تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه لیشمانیا اینفنتوم سویه ایرانی

عزت نوری‌زاده [1*]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۶

چکیده

زمینه و هدف بیماری‌های حاصل از عفونت با انگل لیشمانیا از عوامل مهم ایجاد مشکلات بهداشتی در بسیاری از نقاط دنیا به‌ویژه در کشورهای درحال‌توسعه به‌شمار می‌روند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، به‌عنوان ابزاری باارزش برای تشخیص، درمان و تعیین ویژگی شاخص‌های آنتی‌ژنی انگل‌ها به‌کار گرفته شده‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی تکنیک‌های کاربردی تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه لیشمانیا اینفنتوم سویه ایرانی است.

مواد و روش‌ها سویه‌های استاندارد لیشمانیا اینفنتوم کشت داده شدند و از آنتی‌ژن آنها استفاده شد. موش‌های BALB/c دو بار توسط آنتی‌ژن به همراه مواد یاور فروند، داخل صفاقی تزریق شدند. سه روز قبل از ادغام سلولی، آنتی‌ژن از طریق وریدی به موش‌ها تزریق شد. لنفوسیت‌های طحال موش‌ها با میلوما SP2/0 ادغام شدند و سپس با روش limiting dilutionجداسازی مونوکلون‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها شانزده مونوکلونال آنتی‌بادی، علیه پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم به‌دست آمد که سه مورد از آن‌ها OD بیش از یک نانومتر را نشان داد و D2FV5، G5FV4و D6FIV5نامیده شدند و سپس آنتی‌بادی‌های ضدانگل لیشمانیا اینفنتوم از هیبریدهای به‌دست‌آمده، حاصل شد. این آنتی‌بادی‌ها در فاز لگاریتمی انگل، مؤثرند.

نتیجه‌گیری به نظر می‌آید که این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند در برابر سویه ایرانی پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم واکنش نشان دهند و در تشخیص بیماری کالاآزار استفاده شوند.

کلیدواژه‌ها:
آنتی‌ژن، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، پروماستیگوت، لیشمانیا اینفنتوم.

۱. مقدمه

لیشمانیاها جزو انگل‌های تک‌یاخته‌ای هستند که در مهره‌داران در سلول‌های بیگانه‌خوار به‌صورت آماستیگوت به سر می‌برند. انتقال بیماری از طریق گزش ناقل پشه خاکی صورت می‌گیرد. انگل‌ها در معده پشه خاکی به شکل تاژکدار به نام پروماستیگوت زندگی می‌کنند. بیماری‌های لیشمانیایی، طیف وسیعی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند، عفونت‌هایی با بیماری‌زایی شدید و قابل‌انتشار به‌وجود می‌آورند، به بافت‌های احشایی آسیب می‌رسانند که در صورت درمان نشدن به مرگ منتهی می‌گردد [۲،۱].

لیشمانیوز احشایی، یکی از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و حیوان است. اغلب، یک بیماری شدید و کشنده است که به‌وسیله پشه‌های خاکی جنس فلبوتوموس از سگی به سگ دیگر و از حیوان به انسان منتقل می‌شود. سگ، مخزن اصلی لیشمانیا اینفنتوم محسوب می‌شود [۲] لیشمانیا اینفنتوم، مهم‌ترین عامل لیشمانیوز احشایی نوع مدیترانه‌ای و عامل اصلی لیشمانیوز احشایی در ایران می‌باشد و سگ‌های اهلی، مخزن اصلی و پشه‌های خاکی ناقلین اصلی انگل هستند [۳]. لیشمانیا اینفنتوم در مناطق مختلف ایران از سگ، روباه، شغال و گرگ جدا شده است. سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی، نسبت به درمان دارویی، مقاومت نشان

* **نویسندهٔ مسئول: عزت نوری‌زاده**
نشانی: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی

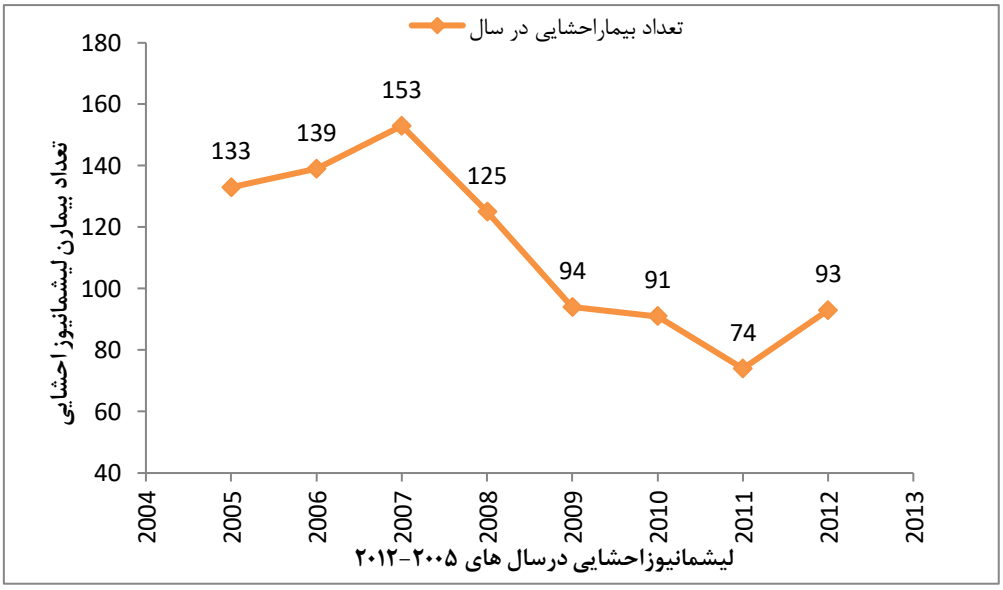
تلفن: ۰۹۱۴۴۵۴۳۴۸۱
رایانامه: nourizade@ut.ac.ir
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0001-8933-5787

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۸، شمارهٔ ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۰، ص ۳۰۲-۳۱۰
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

می‌دهد و به دلیل مقاومت نسبی سگ به انگل، زمینه برای انتشار هرچه بیشتر لیشمانیا در محیط فراهم می‌گردد [۴].

لیشمانیوز احشایی که در ایران به‌طور تک‌گیر (اسپورادیک) در تمام نقاط ایران وجود داشته است اما مناطق بومی (آندمیک) مشخصی نیز مانند کلیبر، اهر در شمال‌غرب ایران (آذربایجان شرقی) وجود دارند. در نواحی آندمیک، بیش از ۵۰ درصد از کل بیماران لیشمانیوز احشایی را کودکان زیر ۲ سال و۹۰ درصد این افراد را کودکان زیر ۱۲ سال تشکیل می‌دهند [۶،۵]. در این بیماری‌ها وضعیت ایمنی میزبان در نوع تظاهر بالینی بیمار، نقش قاطعی دارد. از میان دو سیستم ایمنی سلولی و هومورال، پاسخ‌های ایمنی سلولی، نقش بارزتری را در کنترل این بیماری بر عهده دارند. در لیشمانیوز، سرنوشت عفونت به دو عامل مهم بستگی دارد: اولین عامل، وضعیت ایمنی میزبان است و دومین عامل مهم و مؤثر در سرانجام بیماری، گونه و سویه خاص انگل است که نقش اساسی در سرنوشت عفونت دارد [۹-۷].

در سال ۱۳۲۸ برای نخستین‌بار دکتر پویا وجود کالاآزار در ایران را اعلام کرد. از سال ۱۳۲۸ تا ۱۳۴۰ بیماری کالاآزار از نقاط مختلف کشور نظیر تهران، تنکابن، آبادان، شیراز، اصفهان، اردبیل و نیشابور گزارش شد. از سال ۱۳۴۰ به بعد، موارد بیشتری از بیماری به‌خصوص در استان فارس و بین عشایر مشاهده شد [۱۱،۱۰]. در سال‌های اخیر، سازمان بهداشت جهانی، وضعیت بیماری و پیشرفت آن را ارائه کرده است (نمودار ۱).



نمودار ۱. شیوع بیماری احشایی در ایران در سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۲ (WHO TDR 2013)

شمال‌غرب و استان‌های بوشهر و فارس وجود دارد [۱۱].

در ایران حدود ۹۰٪ لیشمانیوز احشایی در استان‌های

جدول ۱. شیوع بیماری لیشمانیوز احشایی در جهان در سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۶ میلادی

کشورها	۲۰۱۶	۲۰۱۵	۲۰۱۴	۲۰۱۳	۲۰۱۲	۲۰۱۱	۲۰۱۰	۲۰۰۹	۲۰۰۸
کلمبیا	۳۷	۲۱	۳۱	۱۳	۹	۱۱	۳۴	۵۴	۳۳
اتیوپی	۱۵۹۳	۱۹۹۰	۲۷۰۵	۱۷۳۲	۲۳۸۱	۲۰۳۲	۱۹۳۶	۱۰۸۳	۱۳۵۶
کنیا	۶۹۲	۸۹۴	۸۸۰	۱۸۱	۴۵۷	۴۰۶	ND	۸۵	۲۵۸
سومالی	۷۸۱	۱۰۳۱	۱۰۴۳	۶۷۳	۳۹۴	۲۹۰	ND	۵۰۷	۵۸۳
سودان	۳۸۱۰	۲۸۲۹	۳۴۱۵	۲۳۸۹	۵۱۵۳	۷۴۱۸	۶۹۵۷	۴۸۸۰	۳۳۱۰

ND:No data Reference:The World Health Organization (WHO), 2016

شیوع بیماری لیشمانیوز احشایی، در کشورهای کلمبیا،

اتیوپی، کنیا، سومالی و سودان در سال‌های ۲۰۰۸ میلادی تا ۲۰۱۶ در حال افزایش است (جدول ۱). تا کنون کنترل این بیماری‌ها با روش‌های بهداشتی، موفقیت‌آمیز نبوده است و واکسن مؤثری نیز برای پیشگیری این بیماری‌ها وجود ندارد؛ بنابراین درمان بیماری، راه‌حل کنونی برای مبارزه با این بیماری است. اولین قدم برای درمان بیماری، تشخیص به‌موقع بیماری و افتراق آن از بیماری‌های دیگر است. با وجود اینکه روش‌های عملی خوبی برای تشخیص وجود دارد اما حساسیت این روش‌ها متفاوت است و برخی از آنها از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار نیستند. اگرچه در سال‌های اخیر شناسایی گونه‌های لیشمانیا با روش‌های مولکولی و غیره روی ژن‌های انگل در برخی از مراکز پژوهشی به کار گرفته شده است اما این روش‌ها پرهزینه است، نیاز به تجهیزات خاص دارد و در مراکز بهداشتی در شرایط محلی قابل انجام نمی‌باشد. به‌علاوه به علت وجود پلی‌مرفیسم ژنتیکی شدید در گونه‌های مختلف لیشمانیا این روش‌ها قابلیت کاربرد در آزمایشگاه‌ها را ندارند و عملاً جای خود را در آزمایشگاه‌های معمولی باز نکرده‌اند. در صورتی که استفاده از روش‌های دیگر مانند کاربرد آنتی‌بادی‌های مونوکلنال در یک کیت الایزا می‌تواند به‌راحتی در آزمایشگاه‌های معمولی قابل انجام باشد؛ لذا این تحقیق برای تهیه آنتی‌بادی مونوکلنال علیه اشکال پروماستیگوتی گونه خطرناک لیشمانیاها یعنی لیشمانیا اینفنتوم به‌منظور تشخیص کالاآزار ارائه می‌شود؛ زیرا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به‌عنوان ابزاری باارزش برای تشخیص، درمان و تعیین ویژگی شاخص‌های آنتی‌ژنی انگل‌ها به‌کار گرفته شده‌اند و در تهیه واکسن‌ها بسیار مفید هستند و می‌تواند در تولید واکسن‌های مؤثر، نقش به‌سزایی داشته باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. کشت سوش‌های لیشمانیا اینفنتوم

سوش استاندارد لیشمانیا اینفنتوم (MHOM/IR/04/IPI-UN10)جداشده از یک بیمار در ایران و نیز سوش رفرنس سازمان بهداشت جهانی (MHOM/TN/80/IPT1) در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. فرم پروماستیگوت سوش‌های مذکور نخست در محیط دو فازی (Novy-MacNeal-Nicolle) NNNتری‌ان کشت شدند و سپس به محیط کشت مایع RPMI۱۶۴۰ حاوی FBS (۱۰٪)، L-glutamine(3mg/ml)و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (100u/ml) و استرپتومایسین (100µg/ml) منتقل شد و به غلظت‌های مورد نظر رسیدند. سپس پروماستیگوت‌های کشت شده برای تهیه آنتی‌ژن به روش فریز – تاو[1] مورد استفاده قرار گرفتند. سپس آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن‌های پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم طبق رفرنس‌های [۱۶-۱۲] تهیه شد. برای این منظور، در ابتدا، سویه‌های استاندارد، کشت داده شد و آنتی‌ژن‌های *L. infantum*به‌دست آمد. سپس، موش‌های BALB / c ایمن‌سازی شدند و اندازه تیتر آنتی‌بادی سرم آنان تعیین شدند. برای تشکیل سلول هیبریدوما، سلول‌های لنفوسیتی جدا شده از طحال موش‌های ایمن‌سازی‌شده و سلول‌های میلوما به نسبت ۱۰: ۱ در حضور پلی‌اتیلن گلیکول با هم ادغام شدند. سپس برای غربالگری تک‌کلون‌های اختصاصی از روش limiting dilution استفاده شد.

۲.۲. ایمن‌سازی موش‌ها

موش‌های Balb/c ۵ تا ۶ هفته‌ای با تزریق داخل صفاقی آنتی‌ژن (به مقدار 30×10^6 انگل) به همراه یاور فروند کامل (ادجوانت کامل فروند) در ایمنی‌زایی اول، یاور فروند ناقص در ایمنی‌زایی دوم و سوم هر کدام به فواصل دو هفته تحت ایمونیزاسیون قرار گرفتند. پس از بررسی سرم موش‌ها از نظر تشکیل آنتی‌بادی با روش الایزا، آنتی‌ژن بدون یاور به‌عنوان بوستر نهایی سه روز قبل از فیوژن داخل وریدی[2] تزریق گردید [۲۳]. عیار آنتی‌بادی در سرم موش‌های ایمن شده با روش الایزا تعیین شد و موشی که عیار آنتی‌بادی در سرمش از همه بیشتر بود برای ادغام سلولی[3] انتخاب شد.

۳.۲. ادغام سلولی

از سلول‌های Sp2/0-Ag14 (IBRC C10106) برای فیوژن استفاده شد. سلول‌های لنفوسیتی جداسازی شده از طحال موش ایمن شده و سلول‌های میلوما، به نسبت ۱۰ به ۱ در مجاورت پلی‌اتیلن گلایکول (PEG) با هم ادغام شدند و سپس در محیط کشت کامل حاوی HAT (هیپوگزانتین، آمینوپترین و تیمیدین) در مجاورت ۵ درصد CO_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. پس از یک هفته، محیط HT (هیپوگزانتین و تیمیدین) جایگزین

1. Freeze thaw method
2. Intravenous
3. Fusion

محیط قبلی شد و به‌تدریج وجود سلول‌های هیبریدوما و تشکیل کلون‌های آنها در زیر میکروسکوپ معکوس ردیابی شدند. سلول‌های حاصل برای استفاده در آزمایش‌های بعدی در تانک ازت مایع نگهداری شدند.

۴.۲. انجام Limiting dilution برای ردیابی تک‌کلون‌های هیبریدوما

هیبریدوماها پس از تکثیر برای جداسازی تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی، آماده‌سازی شدند. کلون‌های مثبت از نظر تولید آنتی‌بادی اختصاصی انتخاب شدند و پس از تهیه سوسپانسیون یکنواخت با روش Limiting dilution رقت داده شدند؛ به‌طوری که در هر چاهک، یک یا نیم کلون قرار گرفت و در پلیت‌های حاوی محیط کشت کامل با بستر Feeder layerیا مکمل‌هایی مانند فاکتور رشد OPI کشت داده شدند. با این روش، تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی مونوکلنال مجزا گردید. سپس تعیین کلاس و زیرکلاس (ایزوتایپینگ) آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انجام گرفت. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS با نسخه ۱۸و از آزمون تی تست استفاده شد.

۵.۲. تعیین کلاس و زیرکلاس (ایزوتایپینگ) آنتی‌بادی‌های مونوکلونال

آنتی‌ژن به میزان $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ انگل در هر ۱۰۰ مایکرولیتر به چاهک‌های پلیت الیزا اضافه گردید و به مدت ۲۴ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. چاهک‌ها با محلول ۱٪ BSA به مدت ۲ ساعت بلاک شدند و بعد از این مدت پلیت،۳ بار با بافر PBST شستشو شد. مایع رویی هیبریدوما حاوی آنتی‌بادی منوکلونال به میزان ۱۰۰ مایکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. به مدت ۱ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. بعد از یک ساعت انکوباسیون، پلیت با بافر شستشو سه بار شسته شد.

۱۰ مایکرولیتر از آنتی‌سرم‌های مختلف IgG1 ,IgG2a (IgG2b ,IgA,) کیت سیگما، رقت ۱/۲۰۰۰ تهیه کرده، به هر چاهک اضافه شد، ۱ ساعت پلیت در ˚C ۳۷ انکوبه شد. پلیت با بافرPBST شستشو، سه بار شسته شد. ۱۰۰ مایکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه حاوی (mouse anti goat HRP) با رقت ۱/۶۰۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه و پلیت ۱ ساعت در ˚C ۳۷ انکوبه شد. پلیت با بافر PBST شستشو، سه بار شسته شد. ۱۰۰ مایکرولیتربافر متوقف‌کننده (H_2SO_4) اضافه گردید تا رنگ ثابت بماند و رنگ حاصله با دستگاه الیزا ریدر در طیف ۴۵۰ نانومترخوانده شد.

۳. یافته‌ها

۱،۳. نتایج کشت انگل‌های پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم

پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم‌های کرایو شده، پس از ذوب و انتقال به محیط کشت (Novy-MacNeal-Nicolle) NNN تری‌ان و سپس به محیط کامل بعد از رسیدن به حجم دلخواه در مرحله ایستا شمارش شدند. در حدود $۱۰^{۹}$ × ۴ انگل حاصل شد. انگل‌های به‌دست‌آمده در محیط کشت اختصاصی نگهداری شدند.

۲.۳. تهیه آنتی‌ژن پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم

در حدود $۱۰^{۹}$ × ۴ انگل از فرم پروماستیگوت‌ها حاصل شد و توسط روش فریز- تاو از آنها، آنتی ژن تهیه شد، سپس در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

۳.۳. نتایج کلنینگ سلول‌های هیبریدوما

سلول‌های مثبت هیبرید حاصل از سه فیوژن در مقایسه با سایر هیبریدها که OD بالایی داشتند انتخاب شدند به شرح زیر می‌باشند: از فیوژن سوم، هیبریدهای ; 1A4 F III 4B4 F III، 4G1 F III، 8E4 F III از فیوژن چهارم، هیبریدهای ; 3C9 FIV , 3C4 FIV , 7F6 FIV, 5D6 FIV و از فیوژن پنجم، هیبریدهای 4G5 FV , 8E6 FV, 5D2 FV , 2G8 FV; حاصل شدند. این‌ها هیبریدهایی بودند که ODبالایی را در مقایسه با سایر هیبریدهای حاصل از خود نشان دادند. در بین این‌ها سه هیبرید که بالاترین OD را داشتند (**5D2 FV** ، 4G5 FV، 5D6 FIV)، برای تکثیر انتخاب شدند و از چاهک‌های ۹۶ خانه به ۲۴ خانه منتقل شدند و به‌تدریج تکثیر یافتند و به پلیت‌های شش خانه‌ای و سپس به فلاسک‌های کوچک منتقل شدند. تعدادی از سلول‌های حاصل برای آزمایش Limiting dilution برداشته شدند و مقداری در محیط مخصوص انجماد سوسپانسه شدند و در ازت مایع نگهداری شدند. هیبریدهای مثبت حاصل از سه فیوژن که OD بیشتری دارند در جدول ۲ بیان شده‌اند.

جدول ۲. هیبریدهای مثبت حاصل از سه فیوژن که بالاترین OD را دارند

فیوژن سوم (F III)		فیوژن چهارم (FIV)		فیوژن پنجم (FV)	
نام هیبرید	OD_{450}	نام هیبرید	OD_{450}	نام هیبرید	OD_{450}
1A4 F III	۰/۷۱۹	5D6 FIV	۱/۰۶۵	4G5 FV	**۱/۱۱۰**
4B4 F III	۰/۷۴۵	3C9 FIV	۰/۹۹۸	8E6 FV	۰/۸۰۱
4G1 F III	۰/۷۴۸	3C4 FIV	۰/۷۶۹	**5D2 FV**	**۱/۶۶۰**
8E4 F III	۰/۶۹۲	7F6 FIV	۰/۹۸۴	2G8 FV	۰/۸۵۸

OD: optical density, FV: Fourth Fusion, FIV: Fifth Fusion, FVI: Sixth Fusion.
(OD_{450}) Absorbance of samples at 450 nm
Fusion: Lymphocyte cells from spleen of immunized mice and myeloma cells were fused

۴.۳. کلنینگ سلول‌های هیبریدوما باروش Limiting dilution برای ردیابی تک‌کلون‌های هیبریدوما

هیبریدوماها پس از تکثیر برای جداسازی تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی آماده‌سازی شدند. برای این منظور،کلون‌های مثبت شامل **4G5 FV** از فیوژن پنجم و5D6 FIV از فیوژن چهارم انتخاب شدند و پس از تهیه سوسپانسیون یکنواخت با روش Limiting dilution رقت داده شدند؛ به‌طوری که در هر چاهک، یک یا نیم کلون قرار گرفت و در پلیت‌های حاوی محیط کشت با بستر Feeder layer و مکمل‌هایی مانند فاکتور رشد شبیه انسولین، کشت داده شدند. با این روش، تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی مونوکلنال، مجزا شدند. نتایج تکثیر هیبریدوماها برای جداسازی تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی توسط Limiting dilution در جدول ۳ نمایش داده شده است.

جدول ۳. نتایج **Limiting dilution** برای ردیابی تک‌کلون‌های هیبریدوما

Hybrid (5D6 FIV)		**Hybrid(4G5 FV)**	
Monoclones	**OD**	**Monoclones**	**OD**
5D6 FIV3	1.531	4G5 FV6	0.889
5D6 FIV4	0.810	4G5 FV1	0.659
5D6 FIV7	1.280	4G5 FV7	0.770
5D6 FIV5	0.869	4G5 FV3	1.002
5D6 FIV2	0.917	4G5 FV5	1.699
5D6 FIV8	0.799	4G5 FV9	0.999

OD: optical density, FV: فیوژن پنجم , FIV: فیوژن چهارم
(OD450) Absorbance of samples at 450 nm
Fusion: Lymphocyte cells from spleen of immunized mice and myeloma cells were fused.

با توجه به جدول۳، تک‌کلون‌های 5D6 FIV3، 5D6 FIV7، 4G5 FV3 و 4G5 FV5 میزان تیتر آنتی‌بادی (OD) بیشتر از یک دارند. از بین این سلول‌ها، تک‌کلونهای 5D6 FIV3 و 4G5 FV5 که در مقایسه با چهار تک‌کلون دیگر بیشترین OD را داشتند برای انجام آزمایش‌ها بعدی و تعیین ایزوتایپ (Isotype Determination) انتخاب شدند.

۵.۳. نتایج ایزوتایپmAbs (منوکلن‌های 5D6 FIV3 و 4G5 FV5)

نتایج ایزوتایپ تک‌کلون‌های 5D6 FIV3 و 4G5 FV5 در جدول۴، نشان داده شده است. دو تک‌کلون با OD بالاتر (5D6 FIV3 و 4G5 FV5) برای تعیین کلاس و زیرکلاس استفاده شد. با توجه به جدول ۴ ایزوتایپ 5D6 FIV3 و4G5 FV5 نشان داد که mAbs تولید شده علیه پروماستیگوت *L. infantum* در فیوژن سلولی متعلق به کلاس IgG و زیرکلاسIgG2b هستند.

جدول ۴. ایزوتایپ تک‌کلونهای 5D6 FIV3 و 4G5 FV5

mAbs	4G5 FV5				5D6 FIV3			
Class	Anti mous IgG			Ig	Anti mous IgG			Ig
sub-class	IgG1	IgG 2a	IgG 2b	IgA	IgG 1	IgG 2a	IgG 2b	IgA
OD	0.13	0.183	1.601	0.12	0.133	0.414	1.511	0.154
B	0.011	0.014	0.083	0.031	0.096	0.099	0.039	0.033

(OD_{450}): Absorbance of samples at 450 nm B: Blank (BSA); OD: optical density; mAbs: monoclonal antibodies; Ig G, A: Immunoglobulin G, A; Ig G 2a, 2b: Immunoglobulin G 2a, 2b; FIV: Fifth Fusion; FVI: Sixth Fusion.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه در سال‌های اخیر، شناسایی گونه‌های لیشمانیا با استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR در برخی مراکز تحقیقاتی انجام می‌شود اما این روش‌ها نمی‌توانند پاسخگوی نیاز آزمایشگاه‌های معمولی و برنامه‌های بهداشتی باشند؛ زیرا گران هستند و به تجهیزات ویژه احتیاج دارند و در اکثر آزمایشگاه‌های معمولی، کاربرد ندارند. به نظر می‌رسد که استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی برای تشخیص لیشمانیوز و تشخیص خصوصیات بیوشیمیایی و ایمونوپاتولوژیک انگل، مناسب‌تر است.

در زمینه انجام فیوژن در مجموع ۱۶ هیبرید موردقبول بودند که در میان این‌ها ۳ کلون OD بیشتری داشتند. در مقایسه با کار برخی از محققان که با انجام فیوژن در نهایت تنها کمتر از چهار کلون اختصاصی علیه لیشمانیای موردآزمایش پیدا کرده‌اند نتایج ما از نظر تعداد کلون به‌دست‌آمده دارای اختلاف می‌باشد و این اختلاف را می‌توان به دلیل گسترده بودن طیف مراحل انجام آزمایش‌های ما و هم‌چنین استفاده گسترده از فاکتورهای مختلف رشد سلول دانست که در مطالعه آنان، به این گستردگی صورت نگرفته است. به‌منظور کنترل بیماری، لازم است تا مطالعات بر روی اشکال پروماستیگوتی این انگل صورت گیرند و از این جهت نیازمند مقادیر زیادی پروماستیگوت می‌باشیم که در این تحقیق در حدود ۴×۱۰^{۹} سلول انگل *L.infantum* استفاده شده است.

ازمزایای مهم دیگری که فرم پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم برای مطالعه دارد این است که کشت پروماستیگوت در In vitro به‌آسانی انجام‌پذیراست؛ لذا در سال‌های گذشته، تحقیقات بسیار زیاد و دامنه‌داری که روی لیشمانیوز انجام گرفته همگی با استفاده از پروماستیگوت‌های کشت داده شده در Invitro بوده است [۱۷،۱۸]. ولی از آنجا که فرم پروماستیگوت، فرمی است که در بدن پشه خاکی، رشد و تکثیر می‌یابد و فرم آماستیگوت، شکلی از انگل است که در زخم روی بدن میزبان مهره‌دار مستقر شده و بیماری ایجاد می‌کند، به‌راحتی نمی‌توان نتیجه تحقیقات در مورد پروماستیگوت را به فرم آماستیگوت تعمیم داد [۱۸]. این مسئله با یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های آماستیگوت از نظر خصوصیاتی مثل پروتئین‌های سطحی با فرم پروماستیگوت قابل بررسی بوده است.

به نظرمی‌رسد دانستن تفاوت‌ها و شباهت‌های آنتی‌ژنیکی بین آماستیگوت‌ها و پروماستیگوت‌ها در تهیه واکسن‌ها بسیار مفید است و می‌تواند در تولید واکسن‌های مؤثر نقش به‌سزایی داشته باشد. همچنین با شناخت کافی از مراحل گوناگون چرخه سلولی انگل می‌توان به تفاوت‌های آنزیمی و مسیرهای مختلف متابولیکی هر مرحله از انگل پی برد و داروهایی طراحی کرد که مرحله خاصی از انگل را مورد هدف قرار داده و مؤثرتر از داروهای قبل عمل کنند و نیز برای ساخت مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌های هدف می‌تواند شناسایی شود.

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پروماستیگوت‌ها، پروتئین‌هایی با وزن ملکولی خاص دارند که برای این مرحله از انگل اختصاصی است و آماستیگوت‌ها نیز به همین صورت پروتئین‌های اختصاصی برای خود دارند و نیز آماستیگوت‌های حاصل از محیط کشت و آماستیگوت‌های بافتی با یکدیگر مشابه هستند و بدین‌ترتیب باندهایی که فقط در پروماستیگوت‌ها مشاهده گردیده، هدف خوبی برای انجام آزمایش‌های گوناگون، طراحی واکسن، داروهای جدید و تولید مونوکلونال آنتی‌بادی ضدانگل هستند [۱۹،۲۰].

در سال ۱۹۸۳ Greenblatt و همکارانش مونوکلونال آنتی‌بادی علیه لیشمانیا ماژور را ساختند که با گونه‌های دیگر نیز واکنش نشان می‌داد. در سال ۱۹۸۴ میلادی ژافه و همکاران موفق شدند مونوکلونال آنتی‌بادی اختصاصی

علیه لیشمانیا دونووانی را تهیه کنند [۲۱]. در سال ۲۰۰۴ میلادی Froes و همکارانش مونوکلونال آنتی‌بادی علیه آماستیگوت‌های لیشمانیا شاگاسی را تهیه کردند [۲۲]. در بررسی حاضر نیز ما موفق شدیم آنتی‌بادی مونوکلنال علیه پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم تهیه کنیم. با این حال با اطلاعات موجود در شبکه، تاکنون مونوکلونال آنتی‌بادی علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفنتوم سویه ایرانی تهیه نشده است. با توجه به موارد فوق، در این زمینه نتایج ما با نتایج مطالعات آنان که تولید مونوکلونال آنتی‌بادی علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا است مطابقت دارد.

برای تعیین کلاس، زیرکلاس و ایزوتایپ، مونوکلونال آنتی‌بادی‌هایی که بیشترین جذب را داشتند انتخاب شدند. بین نتایج ما و داده‌های گزارش‌های برخی از محققان در خصوص ایزوتایپ مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها، اختلاف وجود داشت. این عدم‌تطابق ممکن است مربوط به تفاوت سویه‌های آنان و نوع آنتی‌ژن مورداستفاده در این بررسی‌ها باشد. ساختن آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفنتوم از اهمیت خاصی برخوردار است که برخی از آنها عبارتند از: تایپینگ یا تعیین گونه لیشمانیا که از نظر اپیدمیولوژی از ارزش بالایی برخوردار می‌باشد، تشخیص مستقیم لیشمانیا در زخم و نیز در شناسایی آنتی‌ژن‌های کاندید برای ساخت واکسن یا به‌عنوان حامل دارو به سلول‌های هدف می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد [۲۳]. استفاده از آنتی‌بادی برای درمان و ایمونوتراپی انگل لیشمانیا امروزه به دلیل یافت شدن مکانیسم اصلی ایمنی در برابر انگل (ایمنی سلولی) مد نظر قرار گرفته است و اکثر مطالعات موجود، تنها مطالعه و بررسی تأثیر آنتی‌بادی در شرایط in vitro و به‌صورت بررسی میزان کاهش یا بلوک کردن ورود انگل به درون ماکروفاژها می‌باشد [۲۴].

در مجموع، در این تحقیق، آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفنتوم سویه ایرانی تولید شد. به نظر می‌رسد این آنتی‌بادی‌ها، واکنش‌گری خوبی علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفنتوم سویه ایرانی باشند و می‌توان از آن در آزمون‌های مختلفی نظیر الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری برای کاربردهای تحقیقاتی و تشخیصی استفاده کرد.

پیشنهادها

باتوجه به اینکه مکانیسم اصلی مقاومت در برابر انگل لیشمانیا، ایمنی سلولی می‌باشد پیشنهاد می‌شود از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به‌دست‌آمده برای خلوص آنتی‌ژن‌های مربوطه از پروماستیگوت‌ها و استفاده از آنها برای یافتن یک مولکول مناسب کاندید برای واکسن استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح پژوهشی با کد ۲۴۵۴ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی سپاسگزاریم.

تمامی اصول اخلاقی درباره حیوانات در این تحقیق به‌طور کامل اجرا شده است. علاوه بر این، توصیه‌های دستورالعمل شورای اروپا (IR.ECD.REC.1986.609) در مراحل آزمایشی کاملاً مورد توجه قرار گرفته است.

References

[1]. Ayele A., Seyoum Z. Review on canine leishmaniasis, etiology, clinical sign, pathogenesis, treatment and control methods. Global Veterinaria. 2016;17(4):343–352.
[2]. Gashaw enbiyale, demeke Debalke, endris Aman, birhanu Eedmim. Review on Leishmaniasis. Journal of American Science. 2018;142: 67-73.
[3]. Zarati S, Sobhan Fayez S., Hamid Sedighian H. Production of new a nanovaccineand evaluation ofit'sEffectsonbalb/c ratswith L.major. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2015 ; 21(6) : 1182-93.
[4]. Macconkey S.E.,Lopez A.,Shaw D.,Calder J. leishmanial polyarthritis in a dog. Canine Vet J. 2002; 43: 607-60.
[5]. Gavgani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebali M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for humaninfection with Leishmania infantum. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67(5):511-5.
[6]. Sundar S. Visceral leishmaniasis. Tropical Parasitology.2015; 5(2): 83–85.
[7]. Mcgwire B C , a.r. Satoskar A R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. An International Journal of Medicine . 2013; 107:7–14.
[8]. Uliana S R , Trinconi C T, Coelho A C , Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges, Parasitology. 2018; 145(4): 464–480.
[9]. Oryan A , Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.2016 ; 9(10): 925–932.
[10]. Hosseini SM, Hatam GR, Ardehali S. Characterization of Leishmania isolated from unhealed lesions caused by leishmanization. East Mediterr Health J. 2005;11(1-2):240-3.
[11]. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser. 2010;949:1-202.
[12]. Mandira, M., Anindita, B. and Swadesh, D. Monoclonal antibody affinity purification of a 78 KDa membrane protein of Leishmania donovani of Indian origin and its role in host –parasite interaction. Indian. Academy. Science.2002; 27:665-672.

[13]. Schmitz K, Geisslinger G, Tegeder I. Monoclonal antibodies in preclinical EAE models of multiple sclerosis: A systematic review. Int J Mol Sci. 2017;18:1–18.
[14]. Tomita M, Tsumoto K: Hybridoma technologies for antibody production. Immunotherapy. 2011; 3: 3 71–380.
[15]. Abdalla H S, Eltahir A G K, Samia A O, Hamid S A. Innovative serum-free medium for in vitro cultivation of promastigote forms of Leishmania species. Parasitology International. 2008;57: 138–142.
[16]. Jervis S, Chapman L. A. C. , Dwivedi S, et al.Variations in visceral leishmaniasis burden, mortality and the pathway to care within Bihar, India.Parasites & Vectors.2017; 10(1): 601.
[17]. Fadili K, Messier N, Leprohon P. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes. Antimicrob Agents Chemoter. 2005; 49 (5):1988-1993.
[18]. [18]. Tavaresa J b, Ouaissic A. , P.K.T. Lind, Differential effects of polyamine derivative compounds against Leishmania infantum promastigotes and axenic amastigotes. Int J Parasitol.2005; 35 :637–646.
[19]. Nasereddin A, Schweynochb C, Schonianb G, Jaffe JL. Characterization of Leishmania (Leishmania) tropica axenic amastigotes. Acta Tropica. 2010;113:72–79.
[20]. Nejad-Moghaddam A, Abolhassani M. Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing a common 57-kDa antigen of Leishmaniaspecies. Iran Biomed J. 2009; 13:245-51.
[21]. Justin L , The History of Monoclonal Antibody Development - Progress, Remaining Challenges and Future Innovations. Annals of Medicine and Surgery.2014; 3(4):113-116.
[22]. Froes AM, dos Santos CVD, Penha-Filho ML,Teixeira MCA et al. Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-Leishmania chagasi amastigot antibodies of different animal species. Veterinary Immunol Immunopathol. 2004;99:135–141.
[23]. Chaves C S, Soares, DD, Da Siva R P, Saraiva EM. Characterization of the species-and stage specificity of two monoclonal antibodies against Leishmania amazonensis. Exp Parasitol. 2003; 103:152-159.
[24]. Thaı´s G.V. Silveira1, Erika Suzuki, Helio K.Takahashi, Anita H. Inhibition of macrophage invasion by monoclonal antibodies specific to Leishmania (Viannia) braziliensis promastigote and characterization of their antigens braziliensis. Int. J. Parasitol. 2001;31:1451–1458.

Preparation of Monoclonal Antibodies against proamastigote Leishmania infantum strain in Iran

Ezzat Nourizadeh[1*]

1. Department Dpartment of Microbiology, College of Science ,University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Abstract

Introduction: Leishmania parasitic infections are the important causes of health problems in many parts of the world, especially in developing countries. Monoclonal antibodies have been used as valuable tools for the detection, treatment and characterization of the antigenic markers of parasites. This study through applicable techniques aims to produce mAbs against Iranian type of Leishmania(L). infantum.

Materials and Methods: Standard strains were cultured and their antigens were used. BALB/c mice were injected with freeze-thawed promastigote twice together with Freund adjuvant. Three days before cell-fusion, the antigen through vein was injected into the mice. Then the mice were killed. After that their spleen lymphocytes were mingled with myeloma SP2/0. In the next step, the isolation of monoclones was performed by limiting dilution method.

Results: 16 mAb against promastigote form of L.infantum parasite were obtained ,3 of which showed optical density (OD) more than 1nm, designated as 5D2 FV, 4G5 FV and 5D6 FIV. Then, anti-promastigotes L.infantum mAbs were obtained from these hybrids. These antibodies are effective in the logarithmic phase of the parasite.

Conclusion: It seams these antibodies can demonstrate reaction against Iranian strain of promastigotes L. infantum and can be employed in the diagnosis of kalazar disease.

Received: 2020/01/20
Accepted: 2020/03/16

Keywords: Antigens, Monoclonal Antibodies, Proamastigote, Leishmania Infantum.