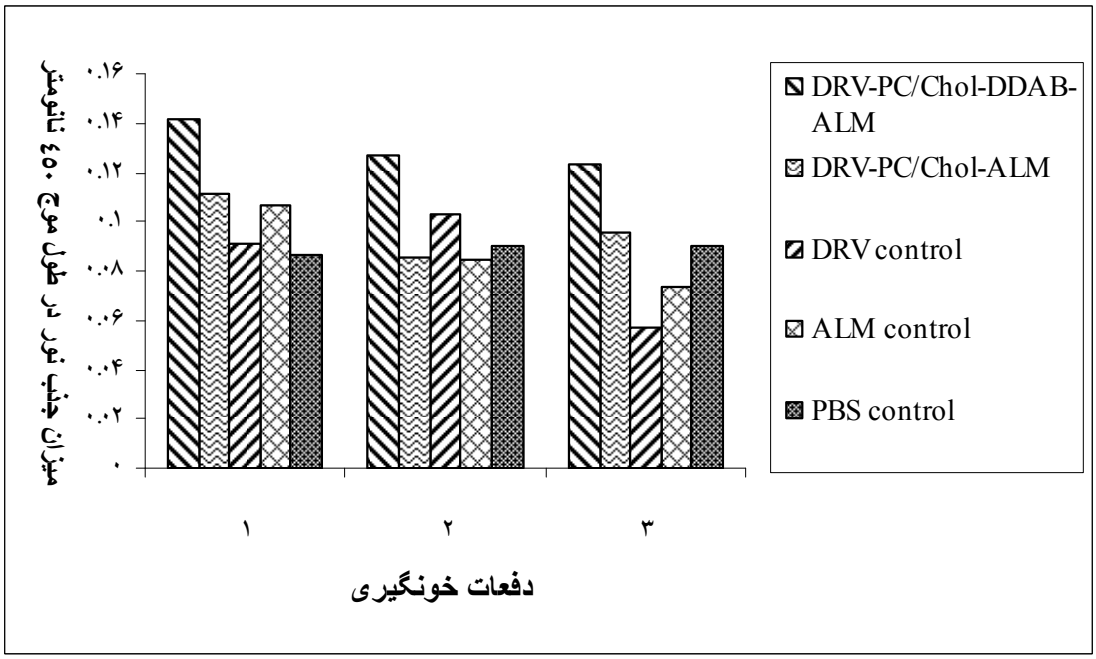
تصویر شماره ٤- پاسخ DTH موش های Balb/c بعد از واکسینه شدن با فرآورده های لیپوزومی حاوی ALM ، ALM تنها، PBS و کنترل لیپوزوم هر ستون مشخص کننده متوسط افزایش ضخامت پا است.



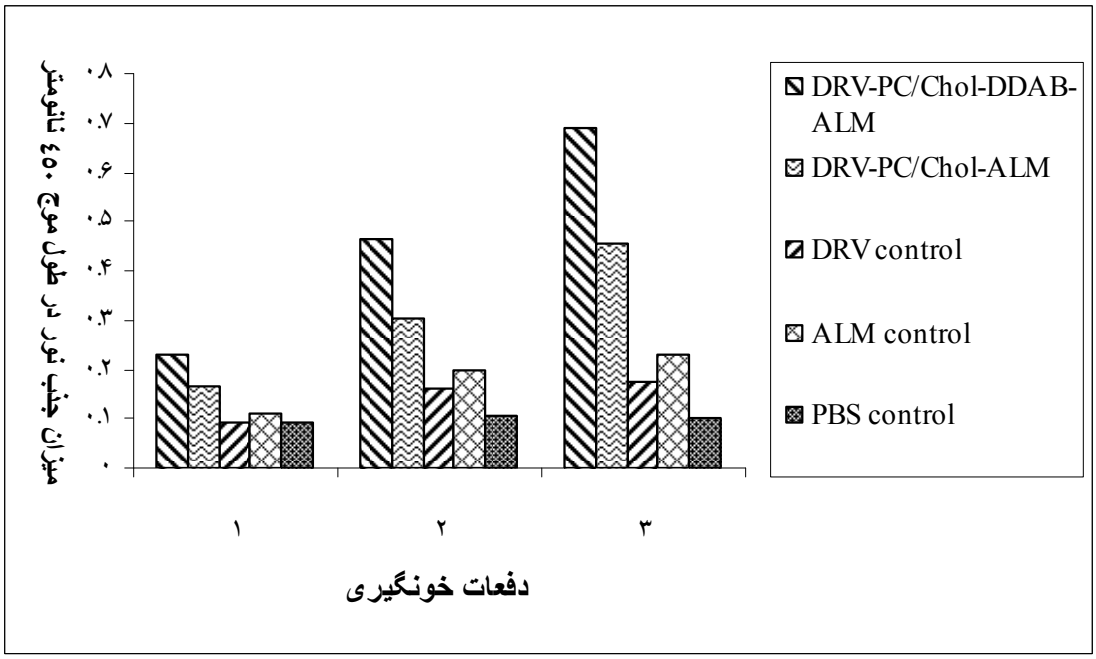
تصویر شماره ٥- میزان آنتی بادی های IgG تام ضد لیشمانیا در سرم موش های واکسینه شده با فرآورده های لیپوزومی حاوی ALM ، کنترل لیپوزوم، PBS و ALM . هر ستون مشخص کننده متوسط میزان آنتی بادی IgG تام در سرم موش های یک گروه است.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ٦- میزان آنتی بادی های IgG1 ضد لیشمانیا در سرم موش های واکسینه شده با فرآورده های لیپوزومی حاوی ALM ، کنترل لیپوزوم PBS و ALM. هر ستون مشخص کننده متوسط میزان آنتی بادی IgG1 در سرم موش های یک گروه است.



تصویر شماره ۷- میزان آنتی بادی های IgG2a ضد لیشمانیا در سرم موش های واکسینه شده با فراورده های لیپوزومی حاوی ALM، کنترل لیپوزوم ، PBS و ALM . هر ستون مشخص کننده متوسط میزان آنتی بادی IgG2a در سرم موش های یک گروه است.

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر فرمولاسیون های لیپوزومی روی تیتر آنتی بادی های ضد لیشمانیا

نتایج به دست آمده تیتر آنتی بادی های اختصاصی IgG نشان می دهد که در موش های ایمونیزه شده با فرآورده لیپوزومی DRV-PC/Chol-DDAB-ALM به صورت بارزی بالاتر از گروه دریافت کننده DRV-PC/Chol-ALM ($p<۰/۰۵$) و گروه های کنترل ($p<۰/۰۰۱$) بود. گروه دریافت کننده DRV-PC/Chol-ALM نیز به صورت معنی داری نسبت به گروه دریافت کننده ALM ($p<۰/۰۵$) وگروه های کنترل لیپوزوم و PBS ($p<۰/۰۱$) تیتر IgG تام بالاتری را نشان داد. در صورتی که در گروه کنترل ALM افزایش آنتی بادی های IgG توتال افزایش معنی داری را نشان نداد (تصویر شماره ۵).

آنالیز ایزوتایپ های IgG اختصاصی لیشمانیا نشان می دهد که مقدار IgG1 در گروه های کنترل تغییر محسوسی نداشته است در صورتی که غلظت این آنتی بادی در گروه دریافت کننده DRV-PC/Chol-DDAB-ALM تا حدودی کاهش یافته است و لیکن این تغییرها از لحاظ آماری معنی دار نبود.

مقدار IgG2a در گروه های ایمونیزه شده با DRV-PC/Chol-DDAB-ALM در مقایسه با گروه های کنترل ($p<۰/۰۰۱$) و گروه دریافت کننده DRV-PC/Chol-ALM ($P<۰/۰۵$) به صورت معنی داری بالا بود. هم چنین آنالیز آماری نتایج ELISA گروه دریافت کننده DRV-PC/Chol-ALM نسبت به گروه های کنترل به صورت بارزی ($p<۰/۰۱$) مقدار IgG2a بالایی را نشان داد در حالی که افزایش این آنتی بادی در گروه های کنترل اختلاف بارزی را نشان نداد.

بحث

پاسخ ایمنی مصونیت بخش در لیشمانیا و سایر انگل های داخلی سلولی از نوع ایمنی باواسطه سلولی است. سلول های Th1 با ترشح سایتوکاین هایی نظیر IL-2، IFN-γ و TNF-β مسوول ایجاد پاسخ های ایمنی سلولی از جمله پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) و فعال شدن ماکروفاژها هستند. در حالی که سلول های Th2 سایتوکاین های IL-4، IL-5، IL-6 و IL-10 را ترشح می کنند و در ایجاد پاسخ هومورال و تولید IgE، IgA و IgG نقش دارند(۲و۱). بررسی ها نشان داده که نوع پاسخ، تعیین کننده سرنوشت و عاقبت عفونت با لیشمانیا است و ناتوانی در کنترل بیماری، ناشی از بروز پاسخ ایمنی Th2 است(۲و۱). تلاش برای یافتن واکسن مناسب علیه لیشمانیازیس به دلیل فقدان ایمونو ادجوانتی که بتواند اختصاصاً ایمنی سلولی را که ایمنی حفاظت بخش علیه این بیماری است تحریک کند به نتیجه نرسیده است. مدل موشی لیشمانیوز واضح ترین و شناخته شده ترین مثال برای الگوی Th1 و Th2 است و امکان مطالعه این زیرجمعیت های سلول های T را فراهم آورده است (۲و۱). وجود نژادهای خالص مختلف موش که به عفونت های لیشمانیایی حساس یا مقاوم هستند، مدل بسیار مناسبی را برای مطالعه پاسخ های ایمنی فراهم کرده است. در بررسی حاضر، از موش های Balb/c به عنوان مدل تجربی در این مطالعه استفاده شد. نژادهای معدودی مانند Balb/c و DBA از نظر ژنتیکی نسبت به عفونت با L.major کاملاً حساس هستند، به طوری که تلقیح زیر جلدی انگل به این حیوان، بیماری پیش رونده ای ایجاد می کند که ابتدا با زخم پوستی مشخص می شود. این زخم به تدریج بزرگ و نکروتیک می گردد. انگل احشا حیوان را نیز مورد تهاجم قرار می دهد که نهایتاً گسترش عفونت سیستمیک و احشایی به مرگ حیوان می انجامید(۲) از طرف دیگر موش های C57BL/6 و CBA/N و C3H از نظر ژنتیکی نسبت به عفونت با این انگل مقاوم هستند و در اثر ابتلا به آن زخم های کوچک حاصل می شود و سپس در عرض چند هفته به سرعت بهبود می یابد. البته

www.SID.ir

Archive of SID

موش هایی از نژادهای دیگر نیز وجود دارند که از نظر حساسیت به انگل لیشمانیا حالت بینا بینی دارند(۲)

لیپوزوم ها ایمونو ادجوانت های مؤثر برای آنتی ژن های پروتئینی هستند و می توانند سبب تحریک پاسخ ایمنی علیه پروتئین ها شوند در نتیجه دانشمندان برای ابداع واکسن با استفاده از این میکروپارتیکل ها تحقیق های گسترده ای صورت داده اند(۲۳). ویژگی القای پاسخ های ایمنی لیپوزوم ها همراه آنتی ژن های پروتئینی می تواند به دلیل افزایش جذب آنتی ژن ها وسیله سلول های ارایه کننده آنتی ژن، نظیر انواع ماکروفاژها و متعاقب آن سلول های T باشد (۲۲). لیپوزوم ها به دلیل اندازه و خصوصیت های فیزیکوشیمیایی، بلافاصله پس از تزریق در بدن عنوان جسم خارجی محسوب و درنتیجه به کمک سیستم رتیکولواندوتلیال و ماکروفاژها بلعیده می شوند و پس از تخریب لیپوزوم ها در داخل این شبکه، آنتی ژن ها آزاد می شود که در محل سلول هدف یعنی Antigen Presenting Cells (APCs) است. در حقیقت لیپوزوم ها سبب ارایه هدف دار آنتی ژن به روش غیرفعال (Passive Targeting) به APCs و در نتیجه باعث افزایش بروز پاسخ ایمنی نسبت به آنتی ژن می شوند(۲۲). هدف از این مطالعه تعیین توانایی القا سیستم ایمنی وسیله لیپوزوم های دارای آنتی ژن ALM برای تحریک اختصاصی سیستم ایمنی سلولی و محافظت موش ها در مقابل چالش با انگل زنده و هم چنین مشخص کردن میزان تأثیر بار مثبت در فرمولاسیون لیپوزومی برای تحریک سیستم ایمنی سلول بود. در این مطالعه برای تهیه لیپوزوم های حاوی ALM از روش DRV استفاده شد. در این روش لیپوزوم های حاصل معمولاً تک لایه ای بزرگ (MLV) یا چند لایه ای (LUV) کوچک با محدوده سایز ۰/۱-۳ میکرومتر هستند(۳۲). به دلیل بالابودن میزان محصورسازی، این روش یکی از به ترین روش ها برای تولید لیپوزوم های حاوی آنتی ژن پروتئینی است که بسته به نوع فسفولیپید و ترکیب آن می تواند تا حدود ۸۰٪ افزایش یابد (۳۲و۲۳). همان طور که در مطالعه میکروسکوپی نشان داده شد لیپوزوم های تهیه شده در این مطالعه از نوع LUV یا MLV کوچک غیرهموژن با محدوده سایز ۰/۲-۳ بوده و میزان محصورسازی نسبتاً بالا (۴۳۰۵٪) بود. علت درصد محصورسازی بالا با روش DRV برای مواد محلول در آب به این دلیل است که وقتی SUV های خالی با آنتی ژن مخلوط و توسط Freeze/Dryer منجمد و خشک می شوند، لیپوزوم های خالی در ساختمان دولایه ی خود دچار شکستگی می شوند، دراین حالت مولکول های فسفولیپید تشکیل دهنده لیپوزوم ها در یک حالت منظم در کنار یک دیگر قرار می گیرند(به جای آن که تشکیل یک ماتریکس تصادفی بدهند) که در مرحله رهیدراسیون با مقدار کمی آب (معمولاً ۱/۱۰ آب اولیه که لیپوزوم های SUV مورد استفاده قرار می گیرد) می توانند هیدراته شوند و دوباره تشکیل لیپوزوم هایی با اندازه بزرگ تر را بدهند و آنتی ژن محلول در آب را در بر بگیرند (۳۲و۲۳). علاوه بر این از نظر حفظ ساختمان و شکل فضایی پروتئین، این روش نسبت به روش های دیگر تهیه لیپوزوم به تر است(۲۳). در روش های دیگر مانند روش تبخیر حلال Bangham یا تبخیر فاز معکوس Szoka آنتی ژن در مجاورت حلال های آلی مثل کلروفرم و متانول قرار می گیرد که می تواند موجب دناتوره شدن و تغییر شکل فضایی آنتی ژن شود، ولی در روش DRV، آنتی ژن ها با SUV های خالی از قبل تهیه، مخلوط می شود، بنابر این در تماس با حلال های آلی قرار نمی گیرد.

هدف از SDS-PAGE در آنالیز نمونه های لیپوزومی حاوی ALM این بود که نشان داده شود پس از تهیه لیپوزوم ها و خالص سازی آن ها وسیله اولتراسانتریفوژ، لیپوزوم ها حاوی ALM هستند (۲۶).

برای تعیین کارآیی لیپوزوم ها در تحریک سیستم ایمنی و

www.SID.ir

Archive of SID

محافظت در مقابل لیشمانیوز پوستی از تست DTH برای تعیین ایزوتایپ های آنتی بادی و چالش با انگل زنده استفاده شد. تست DTH یک آزمون مناسب برای نشان دادن ایمنی سلولی و هم چنین آزمایش متغیر برای میزان محافظت در مقابل لیشمانیازیس است (۳۷-۳۵). در تست DTH فرآورده لیپوزومی دارای DRV-PC/Chol-DDAB-ALM درمقایسه با سایر گروه ها بیش ترین تأثیر را دارا بود. تأثیر این فرآورده در هر سه نوبت اندازه گیری، بیش تر از بقیه گروه ها بود و هم چنین گروهی که فرآورده لیپوزومی DRV-PC/Chol-ALM را دریافت کرده بود نسبت به گروه های کنترل، DTH قوی تری را از خودنشان داد بنابر این می توان نتیجه گرفت که اثر ایمونو ادجوانتی لیپوزوم موجب القا پاسخ ایمنی سلولی در این گروه شده است. جنبه دیگری که در بررسی پاسخ ایمنی به آن پرداخته شد، بررسی پادتن های گروه های IgG بود. در بررسی پادتن ها، افزایش IgG2a که در اثر تحریک به کمک IFN-γ ایجاد می شود، غلبه ایمنی سلولی و افزایش IgG1 که در اثر تحریک وسیله IL-4 حاصل می شود غلبه ایمنی هومورال را نشان می دهد. نتایج تست ELISA، نشان می دهد فرمولاسیون لیپوزومی حاوی آنتی ژن ALM، سبب افزایش مقدار IgG2a در سرم موش ها شده است و افزایش معنی دار ($p<۰/۰۰۱$) این آنتی بادی در گروه لیپوزومی حاوی DDAB نشان می دهد که ایمنی سلولی در این گروه نسبت به گروه های دیگر به صورت قوی تر تحریک شده است. افزایش تیتر IgG1 در گروه های کنترل مؤید القا پاسخ Th2 در آن ها است.

به منظور اثبات تأثیر گروه ها درمحافظت موش ها در مقابل لیشمانیوز پوستی در مرحله بعد، تست چالش با انگل زنده صورت گرفت. از تست چالش همان طور که انتظار می رفت بیش ترین اثر محافظتی در مقابل لیشمانیوز پوستی متعلق به گروه DRV-PC/Chol-DDAB-ALM بود. تأثیر این گروه در محافظت موش ها در راستای تست DTH و ELISA بود. هم چنین اثر محافظتی گروه DRV-PC/Chol-ALM نسبت به گروه های کنترل بالا بود که اثر ایمونو ادجوانتی فرآورده لیپوزومی را اثبات می کند.

استفاده از آنتی ژن ALM به عنوان کاندیدای ساخت واکسن لیشمانیازیس جلدی در سال های اخیر با همکاری سازمان جهانی بهداشت مورد کارآزمایی قرا رگرفته است که این بررسی ها با ایمونو ادجوانت های مختلف همراه بود (۷و۶). در مطالعه های بالینی فاز ۳ ALM، BCG به عنوان ایمونو ادجوانت مورد استفاده قرار گرفت(۶). در راستای نتایج به دست آمده از تأثیر BCG در القای پاسخ DTH و تحریک تولید IFN-γ (۸و۶) از این ماده به عنوان ادجوانت به همراه ALM ایران، هند و سودان استفاده شده است. هم چنین استفاده از ادجوانت Alum به همراه ALM نیز مورد کارآزمایی قرار گرفته است(۶).

کاربرد لیپوزوم به عنوان ایمونو ادجوانت به همراه آنتی ژن های مختلف علیه لیشمانیازیس درمدل های موشی مورد آزمایش قرا رگرفته است و نتایج بسیار ارزنده ای به دست آمده است. هم چنین لیپوزوم ها به عنوان حامل و ایمونو ادجوانت همراه آنتی ژن های لیشمانیا برای پیش گیری از لیشمانیوز احشایی مورد استفاده قرار گرفتند (۴۰و۳۸). در یک مطالعه لیپوزوم های خنثی تهیه شده از لسیتین تخم مرغ و کلسترول با روش تبخیر حلال که حاوی آنتی ژن های استخراج از غشای L.donovani باعث القای پاسخ DTH و محافظت نسبی موش های Balb/c در مقابل لیشمانیوز احشایی شد(۴۰). در یک مطالعه دیگر که توسط همین گروه ولی با استفاده از لیپوزوم های با بار مثبت تهیه شده از لسیتین تخم مرغ، کلسترول و استئاریل آمید (برای ایجاد بار مثبت روی سطح لیپوزوم ها) با روش تبخیر حلال که حاوی آنتی ژن های استخراج از غشای L.donovani بودند نسبت به لیپوزوم های خنثی در موش های

www.SID.ir

Archive of SID

Balb/c تأثیر محافظتی بیش تری از خود نشان دادند. از طرفی در مطالعه دیگر همین محققان نشان داده شد که اثر محافظتی لیپوزوم های با بار منفی از لیپوزوم های خنثی و دارای بار مثبت کم تر است اگر چه پاسخ DTH در این گروه نیز مثبت بود (۴۰). درمطالعه ای که توسط جعفری و همکاران وی با استفاده از آنتی ژن ALM محصور در لیپوزوم روی موش های Balb/c صورت گرفت نشان داده شد که آنتی ژن ALM محصور در لیپوزوم می تواند القای پاسخ ایمنی را به طرف ایمنی سلولی سوق دهد(۲۸). در مطالعه دیگری که توسط همین گروه به اجرا درآمد، مشخص شد که لیپوزوم ها می توانند برای آنتی ژن های نو ترکیب ایمونو ادجوانت مؤثری باشند. این تحقیق نشان داد موش های Balb/c واکسینه شده با لیپوزوم های حاوی آنتی ژن LmSTl1 دارای تیتر آنتی بادی IgG2a بالا بود و هم چنین کم ترین میزان انگل موجود در احشا و اندازه زخم ایجاد شده بعد از چالش به این گروه تعلق داشت(۱۵). در مطالعه های صورت پذیرفته ی فوق نیز برای تهیه لیپوزوم، از روش DRV استفاده شده است.

مطالعه Kahl و همکاران وی نشان داد که لیپوزوم ها می توانند به عنوان آدجوانت آنتی ژن های لیشمانیا استفاده شوند. در این مطالعه آنتی ژن محلول لیشمانیا ماژور (SLA) در لیپوزوم های تشکیل شده (DSPC-DPPC-PC) که به روش DRV محصور شدند دردو مرحله به موش های Balb/c تزریق شد و آنتی بادی های ضد لیشمانیا و تست چالش مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه دیگر تأثیر لیپوزوم های حاوی gp63 تخلیص شده از L.major علیه لیشمانیوز جلدی نشان داده شده است(۲۶). در این مطالعه لیپوزوم های حاوی آنتی ژن لیشمانیا به وسیله روش DRV با استفاده از تست های DSPC و کلسترول تهیه شد. نتایج تست چالش با انگل زنده تأثیر لیپوزوم های حاوی gp63 و PG در محافظت موش های Balb/c را به خوبی روشن می کند. در هر دو مطالعه فوق برای نشان دادن محصور کردن آنتی ژن ها در داخل لیپوزوم از SDS-PAGE استفاده شد.

به طور کلی این تحقیق نشان می دهد که فرمولاسیون لیپوزومی دارای بار مثبت، سبب القا قوی تر پاسخ ایمنی سلولی می شود و می تواند به عنوان ایمونو ادجوانت مؤثر همراه با آنتی ژن لیشمانیا برای طراحی واکسن لیشمانیازیس مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از زحمات ارزشمند آقای دکتر یحیی دولتی ریاست محترم مرکز آموزش و پژوهش بیماری های پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران و کارکنان مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تشکر و قدردانی می شود.

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی مصوب باشگاه پژوهش گران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم در مرکز آموزش و پژوهش بیماری های پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به اجرا درآمد که به این وسیله از همه ی این مجموعه تشکر و قدردانی می شود.

References

1-Solbach W, Laskay T. The host response to Leishmania infection. Adv Immunol 2000; 74: 275-317.

2-Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Mic Rev 2001; 14: 229-43.

3-Kathleen A, Rogers A, Gregory K, et al. Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. FEMS Microb Lett 2002; 209: 1-7.

www.SID.ir

4-Scott PH, Pearce E. Role of cytokines and CD4 T cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. Immunol Rev 1989; 112: 161-82.

5-Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol 1998; 28: 121-34.

6-Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, et al. Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. Indian J Med Res 2006; 123: 423-38.

7-Modabber F. First generation leishmaniasis vaccine clinical development: moving but what next? Curr Opin Anti Infect Invest Drug 2000; 2: 35-39.

8-Alimohammadian MH, Khamesipour A, Darabi H, et al. The role of BCG in human immune responses induced by multiple injections of autoclaved Leishmania major as a candidate vaccine against leishmaniasis. Vaccine 2002; 3422: 1-7.

9-Howard J G, Liew FY, Hale C, et al. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. III. Further characterization of the protective immunity against fatal Leishmania tropica infection induced by irradiated promastigotes. J Immunol 1984; 132: 450-55.

10-Armijos RX, Weigel MM, et al. Field trial of a vaccine against New World Cutaneous Leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity and efficacy during 12 months of follow-up. J Infect Dis 1998; 177: 1352-57.

11-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.

12-Sharifi I, Fekri AR, Aflatonian 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: 1540-43.

13-Kenney RT, Sacks DL, Sypeket JP, et al Protective immunity using recombinant human IL-12 and Alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. J Immunol 1999; 163: 4481-88.

14-Jaafari MR, Ghafarian A, Farrogh-Gisour A, et al. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of Leishmania (rgp63) reconstituted with liposomes in Balb/c mice. Vaccine 2006; 24: 5708-17.

15-Badiee A, Jaafari MR, Khamesipour A. Leishmania major: Immune response in Balb/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. Exp Parasitology 2007; 115: 127-34.

16-Champsi J, Mahon-Pratt D. Membrane glycoprotein M-2 protects L. amazonensis infection. Infect Immune 1988; 56: 3272-79.

17-Handman E, Symons FM, Baldwin TM, et al. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from L. major is mediated by a Th1 type of immune response. Infect Immune 1995; 63: 4261-67.

18-Jurunathan S, Sacks DL, Brown DR, et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with L. major. J Exp Med 1997; 186: 1137-47.

19-Walker PS, Scharton-Kersten T, Rowton ED, et al. Genetic immunization with gp63 DNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. Hum Gene Ther 1998; 9: 1899-907.

20-Hashemi-Fesharaki R, Ale-Agha S, Habbibi GR, et al. Production of inactivated wet rural Leishmania major. Iranian J Med Sci 1998; 23: 74-80.

www.SID.ir

Archive of SID

21-Bahar K, Dowlati Y, Alimohammadian MH, et al. Comparative safely and immunogenicity trial of two killed Leishmania major vaccines with or without BCG in human volunteers. Clin Dermatol1996; 14: 489-95.

22-Alving CR. Liposomal vaccines: clinical status and immunological presentation for humoral and cellular immunity. Ann NY Acad Sci 1992; 754:143-52.

23-Gregoriadis G. The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposome. J Drug Target 1994; 2: 351-56.

24-Galdiero M, Carratelli CR, Nuzzo I, et al. Enhanced cellular response in mice treated with a brucella antigen-liposome mixture. FEMS Immuno Med Microbiol 1995; 10: 234-35.

25-Reddy RF, Zhou S, Nair L, et al. In vivo cytotoxic T lymphocyte induction with soluble proteins administered in liposomes. J Immun 1992; 148: 585-89.

26-Kahl LP, Lelchuk R, Scott CA, et al. Characterization of Leishmania major antigen/liposomes that protect Balb/c mice against cutaneous leishmaniasis. Infec Immun 1990; 58: 3233-41.

27-Phillips NC, Gagne L, Ivanoff N, et al. Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens. Vaccine 1996; 14: 898-904.

۲۸- سهرابی ی، جعفری م ر، خامسی پور ع. بررسی پاسخ ایمنی در برابر لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده محصور در لیپوزوم با Tm متفاوت در مدل موشی. مجله علوم پایه پزشکی ایران. ۱۳۸۵؛ ۹: ۱۸-۷.

29-Nakanishi T, Kunisava J, Hayashi A, et al. Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins. Bioch Biophy Res Com 1997; 240: 793-97.

30-Sugimoto M, Ohishi K, Fukasawa M, et al. Oligomannose coated liposomes as an adjuvant for the induction of cell-mediated immunity. FEBS Lett 1995; 363: 53-56.

31-Fortin A, Shahum E, Krzystyniak K, et al. Differential activation of cell-mediated immune functions by encapsulated and surface-linked liposomal antigens. Cell Immunol 1996; 169: 208-17.

32-Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitation. International J Pharmaceutics 1997; 154: 123-40.

33-Evans DA. Leishmania culture methods. In: Taylor AER, Baker IR (eds). In vitro methods for parasite cultivation. Academic Press: 1988; 56-7.

34-Wber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem 1969; 244: 4406-12.

35-De Rossel RA, Bray RS, Alexander J. The correlation between delayed-type hypersensitivity, lymphocyte activation and protective immunity in experimental murine leishmaniasis. Parasit Immunol 1987; 9: 105-15.

36-Liew FY, Dhaliwal JS. Destinctive cellular immunity in genetically susceptible Balb/c mice recovered from Leishmania major infection or after subcutaneously immunization with killed parasite. J Immunol 1987; 138: 4450-56.

37-Mauel J, Behin R. Leishmaniasis: immunity, immunopathology and immunodiagnosis. In: Cohen S, Werren KS (eds). Immunity to parasitic infection. Oxford: Blackwell Scientific; 1982: 343-63.

38-Afrin F, Ali N. Adjuvancity and protective immunity elicited by Leishmania donovani antigens encapsulated in positively charged liposomes. Infect Immun 1997; 65: 2371-77.

www.SID.ir

Archive of SID

39-Afrin F, Anam K. Induction of partial protection against Leishmania donovani by promastigote antigens in negatively charged liposomes. J Parasitol 2000; 86: 730-35.

40-Ali N, Afrin F. Protection of mice against visceral leishmaniasis by immunization with promastigote antigen incorporated in liposomes. J Parasitol 1997; 83: 70-75.

www.SID.ir