Archive OF SID

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۱: از ۲۵-۳۵
بهار ۱۳۸۹

ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کدکننده ژن کامل راپتری-۲ توکسوپلاسما گوندی در موش‌های BALB/c

کامی حسینیان‌خسروشاهی[۱]، فاطمه غفاری‌فر[۲*]، زهره شریفی[۳]، ساشیلا دسوزا[۴]، عبدالحسین دلیمی[۵]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسما، انستیتو پاستور بلژیک، بروکسل، بلژیک
۵- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۷/۱۴ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۱/۱۸

چکیده

هدف: توکسوپلاسما گوندی یک انگل تک‌یاخته‌ای داخل سلولی است که موجب بیماری توکسوپلاسموزیز در انسان و حیوان می‌شود. در سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری در زمینه شناخت کاندیدهای مناسب واکسن که باعث القای پاسخ‌های ایمنی مؤثر می‌شود، صورت گرفته است.
در این مطالعه، از ژن کامل راپتری-۲ توکسوپلاسما گوندی برای ساخت DNA واکسن استفاده شد و در نهایت پاسخ‌های ایمنی ناشی از این ژن در مقایسه با گروه‌های کنترل ارزیابی شد.
مواد و روش‌ها: ایمنی‌زایی موش‌های BALB/c سه‌بار و به‌صورت عضلانی (به فاصله سه هفته) توسط pc-ROP2 (به‌عنوان گروه شاهد) و pc DNA3 و فسفات بافر سالین (به‌عنوان گروه‌های کنترل) انجام پذیرفت. بعد از انجام ایمونیزاسیون، پاسخ‌های ایمنی ناشی از آن به کمک اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی و سطح سیتوکین‌ها ارزیابی شد.
نتایج: نتایج حاصل از اندازه‌گیری سیتوکین‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ٤ نشان‌دهنده مقادیر بالای اینترفرون گاما و مقادیر پایین اینترلوکین ٤ در گروه‌های واکسینه شده با pc-ROP2 در مقایسه با گروه‌های کنترل بود. این نتایج نشان می‌دهد که پاسخ ایمنی سلولی Th1 در موش‌هایی که با pc-ROP2 واکسینه شده‌اند در مقایسه با موش‌های گروه‌های کنترل که با پلاسمید خالی pc-DNA3 و فسفات بافر سالین واکسینه شده‌اند، به شدت تحریک شده است.
اندازه‌گیری آنتی‌بادی کل IgG اختلاف معنی‌دار را بین گروه‌های مورد و کنترل تأیید کرد ($P<۰/۰۵$). همچنین میزان بقای موش‌ها در گروه‌های مورد و کنترل بعد از انجام چالش ارزیابی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان بقای موش‌هایی که با پلاسمید pc-ROP2 ایمن‌سازی شدند، با گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌دار دارند ($P<۰/۰۵$).
نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که pc-ROP2 به‌عنوان DNA واکسن در القای پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی مؤثر بوده و همچنین در افزایش طول عمر موش‌ها در برابر توکسوپلاسموزیز تا اندازه‌ای مفید است.

کلیدواژگان: توکسوپلاسما گوندی، DNA واکسن، ژن کامل راپتری-۲

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، کدپستی: ١٤١١٧١٣١١٦
Email: ghafarif@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive OF SID

۱- مقدمه

توکسوپلاسما گوندی (*Toxoplasma gondii*)، عامل توکسوپلاسموزیز (Toxoplasmosis)، می‌تواند همه موجودات خونگرم از جمله انسان‌ها را مبتلا سازد. این انگل شیوع جهانی داشته و تقریباً $\frac{۱}{۳}$ مردم جهان سرم مثبت هستند [۱].

در اکثر افراد سالم، توکسوپلاسموزیز علامتی ندارد اما در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند مانند افراد مبتلا به ویروس ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrom: AIDS) [۲] یا افرادی که تحت عمل پیوند عضو قرار گرفته‌اند و داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی مصرف نموده‌اند [۳] باعث عوارض شدید و گاه کشنده می‌شود [٤]. در خانم‌های باردار، توکسوپلاسما گوندی می‌تواند منجر به عوارض شدید چشمی یا عصبی در جنین شود و حتی باعث سقط جنین نیز می‌شود [٥، ٦].

توکسوپلاسموزیز باعث سقط جنین در حیوانات مزرعه مانند گوسفند و خوک و غیره می‌شود؛ بنابراین این تک‌یاخته باعث ضررهای اقتصادی قابل توجهی در صنعت دامپروری می‌شود [۷، ۸]. عوارض شدید و کشنده توکسوپلاسموزیز در انسان‌ها و حیوانات، محققین را بر آن داشته که مطالعات و تحقیقات گسترده‌ای را برای ساخت و توسعه واکسن‌های مؤثر علیه این بیماری انجام دهند.

یک واکسن مؤثر علیه توکسوپلاسما گوندی واکسنی است که بتواند از عوارض شدید و کشنده این انگل در جنین و افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی جلوگیری کرده و همچنین باعث کاهش ضررهای اقتصادی شود [۹].

DNA واکسن یک موضوع جدیدی است که مطالعات گسترده‌ای روی آن انجام شده و در حال انجام است و همچنین DNA واکسن در مقایسه با واکسن‌های پروتئینی توانایی بیشتری برای القا و تحریک همه مسیرهای ایمنی به‌ویژه ایمنی سلولی (Cytotoxic T-cell) دارد [۱۰].

در توکسوپلاسموزیز، پاسخ حفاظتی توسط ایمنی سلولی که شامل لنفوسیت‌های T، از نوع CD_4^+ و CD_8^+ است، ایجاد می‌شود؛ بنابراین پلاسمید کدکننده ژنی که بتواند هر دو نوع لنفوسیت‌های T یعنی CD_4^+ و CD_8^+ را فعال نماید، می‌تواند کاندیدای خوبی برای تهیه DNA واکسن بر علیه توکسوپلاسما گوندی باشد [۱۱].

همانند سایر ارگانیسم‌های تک‌سلولی، توکسوپلاسما گوندی از آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیک فراوانی تشکیل شده است [۱۲، ۱۳]. آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی از بهترین فرم‌های آنتی‌ژنی برای تحریک پاسخ ایمنی سلولی است به‌همین دلیل این آنتی‌ژن‌ها، کاندیدای مناسبی برای تهیه واکسن علیه پلاسموزیز است.

پروتئین راپتری-۲ (Rhoptry protein-2: ROP2) یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی است که جزء خانواده ROPها بوده و در هر سه مرحله چرخه زندگی انگل توکسوپلاسما گوندی بیان می‌شود [١٤-١٦].

مطالعات نشان داده است که حذف ROP2 باعث اختلالاتی در خود انگل و در فرایند هجوم انگل به میزبان مانند اختلال در روند تکاملی ROP، اختلال در تقسیم سیتوپلاسم سلولی (Cytokinesis)، کاهش ارتباط بین غشا واکوئل پارازیتوفورس (Parasitophorous vacuole) انگل و میتوکندری سلول میزبان، کاهش توانایی هجومی انگل به میزبان و کاهش قدرت بیماری‌زایی انگل در موش‌ها می‌شود [١٦].

ژن کامل ROP2 که یک پروتئین ٦٤ کیلودالتونی را بیان می‌کند، باعث القای پاسخ‌های هومورال که شامل تولید IgA، IgM و IgG است، می‌شود [۱۷]. همچنین مطالعات نشان داده است که پروتئین ROP2 به‌وسیله کلون‌های سلولی لنفوسیت T انسانی شناخته شده و باعث تولید و افزایش سطح اینترفرون گاما (Interferon gamma: IFN-γ) می‌شود [۱۸]. سه عدد از مهم‌ترین اپی‌توپ‌های ROP2 که توسط کلون‌های لنفوسیت T شناخته می‌شود، شامل واحدهای ۱۹۵ تا ۲۱٤، واحدهای ۳۹۱ تا ٤۰۸ و واحدهای ٤۹۹ تا ٥۲۹ است [۱۹]. همه این خصوصیات ROP2 آن را به‌عنوان یک کاندیدای مناسب برای

www.SID.ir

Archive OF SID

ساختن واکسن‌هایی مطرح کرده که این واکسن‌ها بر پایه DNA بوده و در این واکسن‌ها از پلاسمیدهای کدکننده آنتی‌ژن‌های پروتئینی استفاده می‌شود و همچنین این واکسن‌ها نسل جدید و مؤثری از واکسن است که برعلیه انگل‌های داخل سلولی ساخته می‌شود [۲۰-۲۲].

با توجه به به این مطالب و همچنین چون ایمنی‌زایی با DNA باعث القای پاسخ‌های ایمنی حفاظتی می‌شود، در این تحقیق توانایی پلاسمید کدکننده ژن کامل ROP2 در القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال و ایجاد اثر حفاظتی در موش‌ها بعد از چالش با سویه کشنده RH توکسوپلاسما گوندی ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساخت پلاسمید نوترکیب

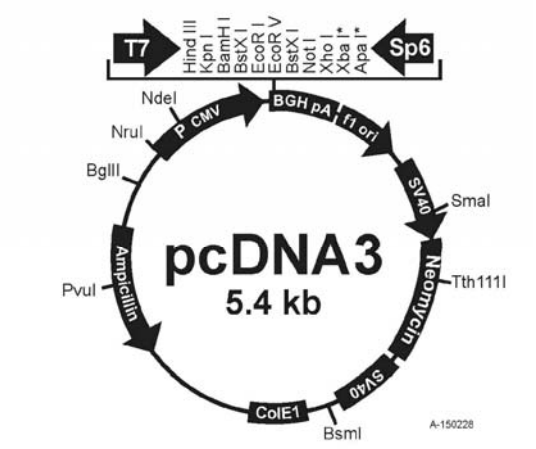
ژن کامل ROP2 که یک پروتئین ٦٤ کیلودالتونی را بیان می‌کند، در داخل پلاسمید pc-DNA3 (Invitrogen, USA) (شکل ۱) کلون و در نهایت بیان شده است [۲۳].

به‌طور خلاصه، ابتدا یک جفت آغازگر (Primer) الیگونوکلئوتیدی برای ژن کامل ROP2 به شرح زیر طراحی شد:

آغازگر جلویی ROP2 :5'-ATT AAG CTT ATG GAA AAC TGT GCG TCG GTC AG-3'

آغازگر برگشتی ROP2 :5'- ATT GAA TTC TCA TGC CGG TTC TCC ATC AG -3'

آغازگر جلویی (Forward primer) دارای ۳۲ نوکلئوتید با جایگاه شناسایی برش آنزیمی *Hind*III و کدون شروع ATG است و آغازگر برگشتی (Reverse primer) دارای ۲۹ نوکلئوتید با جایگاه شناسایی برش آنزیم *Eco*RI است. (جایگاه‌های برش آنزیمی روی هر دو آغازگر با خط کشیدن مشخص شده‌اند).



شکل ۱ نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3

ژن کامل ROP2 از روی DNA توکسوپلاسما گوندی سویه RH توسط PCR (Polymerase Chain Reaction) تکثیر شد و سپس محصولات PCR توسط آنزیم‌ها برش خورد و قطعه کامل ژن ROP2 که در حدود ١٦٨٦ جفت‌باز است در داخل ناقل pTZ 57RT کلون شد.

سپس پلاسمید نو ترکیب pcDNA3-ROP2 به کمک pT-ROP2 و pc-DNA3 ساخته شد.

پلاسمید نوترکیب بیانی pcDNA3-ROP2 به درون سلول‌های CHO (Chinese Hamster Ovary) ترانسفکت شد و بیان پروتئین ژن کامل ROP2 درون سلول‌های CHO توسط SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) و وسترن بلات (Western blot) تأیید شد [۲۳].

پس از تأیید پلاسمیدهای نوترکیب بیانی توسط توالی‌یابی نوکلئوتیدی، همه آن‌ها به داخل باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه TG1 ترانسفورم شد و انبوه‌سازی پلاسمید نوترکیب صورت گرفت. در نهایت برای استخراج و خالص‌سازی پلاسمید نوترکیب pc-ROP2 از باکتری‌ها از کیت استخراج (Qiagen, Germany) استفاده شد و این عمل مطابق برنامه کیت انجام پذیرفت. بعد از انجام خالص‌سازی و استخراج، غلظت پلاسمیدهای به‌دست آمده توسط

www.SID.ir

Archive OF SID

اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۲٦۰ و ۲۸۰ سنجیده و نسبت جذب نوری (Optical Density: OD) ۲٦۰/۲۸۰ برای آن‌ها محاسبه شد و این نسبت بین ۱/۸ تا ۲ بود.

۲-۲- موش‌ها

موش‌های BALB/c ماده ٦-۸ هفته‌ای از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری و تحت شرایط استاندارد از لحاظ آب و غذا نگهداری شدند.

۲-۳- انگل

تاکی‌زوئیت‌های (Tachyzoites) انگل توکسوپلاسما گوندی (سویه RH) از آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی ساختمان شماره ۲ دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد.

نگهداری تاکی‌زوئیت‌ها به‌وسیله آلوده کردن مکرر و سریالی موش‌های BALB/c به‌صورت داخل صفاقی میسر شد؛ بدین‌ترتیب که بعد از چند روز از آلوده کردن موش‌ها (۳-۵ روز)، تاکی‌زوئیت‌های فعال و تازه از مایع صفاقی موش کشیده شده و به موش‌های جدید تزریق شد.

برای تهیه آنتی‌ژن‌های مورد نیاز برای روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent assay: ELISA) و اندازه‌گیری سیتوکین‌ها (Cytokines) بدین‌ترتیب اقدام شد که ابتدا تاکی‌زوئیت‌های انگل از صفاق موش استخراج و سانتریفوژ شد سپس رسوب در فسفات بافر سالین (Phosphate Bufferd Saline: PBS) حل شده و مجدداً سانتریفوژ شد (شستشو با PBS دو تا سه‌بار صورت پذیرفت) بعد از شستشو، عمل انجماد (Freezing) و ذوب کردن (Thawing) برای آزادسازی آنتی‌ژن‌های انگل صورت پذیرفت و این عمل حدود ۱۰-۱۲ بار تکرار شد. در نهایت بعد از انجام سانتریفوژ، مایع رویی به‌دست آمده توسط فیلتر ۰/۲ میکرو میلی‌متر (Nalge company, USA) فیلتره شده و غلظت پروتئین حاصل که همان آنتی‌ژن انگلی است، توسط روش لوری (Lowry) مشخص شد [۲٤].

۲-٤- ایمن‌سازی و چالش

۳۳ عدد موش BALB/c ماده (٦-۸ هفته‌ای) به‌صورت تصادفی در سه گروه تقسیم شدند (۱۱ موش در هر گروه). تزریق موش‌های هر گروه بدین‌صورت انجام شد که ابتدا برای هر تزریق مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ماده تزریقی (که متشکل از ۵۰ میکروگرم از پلاسمید در ۱۰۰ میکرولیتر PBS استریل بود) درون سرنگ کشیده شد و سپس محل تلقیح با الکل ضد عفونی شد و تزریق به آرامی در هر دو ران راست و چپ پای موش (هر عضله حداکثر ۵۰ میکرولیتر) در عضله چهار سر ران (Quadriceps) انجام شد [۲۵].

تزریقات گروه‌های یک و دو به‌عنوان گروه‌های کنترل به‌ترتیب توسط PBS و پلاسمید خالی pc-DNA3 انجام شد ولی موش‌های گروه سه به‌عنوان گروه مورد توسط (۵۰ میکروگرم) پلاسمید نوترکیب pc-ROP2 ایمن‌سازی شدند. ایمن‌سازی در ۳ نوبت و به فاصله سه هفته در روزهای صفر و ۲۱ و ٤۲ به همان ترتیبی که در بالا شرح داده شد، صورت پذیرفت.

برای جمع‌آوری سرم موش‌ها به‌منظور اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی کل از ۵ سر از موش‌های هر گروه به‌صورت تصادفی در روزهای ٤۲ (قبل ایمن‌سازی سوم) و ٦۳ خونگیری انجام شد. بدین‌ترتیب که خونگیری از گوشه چشم با استفاده از پیپت پاستور استریل انجام شد و خون‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و در نهایت سرم خون موش‌ها جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

٤ هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی (در روز ۷۰)، ۵ موش از هر گروه به‌طور تصادفی انتخاب شده و عمل استخراج لنفوسیت از طحال آن‌ها تحت شرایط کاملاً استریل انجام پذیرفت. عمل چالش نیز بعد از روز ۷۰ روی ٦ موش باقی‌مانده از هر گروه توسط 10^4 تاکی‌زوئیت سویه RH انگل

www.SID.ir

Archive OF SID

توکسوپلاسما گوندی به‌صورت داخل صفاقی انجام و متعاقب آن میزان بقای موش‌های هر گروه (برحسب روز) ثبت شد.

۲-۵- بررسی ایمنی هومورال

برای اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی IgG کل ضد توکسوپلاسما گوندی از روش ELISA استفاده شد [۲۶] که به‌طور خلاصه به شرح زیر است:

کلیه سرم‌های گرفته شده از موش‌های ایمن شده و گروه‌های کنترل با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌ژن و رقت ۱:۱۰ از سرم در این آزمون بررسی شد. ابتدا غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌ژن (حل شده در بافر کربنات-بی‌کربنات) در پلیت ۹۶ خانه پوشش (Coat) شد (۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) و این پلیت به‌صورت شبانه در ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس پلیت با بافر TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (تریس + کلرور سدیم+ توئین ۲۰)، سه بار شستشو داده شد در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر از محلول بلوکر (Blocker Solution) (شیر خشک ۳ درصد در TBST) به همه چاهک‌ها اضافه شد و پلیت به‌مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از انجام سه بار شستشوی مجدد با TBST، ۱۰۰ میکرولیتر سرم موش که با بلوکر رقیق شده بود، در رقت ۱:۱۰ به پلیت اضافه و پلیت مذکور ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس مجدداً پلیت با TBST سه‌بار شستشو شد و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌موس (Anti mouse) کونژوگه با پراکسیداز (تهیه شده از شرکت امینسان) با رقت ۱:۳۰۰۰ به آن اضافه شد و برای ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. شستشوی نهایی ۵ بار با TBST انجام پذیرفت و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB (Tetramethylbenzidine) آماده به هر چاهک (در تاریکی) اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد (در این مرحله باید پلیت در فویل پیچیده شود و از نور دور باشد). در انتهای کار برای توقف واکنش، ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده یعنی اسید سولفوریک ۲ مولار به هر چاهک اضافه شد و میزان OD در طول موج ٤۵۰ نانومتر با دستگاه قرائت‌گر ELISA (ELISA Reader) خوانده شد.

۲-٦- سنجش سیتوکین‌ها

ایمنی سلولی با اندازه‌گیری اینترلوکین ٤ (Interleukin 4: IL-4) و IFN-γ بررسی شد. ٤ هفته بعد از آخرین تلقیح (در روز ۷۰) ۵ موش از هر گروه به‌طور تصادفی انتخاب و عمل استخراج لنفوسیت از طحال آن‌ها تحت شرایط کاملاً استریل انجام شد. بعد از تهیه سوسپانسیون لنفوسیتی [۲۷] از هر موش، ۵۰۰ میکرولیتر از آن در ۲ چاهک از پلیت ۲٤ خانه کشت داده شد. سپس سلول‌های هر دو چاهک توسط آنتی‌ژن انگل تحریک شد (به هر چاهک ۵۰ میکروگرم از آنتی‌ژن افزوده شد) و حجم سوسپانسیون هر چاهک با FBS (Fetal Bovin Serum) ۱۰ درصد + RPMI (Roswell Park Memorial Institute) به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و پلیت‌ها به‌مدت ٤۸ یا ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. پس از این مدت، سوپ‌رویی سلول‌ها به آرامی جمع‌آوری و در ویال اپندورف جمع شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت محلول رویی در مقادیر ۳۰۰ میکرولیتری در ویال‌ها تقسیم شد و از این ویال‌ها برای اندازه‌گیری سیتوکین‌های استفاده شد.

برای بررسی وجود سیتوکین‌های IL-4 و IFN-γ در سوپ سلولی لنفوسیت‌های طحالی موش‌های هر گروه از کیت R8D) Duoset ELISA Development Kit) استفاده شد و طبق دستورالعمل کیت اقدام شد و در ضمن همه نمونه‌ها به‌صورت سه‌تایی آزمایش شد تا از مقادیر به‌دست آمده از سنجش سیتوکین‌ها اطمینان حاصل شود.

www.SID.ir

Archive OF SID

۲-۷- ارزیابی آماری نتایج حاصل از آزمایش چالش با سویه RH و ایمنی هومورال و سلولی

برای ارزیابی نتایج حاصل از زمان بقای موش‌ها بعد از چالش و همچنین نتایج حاصل از سنجش IgG کل و IL-4 و IFN-γ از روش آماری غیرپارامتریک من‌ویتنی (Mann-whiteny) و کروسکال-والیس (Kruskal-wallis) استفاده شد (نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶) و گروه‌های کنترل و مورد با هم مقایسه و در نهایت نمودار نتایج نیز به کمک نرم‌افزار Excel رسم شد.

۳- نتایج

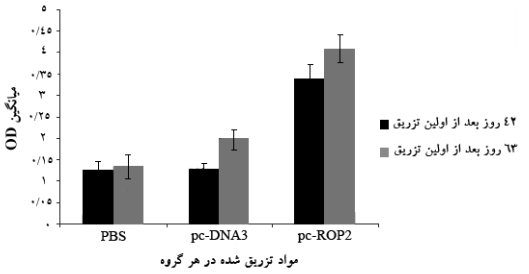
۳-۱- نتایج ساخت و بیان پلاسمید نوترکیب

نتایج مربوط به ساخت و بیان پلاسمید pc-ROP2 قبلاً ارایه شده است [۲۳].

۳-۲- نتایج بررسی ایمنی هومورال

سرم موش‌های گروه‌های کنترل و مورد در روزهای ۴۲ و ۶۳ جمع‌آوری و برای بررسی میزان آنتی‌بادی IgG کل به روش ELISA استفاده شد. همان‌طور که در نمودار ۱ نمایش داده شده است، بیشترین مقدار میانگین OD در نوبت اول و دوم خونگیری مربوط به گروه pc-ROP2 (نوبت اول: ۰/۳۳۹ ± ۰/۰۳۳۸ (میانگین ± انحراف معیار) و در نوبت دوم: ۰/۴۰۹ ± ۰/۰۳۳۵) است و بین این گروه و گروه‌های کنترل (PBS: نوبت اول ۰/۱۲۵ ± ۰/۰۲۰۷ (میانگین ± انحراف معیار) و نوبت دوم: ۰/۱۳۳ ± ۰/۰۲۷۲، pc-DNA3: نوبت اول: ۰/۱۲۷ ± ۰/۰۱۴۲ (میانگین ± انحراف معیار) و نوبت دوم: ۰/۱۹۶ ± ۰/۰۲۳۷) اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0/05$).

همچنین با توجه به نمودار ۱ این نتیجه حاصل می‌شود که میزان سطح آنتی‌بادی متعاقب واکسن‌های یادآوری و تقویت‌کننده، افزایش یافته است.



نمودار ۱ نمودار ستونی میانگین OD سطح کل IgG در سرم موش‌های تحت مطالعه در دو نوبت خونگیری

۳-۳- نتایج سنجش سیتوکین‌ها

میزان سیتوکین‌های IL-4 و IFN-γ موجود در سوپانسیون لنفوسیتی تهیه شده از طحال موش‌های هر گروه در نمودار ۲ نشان داده شده است. همچنین در جداول ۱ و۲ به‌ترتیب مقادیر میانگین ± انحراف معیار، IL-4 و IFN-γ ارایه شده است.

جدول ۱ مقایسه میانگین مقدار IL-4 در گروه‌های مختلف

شماره	گروه‌های تحت مطالعه	انحراف معیار ± میانگین OD	اختلاف معنی‌دار آماری
۱	PBS	۱۴/۳۳ ± ۲/۵۱۶۶	(۲)*
۲	pc-DNA3	۲۵/۰۰ ± ۳/۷۴۱۶	(۱)*
۳	pc-ROP2	۱۹/۶۰ ± ۳/۸۴۷۰	-

* طبق آزمون من‌ویتنی با گروه‌های داخل پرانتز اختلاف معنی‌دار ($P\leq0/05$) وجود دارد.

www.SID.ir

Archive OF SID

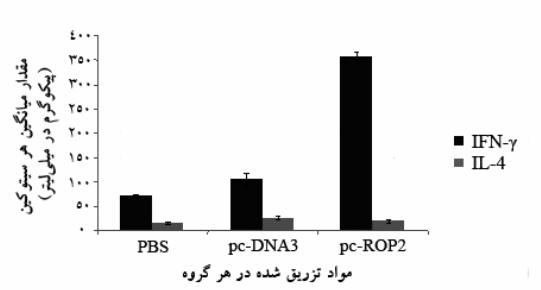
جدول ۲ مقایسه میانگین مقدارIFN-γ در گروه‌های مختلف

شماره	گروه‌های تحت مطالعه	انحراف معیار ± میانگین OD	اختلاف معنی‌دار آماری
۱	PBS	۷۱/۰۰ ± ۲/٦٤٥۷	(۳ ،۲)*
۲	pc-DNA3	۱۰٤/۰۰ ± ۱۲/۹۰۹۹	(۳ ،۱)*
۳	pc-ROP2	۳٥٥/٦۰ ± ۱۰/۸٥۳٥	(۲ ،۱)*

* طبق آزمون من‌ویتنی با گروه‌های داخل پرانتز اختلاف معنی‌دار (**P≤۰/۰٥**) وجود دارد.

با توجه به نمودار ۲ و جدول ۱ و ۲ بیشترین میانگین مقدار IFN-γ در گروه مورد یعنی pc-ROP2 و کمترین مقدار IL-4 در گروه کنترل PBS مشاهده می‌شود و همچنین بین گروه مورد و گروه‌های کنترل از نظر مقدار IFN-γ اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰٥)؛ به عبارت دیگر، پلاسمید نوترکیب pc-ROP2 قادر به تحریک و فعال‌سازی پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 (T helper) است.

از نظر مقدار IL-4، فقط بین دو گروه کنترل PBS و pc-DNA3 اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰٥) و مقدار IL-4 در گروه مورد pc-ROP2 بسیار پایین و در حد گروه کنترل PBS است که این خود تأیید دیگری بر فعال شدن پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 است.



نمودار ۲ نمودار ستونی میانگین IL-4 و IFN-γ در گروه‌های مختلف

۳-٤- نتایج چالش با سویه RH و بررسی طول عمر موش‌ها

برای بررسی طول عمر موش‌ها بعد از چالش، از سویه RH توکسوپلاسما گوندی استفاده شد و موش‌ها (در هر گروه ٦ موش وجود داشت) با $۱۰^{٤}$ تاکی‌زوئیت به‌صورت داخل صفاقی (٤ هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی) چالش شدند.

نمودار ۳، نمودار درصد بقای موش‌های گروه‌های مختلف بعد از چالش است و در جدول ۳ درصد بقا و تعداد روزهای زندگی موش‌های گروه‌های مختلف پس از چالش با ۱×۱۰^{٤} تاکی‌زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH نشان داده شده است.

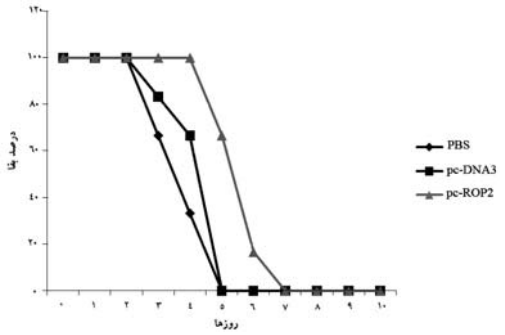
از نمودار ۳ و جدول ۳ می‌توان نتیجه گرفت که زمان بقای موش‌های گروه واکسینه شده با pc-ROP2 بیشتر از گروه‌های کنترل است و بین این‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰٥)؛ پس پلاسمید نوترکیب pc-ROP2 قادر به ایجاد یک حمایت نسبی بر علیه سویه کشنده RH توکسوپلاسما گوندی است.

جدول ۳ درصد بقا و تعداد روزهای زندگی موش‌های گروه‌های مختلف پس از چالش با ۱×۱۰^{٤} تاکی‌زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH

روز	گروه		
	PBS	pcDNA3	pcROP2
۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۲	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۳	٦٦/٦٦	۸۳/۳۳	۱۰۰
٤	۳۳/۳۳	٦٦/٦٦	۱۰۰
٥	۰	۰	٦٦/٦٦
٦	۰	۰	۱٦/٦٦
۷	۰	۰	۰
۸	۰	۰	۰
۹	۰	۰	۰
۱۰	۰	۰	۰

www.SID.ir

Archive OF SID



نمودار ۳ نمودار درصد بقای موش‌های گروه‌های مختلف بعد از چالش با 1×10^4 تاکی‌زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH

٤- بحث

DNA واکسن‌ها قادر به حفاظت از حیوانات و انسان‌ها در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و به‌ویژه انگل‌های داخل سلولی است [۲۸].

DNA واکسن‌ها امروزه بسیار مورد توجه محققین است که از دلایل مهم آن ساخت آسان، قیمت ارزان [۲۸] و توانایی آن‌ها در تولید پاسخ ایمنی طولانی مدت است [۲۹].

ایمونیزاسیون با DNA واکسن (که قادر به بیان یک یا چند ژن تعبیه شده در آن باشد) باعث القای پاسخ‌های اختصاصی ایمنی سلولی و هومورال شده [۳۰] و به‌طور ویژه در فعال کردن لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک از طریق مکانیسم وابسته به IL-12 و IFN-γ مفید است [۳۱، ۳۲]. در این تحقیق، پلاسمید نوترکیب pc-ROP2 به‌عنوان DNA واکسن ساخته و قدرت ایمنی‌زایی و توانایی اثر حفاظتی آن بررسی و آزمایش شد. نتایج تحقیق نشان داد که ایمنی‌زایی موش‌های BALB/c با ۵۰ میکروگرم از pc-ROP2 قادربه القای یک پاسخ حفاظتی نسبی برعلیه سویه کشنده (سویه RH) توکسوپلاسما گوندی است. با وجود این‌که محققین نشان داده‌اند که در موش مقدار ۱ میکروگرم از DNA پلاسمید نوترکیب برای القای پاسخ ایمنی کافی است، ولی برای داشتن یک پاسخ ایمنی مؤثر و مفید در بیشتر حیوانات، حداقل ۵۰ میکروگرم از پلاسمید نوترکیب باید تزریق شود. محققین این افزایش در مقدار پلاسمید مورد استفاده را با سطح پایین میزان بیان پروتئین در داخل سلول میزبان مرتبط می‌دانند [۳۳]. در نهایت اگر مقدار کافی از پلاسمید نوترکیب به موش‌ها تزریق شود، سطح آنتی‌بادی‌ها و سیتوکین‌ها به‌طور چشمگیری در بدن آن‌ها بالا خواهد رفت [۳۳]. نتایج تحقیق فاچادو (Fachado) و همکاران [۳٤] نیز تأییدی دیگر بر علت استفاده ۵۰ میکروگرمی پلاسمید نوترکیب در این تحقیق است.

نتایج بررسی میزان آنتی‌بادی IgG و سیتوکین‌ها در این تحقیق نشان داد که پلاسمید نوترکیب pc-ROP2 قادر به القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی است و در مقایسه با گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P<0/05$) و همچنین بررسی طول عمر موش‌ها بعد از چالش با تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندی سویه RH (نمودار ۳) نشان داد که pc-ROP2 در مقایسه با گروه‌های کنترل باعث افزایش نسبی طول عمر موش‌ها می‌شود ($P<0/05$). نتایج این تحقیق در راستای نتایجی است که لیوا (Leyva) و همکاران [۳۳] به‌دست آورده‌اند. آن‌ها نشان دادند که واکسیناسیون ۳ سویه مختلف از موش‌ها با pc-ROP2 قادر به القای پاسخ ایمنی هومورال است.

همچنین هریون (Herion) و ساودرا (Saavedra) (۱۹۹۱) [۱۸] و ساودرا (۱۹۹۱) و همکاران [۱٤] نشان دادند که پروتئین ROP2 به‌وسیله کلون‌های لنفوسیت T شناخته شده و از این طریق باعث القای پاسخ ایمنی سلولی می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی از این تحقیق بیانگر آن است که ژن کامل ROP2 کاندیدای مناسبی برای تهیه DNA واکسن به‌منظور ارتقای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی بر علیه توکسوپلاسموزیز است. همچنین برای به‌دست آوردن پاسخ‌های ایمنی قوی‌تر و طول عمر بیشتر موش‌ها می‌توان از این ژن به همراه یک یا چند ژن مؤثر دیگر از توکسوپلاسما به‌صورت کوکتل (Cocktail) یا الحاقی (Fusion) استفاده نمود. از این رو در آینده این تیم تحقیقاتی روی توانایی DNA کوکتل حاوی پلاسمید کدکننده ژن کامل ROP2 و پلاسمید کدکننده آنتی‌ژن سطحی اصلی ۱ (Major Surface Antigen 1: SAG1) در القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی و ایجاد اثر حفاظتی علیه

www.SID.ir

Archive OF SID

توکسوپلاسموزیز، مطالعاتی انجام خواهند داد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان به این وسیله از پرسنل محترم بخش تحقیقات ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از آقای دکتر صدرایی مدیر محترم گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و خانم قاسمی‌نیکو کارشناس محترم گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری می‌گردد.

٦- منابع

[1] Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. Lancet 1999; 353(9167): 1829-33.

[2] Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infec Dis 1992; 15(2): 211-22.

[3] Machado CM, Boas LS, Canto CL, Andrade Júnior HF, Castelli J, Bohringer P, Ostronoff M, Dulley F, Pannuti CS. Disseminated toxoplasmosis after BMT--report of a case. Bone Marrow Transplant 1992; 10(5): 475-8.

[4] Petersen E, Pollak A, Reiter-Owona I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol 2001, 31(2): 115-44.

[5] Cook GC. Toxoplasma gondii infection: a potential danger to the unborn fetus and AIDS sufferer. Q J Med 1990; 74(273): 3-19.

[6] Dodds EM. Toxoplasmosis. Curr Opin Ophthalmol 2006; 17(6): 557–61.

[7] Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna MC, Miska K, Sreekumar C, Kwok OC, Shen SK, Gamble HR. Prevalence of viable Toxoplasma gondii in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. J Parasitol 2005; 91(5): 1082-93.

[8] Meerburg BG, Van Riel JW, Cornelissen JB, Kijlstra A, Mul MF. Cats and goat whey associated with Toxoplasma gondii infection in pigs. Vector Borne Zoonotic Dis 2006; 6(3): 266-74.

[9] Haumont M, Delhaye L, Garcia L, Jurado M, Mazzu P, Daminet V, Verlant V, Bollen A, Biemans R, Jacquet A. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. Infect Immun 2000; 68(9): 4948–53.

[10] Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: a potential weapon against infection and cancer. Vox Sang 2001; 80(1): 12-8.

[11] Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection. Clin Microbiol Rev 1998; 11(4): 569-88.

[12] Cesbron MF, Dubremetz JF, Sher A. The immunobiology of toxoplasmosis. Res Immunol 1993; 144(1): 7-79.

[13] Saavedra R, Becerril MA, Dubeaux C, Lippens R, De Vos MJ, H©rion P, Bollen A. Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of Toxoplasma gondii. Infect Immun 1996; 64(9): 3858-62.

[14] Saavedra R, de Meuter F, Decourt JL, H©rion P. Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of Toxoplasma

www.SID.ir

Archive OF SID

gondii cloned and expressed in Escherichia coli. J Immunol 1991; 147(6): 1975-82.

[15] HÍ©rion P, HernأndezPando R, Dubremetz JF, Saavedra R. Subcellular localization of the 54-kDa antigen of Toxoplasma gondii. J Parasitol 1993; 79(2): 216-22.

[16] Sadak A, Taghy Z, Fortier B, Dubremetz JF. Characterization of a family of rhoptry proteins of Toxoplasma gondii. Mol Biochem Parasitol 1998; 29(2-3): 203-11.

[17] Martin V, Arcavi M, Santillan G, Amendoeira MR, De Souza Neves E, Griemberg G, Guarnera E, Garberi JC, Angel SO. Detection of human Toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant Toxoplasma gondii rop2 protein. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5(5): 627-31.

[18] Saavedra R, HÍ©rion P. Human T-cell clones against Toxoplasma gondii: production of interferon-gamma, interleukin-2, and strain cross-reactivity. Parasitol Res 1991; 77(5): 379-85.

[19] Jacquet A, Daminet V, Haumont M, Garcia L, Chaudoir S, Bollen A, Biemans R. Expression of a recombinant Toxoplasma gondii ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. Protein Expr Purif 1999; 17(3): 392-400.

[20] Xu D, Liew FY. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of L. major. Immunology 1995; 84(2): 173-6.

[21] Dupré L, Poulain-Godefroy O, Ban E, Ivanoff N, Mekranfar M, Schacht AM, Capron A, Riveau G. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding Schistosoma mansoni 28 kDa glutathione S-transferase. Parasite Immunol 1997; 19(11): 505-13.

[22] Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Vidal T, Fachado A, Fonte L, Izquierdo L, Infante JF, Finlay CM, Sierra G. Specific cellular and humoral immune response in Balb/c mice immunised with an expression genomic library of Trypanosoma cruzi. Vaccine 1998; 16(6): 608-12.

[23] Hosseinian Khosroshahi K, Ghaffari far F, Sharifi Z, Dalimi A. Expression of complete rhoptry protein 2 (ROP2) gene of Toxoplasma gondii in eukaryotic cell. African J Biotech 2008; 7(24): 4432-6.

[24] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 93(1): 265-75.

[25] Sasaki S, Takeshita F, Xin KQ, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. Methods 2003; 31(3): 234-54.

[26] Crowthe JR. ELISA, Theory and practice. Humana Press, New Jersey, 1995; p: 110-156.

[27] Xue M, He S, Cui Y, Yao Y, Wang H. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against Toxoplasma gondii. Parasitol Int 2008; 57(4): 424-9.

[28] Bunnell BA, Morgan RA. Gene therapy for infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1): 42-56.

[29] Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. Curr Opin Immunol 2000; 12(4): 442-7.

www.SID.ir

Archive OF SID

[30] Robinson HL. Nucleic acid vaccines: an overview. Vaccine 1997; 15(8): 785-7.

[31] Stacey KJ, Blackwell JM. Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against Leishmania major. Infect Immunol 1999; 67(8): 3719-26.

[32] Kowalczyk DW, Ertl HC. Immune responses to DNA vaccines. Cell Mol Life Sci 1999; 55(5): 751-70.

[33] Leyva R, Hérion P, Saavedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of Toxoplasma gondii. Parasitol Res 2001; 87(1): 70-9.

[34] Fachado A, Rodriguez A, Angel SO, Pinto DC, Vila I, Acosta A, Amendoeira RR, Lannes-Vieira J. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. Vaccine 2003; 21(13-14): 1327-35.

www.SID.ir