مقاله پژوهشی

تولید نانوواکسن جدید و بررسی اثرات آن در موش BALB/c مبتلا به لیشمانیا ماژور

سمیه ذراتی[۱]، سبحان فایضی[۲]، حمید صدیقیان[۳]،عباسعلی ایمانی فولادی[۴] ، مهدی مهدوی[۵] ،رضا فلک[۶]
نرگس تهرانی[۷]، فاطمه طباطبایی*[۸]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات ، تهران، ایران
[۲] گروه مایکوباکتریولوژی وتحقیقات ریوی ، انستیتو پاستور ایران ،تهران،ایران
[۳] مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی ،دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...،تهران،ایران
[۴] مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی ،دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...،تهران،ایران
[۵] گروه ایمونولوژی،انستیتو پاستور ایران ،تهران،ایران
[۶] گروه ایمونولوژی ،دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی ایران
[۷] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، ، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات ، تهران، ایران
[۸] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران ، تهران ، ایران

نشانی نویسنده مسوول: تهران ، بزرگراه همت ، دانشگاه علوم پزشکی ایران،دانشکده پزشکی ،گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دکترفاطمه طباطبایی
E-mail: Tabatabaei.f@iums.ac.ir

وصول:۹۳/۴/۱، اصلاح:۹۳/۶/۵، پذیرش:۹۳/۷/۱۳

چکیده

زمینه و هدف : لیشمانیا نیوزیک بیماری عفونی مهم است؛ که توسّط انگل تک یاخته ای از جنس لیشمانیا ایجاد می شود.علی رغم تلاش‌های زیاد تاکنون واکسن مؤثّری علیه لیشمانیا مورد تأیید قرار نگرفته است . یکی از مزایای اصلی استفاده از DNA واکسن ها القای بیان آنتی ژن ها بدون تغییر در ساختار پروتئین و خاصیت آنتی ژنسیته آنهاست. دراین مطالعه برای افزایش ایمنی زایی DNA واکسن کاندید از یک نانو ادجوانت استفاده شد و ایمنی زایی آن در مدل موشی BALB/c مادّه متفاوت مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این پژوهش با در نظر گرفتن مطالعات قبلی مبنی بر آنتی ژنتیک بودن پروتئین TSA لیشمانیا در مدل موشی و انسانی ، نانو واکسنی جدید متشکّل از پلاسمید نوترکیب TSA به همراه نانوذرّه (PMMA) poly (methylmethacrylate) به عنوان ادجوانت طراحی گردید و ایمنی زایی آن در مدل موشی BALB/c مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از ۳ بار تزریق عضلانی نانوواکسن به مقدار ۱۰۰ میکروگرم ، بوستر پپتیدی به صورت زیر پوستی تزریق و پس از ۳ هفته موش‌ها مورد چالش با انگل قرار گرفتند. در نهایت پاسخ های تکثیری به روش Brdu و پاسخ های ایمنی سلولی (تولید IL-4,IFN-γ) با روش ELISA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: یافته های پژوهش نشان داد که نانوواکسن جدید قادر به القای ترشح هردو سایتوکین بوده ولی برتری با پاسخ سلول های Th1 و تولید IFN-γ می باشد.

نتیجه گیری: نتایج بررسی ها مشخص کرد که نانوواکسن کاندید می تواند جهت مطالعات و بررسی های بعدی در تهیه واکسن علیه لیشمانیا مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی :*TSA ، لیشمانیا ماژور، (PMMA) poly(methylmethacrylate) ،پاسخ ایمنی.*

مقدمه

لیشمانیوز یکی ازبیماری های قابل انتقال توسّط بندپایان است که عامل آن تک یاخته داخل سلولی از خانوادهTrypanosomatidae و جنس Leishmania است و در ردیف بیماری‌های مشترک انسان و حیوان (زئونوزها) قرار دارد. این بیماری هم اکنون در ۸۸ کشور جهان و در سراسر ٦ قاره اندمیک بوده و در مجموع ۳۵۰ میلیون نفر را تهدید می کند (۱-٤).لیشمانیا از طریق نیش پشه خاکی مادّه آلوده به میزبان مهره دار منتقل می شود. این بیماری به دو شکل معمول جلدی و احشایی وجود دارد که لیشمانیا نیوز جلدی درایران به دو فرم شهری(خشک) و روستایی(مرطوب) بوده و هر کدام دارای کانون های متعدّدی است(۵). با وجود تلاش‌های زیادی که جهت تهیه واکسن مناسب و مؤثّر علیه لیشمانیا شده هنوز واکسن مناسب برای انسان تهیه نشده است. از جمله این واکسن ها می توان به واکسن های کشته شده ، واکسن های زنده ضعیف شده، واکسن های دستکاری شده ژنتیکی ، واکسن های DNA اشاره کرد(۲) . امروزه تحقیقات زیادی بر روی DNA واکسن ها همراه با ادجوانت های متفاوت به عنوان مثال IL-12 جهت ایمنی زایی علیه لیشمانیا انجام شده و از ژن های کد کننده آنتی ژن های مختلف انگل مانند , LACK , gp64 , TSA LmSTI1 جهت تولید واکسن استفاده می شود(۲, ٦, ۷). DNA واکسن ها در مقایسه با واکسن های زیرواحدی پروتینی آسان تر و ارزان تر تولید شده (۲) و در ضمن این واکسن ها نیازی به زنجیره سرد جهت انتقال ندارند (٤).همچنین مشخص شده است که واکسیناسیون با این نوع واکسن ها موجب القای پاسخ ایمنی سلولار سلول‌های Th1(+CD4) و Tc (T سیتوتوکسیک) شده و استفاده از این فرم واکسن ایمنی پایدار و طولانی را به دنبال خواهد داشت(۲). پروتئین (Thiol – specific TSA antioxidant) یک آنتی ژن ایمونولوژیک قوی در هر دو مرحله پروماستیگوت (تاژکدار متحرک) و آماستیگوت (فاقد تاژک) انگل است. این پروتئین 22.1KD و600bp بوده همچنین ۲۰۰ آمینواسید داردو ژن آن بر روی کروموزوم شماره ۱۵ قرار دارد. پروتئین TSA لیشمانیا در هر دو سیستم انسانی و موش آنتی ژنتیک است. این آنتی ژن ایمنی ویژه و بالایی علیه تعداد زیادی اپی توپ های انگل ایجاد می کند. مطالعات ژن TSA این ژن را به‌سعنوان بهترین کاندید برایDNA Vaccine نشان داد. این امر به دلیل القای ایمنی پایدار و طولانی مدّت توسّط TSA و تیتر بالای آنتی بادیIgG2a , IgG1 وهمچنین IFN- γ می باشد. در واقع این ژن از ایمونولوژیک ترین ساختارهای لیشمانیاماژور است .به این دلیل در چندین روش تشخیصی و برای تهیه واکسن نوترکیب علیه لیشمانیا مورد توجّه قرار گرفته است(۸) . نانوذرّات ، ذرّات پلیمری در مقیاس نانو (1-1000nm) بوده که کاربردهای درمانی و پیشگیری کننده دارند، از آن جمله می توان به استفاده از آنها به‌عنوان ادجوانت همراه با واکسن ها و یا حامل های دارویی اشاره کرد(۹, ۱۰). مزایای استفاده از نانوذرّات نیز متعدّد بوده که از جمله می توان به تولید ساده و آسان آنها ، روند کند تجزیه پذیری ، ایمن بودن از نظر سمیّت و عدم مشاهده اثرات جانبی حین استفاده ازآنها اشاره کرد(۹, ۱۱). PMMA نانوذرّه ای که از میان ٢٤ ادجوانت استفاده شده برای واکسن HIV-2,split بیشترین تیترآنتی بادی را به دنبال داشت؛ در حالی‌که هیچ عارضه ای ناشی از سمّی بودن آن مشاهده نشده است(۱۲). استفاده از این ادجوانت نیز به‌همراه واکسن های subunit آنفولانزا منجر به پاسخ ایمنی طولانی مدّت و پایدار گردید(۱۱) . بنابراین، با توجّه به مزایای استفاده از نانوذرّات به‌عنوان ادجوانت در این تحقیق سعی بر این است که یک نانوواکسن جدید علیه لیشمانیا ماژور طراحی شده و از نظر پاسخ‌های ایمنی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش ها

استخراج پلاسمید: در این مرحله، استخراج

پلاسمید بیانی pcDNA3 که حامل ژن مورد نظر (TSA) است از باکتری های *E. coli* سویهDH5α ترانسفورم شده صورت گرفت .این کار به کمک کیت مخصوص استخراج پلاسمید کیاژن طبق پروتکل خاص کیت این عمل انجام شد. پس از استخراج پلاسمید در مقیاس کم با روش هضم آنزیمی حضور پلاسمیدها موردتأییدقرار گرفت. پس از آن، جهت استخراج انبوه پلاسمید کیت گیگا استخراج پلاسمید عاری از اندوتوکسین کیاژن مورد استفاده قرار گرفت . شایان ذکر است که پلاسمید نوترکیب مذکور قبلاً کلون شده و تمامی مراحل کلونینگ وبیان ژن طی شده است و صحت پلاسمید مورد نظر در مطالعات قبلی به اثبات رسیده بود.

ساخت نانوذرّه: برای تهیه نانو واکسن پس از تخلیص پلاسمید DNA آن را با کمک پلیمر مذکور به‌صورت نانوذرّه در آورده، بدین شکل که ابتدا نانوذرّه را به اصطلاح شیمیایی۱ میلی مول در محلول ریخته شده و سپس به آن مادّه فعال کننده گروه‌های هیدروکسیل مثل اتیل دی متیل آمین پروپیل کربو آمید(EDAC) به مقدار ۱۰ میلی مول به اضافه شد. پس از نگهداری آن در دمای اتاق درون ظرف یخ به مدّت ۱۰ دقیقه ، پلاسمید نوترکیب استخراج شده به حجم یک میلی لیتر و با غلظت مشخص به آن اضافه شد. واکنش به مدّت ۱ شبانه روز در اتاق سرد انجام شد. سپس برای خالص سازی از کیسه دیالیز استفاده شد. در نهایت سایز و بار نانوواکسن نیز اندازه گیری شد و به اپتیمم میزان خود رسید. در مرحله بعد آزمایشات مربوط به کنترل کیفی نانوذرّه شامل اندازه و بار سطحی آن انجام شد.

ایمنی زایی موش‌ها : با توجّه به سوابق مطالعاتی در زمینه ایمنی زایی علیه لیشمانیوزیس و حسّاس بودن موش سفید آزمایشگاهی (BALB/c) به پروماستیگوت های لیشمانیاماژور ، این حیوان به عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی در این تحقیق انتخاب شد. بدین منظور تعداد۹٤ سر موش (BALB/c) ماده Inbread از انستیتو پاستور کرج خریداری شد.آنها به پنج گروه تقسیم شدند: ۱- نانو واکسن TSA، ۲- DNA واکسن TSA،۳- PMMA، ٤- پلاسمید pcDNA3 ,٥ – PBS.گروه ۱ و۲ شامل ۲۰ سر موش(گروه تست) و گروه۳ ،٤و٥ شامل ۱۸ سر موش(گروه کنترل)بودند. وزن همه موش‌ها تقریباً یکسان بود (حدود ۱۸ گرم). آنها در قفس های مجزا قرار گرفتند. تعداد موش‌ها با توجّه به اهمیّت گروه‌های واکسینه شده و احتمال مرگ و میر موش‌ها همچنین بودجه در نظر گرفته شده برای خرید حیوان آزمایشگاهی پس از مشورت با مشاور آماری جهت انجام آزمون‌های آماری در نظر گرفته شد. سنّ این موش ها ۸ –٦ هفته بوده و در بخش اتاق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ایران در دمای ۲۲–۲۰ درجه سانتی گراد و دارای تهویه مناسب نگهداری شدند. جهت ایمنی زایی موش‌ها DNA واکسن کاندید به تنهایی و به همراه نانو ذرّهPMMA در ۳ نوبت، به فاصله ۳ هفته و با دوز ۱۰۰ میکروگرم و به‌صورت داخل عضلانی در عضله ٤ سر ران تزریق شد. همچنین پس از سه بار تزریق DNA واکسن به موش‌ها بوستر پپتیدی در ادجوانت فروند ناقص در دوز ۲۰ میکروگرم و به‌صورت زیر پوستی تزریق شد سرکار خانم نرگس خباز زاده طهرانی دانشجوی ارشد میکروبیولوژی واحد علوم تحقیقات واکسن پپتیدی TSA نیز پپتیدی ۲۲کیلو دالتونی را سنتزکرد. این واکسن پس از تخلیص و طی آزمایشات تأییدی در اختیار ما قرار گرفت.

کشت انگل و چالش با انگل: در این تحقیق از سویه استانداردایرانی *L*eishmania major تهیه شده از انستیتو پاستور ، که در تهیه واکسن در ایران استفاده می شود و دارای کد بین المللی MRHO/IR/75/ER است، استفاده شد. سویه فوق در لوله های حاوی محیط کشت دو فازی ریخته شده و سپس لوله های کشت به انکوباتور ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد منتقل شد. برای تولید انبوه انگل انتقال به محیط RPMI1640 لازم است که از انگل‌های مرحله ایستا استفاده شود .به منظور کشت انگل

در محیط مایع، زمانی که انگل در محیط دو فازی به تعداد زیاد تکثیر یافت. مقداری از مایع رویی(فاز مایع) محیط حاوی انگل برداشته و به حجم کمی از محیط مایع تهیه شده اضافه شد. به منظور آماده سازی محیط مایع برای کشت انگل به آن به میزان ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاو غیر فعّال شده و ۱۰۰ واحد پنی سیلین در mL و ۱۰۰ میکرو گرم استرپتومایسین در mL اضافه شد. ظروف حاوی کشت انگل به انکوباتور ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد منتقل و هر روز با میکروسکوپ معکوس کنترل شد. زمانی‌که تعداد انگل به میزان زیادی رسید و در آستانه ورود به فازایستا بود محیط مایع غنی به آن اضافه گردید. این کار پیوسته انجام شد تا انگل به میزان مورد نیاز رسید .در نهایت برای چاش با انگل بعد از ۳ هفته از طی شدن مراحل واکسیناسیون ، تعداد ۱×۱۰۶ پروماستیگوت *L. major* در فاز ایستا در حجم 0.1ml در محیط کشت RPMI داخل سرنگ کشیده و به میزان 0.1ml از این محلول به قاعده دم به صورت داخل جلدی تزریق شد.

بررسی پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها به روش Brdu: برای بررسی پاسخ تکثیری اختصاصی آنتی ژن ، پس از طی شدن مدّت زمان ۳ هفته از تزریق آخر واکسن و همچنین پس از چالش با انگل ، موش‌ها نخاعی شده و در الکل هفتاد درجه غوطه ور شده تا استریل گردد. سپس در زیر هود لامینار و در شرایط استریل طحال از بدن خارج شده و در پلیت استریل درون بافر PBS سرد قرار گرفتند.سپس کمک ته سرنگ به آرامی له گردیده و به کمک پی پت پاستور به صورت سوسپانسیون در آمد. سوسپانسیون مذکور دو بار در PBS سرد و دور ۳۰۰g و دمای ٤ درجه سانتی گراد شست و شو به مدّت ده دقیقه شده و به رسوب به دست آمده بافر لیز کننده گلبول قرمز به حجم ۵ ml اضافه نموده و به مدّت ۵ دقیقه در مجاورت یکدیگر بودند ، دراین مدّت گلبول های قرمز لیز گردید.جهت خارج نمودن سلول ها از شوک اسموتیک به آنهامقدار ۵ ml محیط RPMI-1640+FBS 5% اضافه شد و دور g 300 ودمای ٤ درجه سانتی گراد شست و شو داده شد. مجدداً در محیط کشت سوسپانسیون شده و به مدّت نیم ساعت در یخچال ٤ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا توده بافتی رسوب نماید.مقداری از مایع رویی که حاوی سلول بدون رسوب بافتی بود،جدا شد و دور g 300 و دمای ٤ درجه سانتی گراد شست و شو داده شد .رسوب به دست آمده سپس سوسپانسیون شده و یک نمونه از آن با رنگ تریپان بلو رنگ شده و به کمک لام نئوبار شمارش گردید و زیست پذیری سلول مشخص شد. در نهایت در محیط RPMI-1640 کامل به تعداد ۲×۱۰٦ سلول در میلی لیتر سوسپانسیون شده و از سوسپانسیون سلولی به دست آمده به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر حفره پلیت ۹٦ خانه ای کشت داده شدند. آنتی ژن با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر اضافه شد ، هم چنین از سلول تنها به عنوان کنترل منفی و PHA به غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت اضافه شد . حجم نهایی تمام حفرات ۲۰۰ میکرو لیتر بوده و پس از کشت ۷۲ ساعته در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 به هر حفره ۲۰ میکرولیتر از ماده Brdu اضافه گردید و 18 ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و۵ درصدCO2 قرار داده شد . پس از طی شدن مدّت زمان مذکور پلیت را سانتریفیوژ نموده و در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد خشک گردید و با استفاده از بافر دناتوره کننده سلول‌ها در عرض ۳۰ دقیقه نفوذ پذیر شدند. سپس به میزان ۱۰۰µl به آن آنتی بادی کونژوگه ضدّ Brdu اضافه گردید. پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه ، پلیت ٤ بار شست و شو داده شد. سوبسترای TMB اضافه گردید. پس از گذشت ۳ تا ۵ دقیقه واکنش با اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ مولار متوقّف شد و بلافاصله میزان OD در طول موج 450 nm قرائت گردید.نتایج پاسخ تکثیری به صورت اندیکس تحریک با توجّه به کنترل هر نمونه از تست(جذب سلول‌های تحریک نشده تقسیم بر جذب

سلولهای تحریک شده) ارایه شد.

بررسی الگوی پاسخ سایتوکاینی(IFN-γ،IL-4): جهت بررسی پاسخ الگـوی سـایتوکاینی از سوسپانسـیون سلولی به‌دست آمده در محیط کشت سلولی RPMI+FBS 10% سوسپانسیونی به تعداد 4×10^{6} cell/ml تهیه شـد و در پلیت ٢٤ خانه ای کشت داده و با آنتی ژن اختصاصـی تحریک شد. در هر حفره 8×10^{6} cell/2ml محیط کشـت قرار گرفت و به مدّت ٤٨ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجـه به همـراه ٥ درصـد CO2 کشـت داده شـد و پـس از ٤٨ ساعت سوپ روئی جمع آوری شد. سـنجش سـایتوکاینی بـا کمـک کیـت مخصـوص الایـزای سـایتوکاین موشـی (Mabtech,Sweden) انجام گرفت و گـزارش بـر حسـب پیکوگرم در میلی لیتر ارایه گردید.

ارزیابی تعداد انگل در طحال: ٣ موش از هر گروه ٧ هفته پس از چالش با انگل کشته شدند. طحال موش‌ها بریده شد وزن شد ودر ٤ سی سی محیط RPMI 1640 همراه با FBS(20%) و جنتامایسین (0/1%) هموژنیزه شد. تحت شرایط استریل در پلیت ٩٦ خانه ای از ١ تا 10^{-10} رّت بندی شد. پس از ٧ روزانکوبه در ٢٦ درجه سانتی گراد با میکروسکوپ اینورت ٤٠Xحضور یا فقدان پروماستیگوت متحرّک در هر چاه ثبت شد. تیتر انتهایی آخرین رقّتی بود که حدّاقل یک انگل زنده در آن مشاهده می شد. تعداد انگل در هرمیلی گرم از بافت بدین طریق محاسبه شد:

Parasite burden :-log 10 (parasite dilution /tissue weight)

بررسی آماری داده‌ها : از تمامی داده های مربوط به هر آزمـایش میـانگین بـه دسـت آورده شـد. سـپس از میانگین های به دست آمده در آنالیز آماری استفاده گردید. نتایج به‌دسـت آمـده از طریـق نـرم افـزار آمـاری SPSS . روش One Way Anova ، آزمـونLSD مـورد تجزیـه وتحلیل قرار گرفت .حدود اطمینـان ٩٥٪ بـوده و عـدد P کم تر از ٠/٠٥ به مفهوم معنی‌داری بوده است.

یافته ها

به منظور بررسی پاسخ های تکثیری لنفوسیت هـا از تست Brdu استفاده گردید . نتایج پاسخ هـای تکثیـری نشان داد که قبل از تزریـق بوسـتر پپتیـدی ، تزریـق نـانو واکسن کاندید پاسخ های تکثیری لنفوسـیت‌هـا را طـور معنی داری نسبت بـه گـروه DNA واکسـن(P=٠/٠١٤) و گروه‌های کنترل (P<0.0001) افزایش داده اسـت. بعـد از تزریق بوستر پپتیدی گروه تست نـانو واکسـن نسـبت بـه گروه تست DNA واکسن (P=0.337) اختلاف معنی داری را نشان نداد؛ در حالی‌که نسـبت بـه گـروه‌هـای کنتـرل

جدول ١: بررسی پاسخ تکثیری لنفوسیت ها

شماره گروه	نام گروه	قبل از بوستر پپتیدی		بعد از بوستر پپتیدی		بعد از چالش با انگل	
		اندیکس تحریک	SD	اندیکس تحریک	SD	اندیکس تحریک	SD
١	DNA Vaccine-test	٢/٨٣٨٠	٠/١٥٠٦	٣/٠٧٦٨	٠/٢٥٩٣	٤/٦٨٦١	٠/٢٠٧٤
٢	Nanovaccine	٣/٣١٠٣	٠/٢٤٩٠	٣/٥٥٣١	٠/١٧٣٠	٤/٤٠٧١	٠/٣٢٧٤
٣	pcDNA3-control	١/٥٤٣٧	٠/١٦٢١	١/٣٧٥٠	٠/٣١٣٦	١/٠٤١٨	٠/٢٠٥٤
٤	PMMA -control	١/٣٤٥٦	٠/٣٥٦٧	١/١٠٩٥	٠/٢٤٠١	١/١٤١٠	٠/٠٦٦٤
٥	PBS-control	١/٥٥٦٣	٠/٣٣٧٣	١/١١٨٤	٠/١٩١٤	١/٢٠٥٤	٠/٢١١٥

جدول ٢: نتایج سایتوکاین IFN-γ بر حسب pg/ml در گروه های تجربی

شماره گروه	نام گروه	قبل از بوستر پپتیدی		بعد از بوستر پپتیدی		بعد از چالش با انگل	
		میزان IFN-γ بر حسب pg/ml	SD	میزان IFN-γ بر حسب pg/ml	SD	میزان IFN-γ بر حسب pg/ml	SD
١	DNA Vaccine-test	١٨١/٩٣٨٥	٣٦/٦٣٨٠	٦٨٧/٦٥٢٩	٣٩/٣١١٥	١٥٣/٨٤٦١	٦٢/٣٣٢٠
٢	Nanovaccine	٢٧٧/٣٩٧٧	٦٠/٧٤٧١	٥٤٥/٤٩٣١	٩١/٧٥١٢	٣٩٠/٨٧٠٠	١٨/٦١٦٦
٣	pcDNA3-control	٧٢/٥٥٣٢	٤٢/٤٨٧٥	١٤١/٦٦٦٧	٥٣/٣٤٥٢	٦٠/٢٨٧١	٦/١١٢١
٤	PMMA -control	١٢٧/٥٥٠٠	٤٤/٥٩١٢	١٦٥/٣٣٣٣	٥٠/٠٦١٠	٨٠/٦٦٦٧	٢٤/٢١٨٣
٥	PBS-control	١٠٧/٣٣٣٣	٣/٣٨٣٧	١٥٧/٠٠٠٠	٢٢/٠٠٠٠	٦٠/١٣٣٣	٤٤/٩٤٤١

اختلاف معنی داری مشاهده شد (P<0.001). بعد از چالش با انگل افزایش پاسخ تکثیری لنفوسیت ها درگروه تست DNA واکسن نسبت به گروه نانو واکسن دیده شد؛ منتهی این افزایش معنی دار نبود (P=0.549). این در حالی است که بین گروه‌های تست و کنترل اختلاف معنی داری مشاهده شد(P<0.0001). گروه‌های تست DNA واکسن و نانو واکسن قبل از تزریق بوستر پپتیدی نسبت به بعد از تزریق بوستر پپتیدی افزایش معنی داری نشان ندادند (P>0.631) در حالی که در گروه DNA واکسن بعد از تزریق بوستر پپتیدی نسبت به مرحله بعد از چالش با انگل اختلاف معنی داری مشاهده شد(P=0.001). این اختلاف در بین گروه نانو واکسن بعد از تزریق بوستر و بعد از چالش با انگل معنی دار نبود (P=0.189).در بین گروه‌های کنترل نیز اختلاف معنی داری بین این سه مرحله دیده نشد(P>0.068). (جدول و شکل:۱)

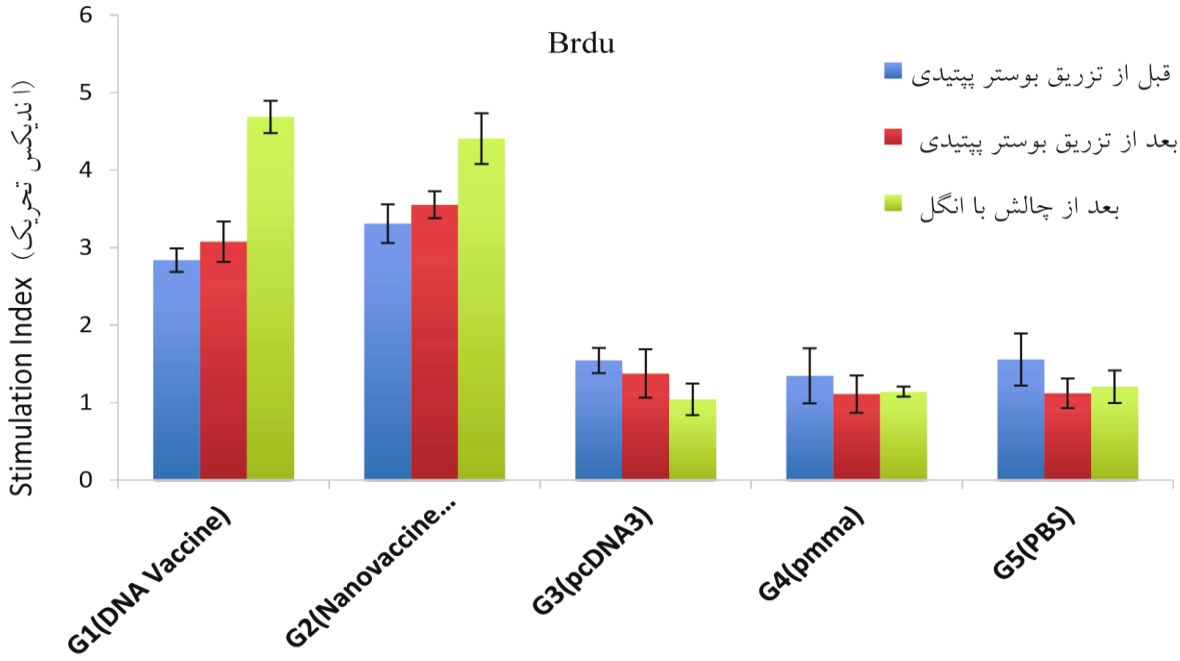
بررسی سطح سایتوکاین اینترفرون گاما در گروه‌های تجربی قبل از تزریق بوستر پپتیدی نشان داد که تزریق نانوواکسن به طور معنی داری نسبت به گروه تست دیگر(P=0.036) و گروه‌های کنترل (P<0. 005) فراوانی لنفوسیت های تولید کننده اینترفرون گاما را افزایش داده است .این اختلاف بین گروه تست DNA واکسن و گروه‌های کنترل(P>0.088) و همچنین بین گروه‌های کنترل معنی دار نبود(P>0.513).یافته ها نشان می دهد که بعد از تزریق بوستر پپتیدی گروه تست واکسن DNA نسبت به گروه نانو واکسن و گروه‌های کنترل افزایش سطح اینترفرون گاما را به‌دنبال داشته است.این افزایش در مورد گروه تست معنی دار نبود(P=0.234) ؛ در حالی که این امر نسبت به گروه‌های کنترل معنی دار بود(P<0.001).همچنین گروه تست نانو واکسن نیز نسبت به گروه های کنترل افزایش معنی داری را نشان داده است(P<0.017). بعد از چالش با انگل نیزگروه نانو واکسن نسبت به گروه تست DNA واکسن و گروه های کنترل افزایش معنی داری را نشان داده است(P<0.001).اختلاف بین گروه تست DNA واکسن با گروه‌های کنترل(P>0.138) و همچنین بین گروه‌های کنترل نیز معنی دار نبود(P>0.779). در هر دو گروه تست نیزافزایش معنی دار سطح اینترفرون گاما بعد از تزریق بوستر پپتیدی مشاهده شد(P=0.001) در ضمن بین گروه های تست بعد از تزریق بوستر و بعد از چالش با انگل نیز کاهش معنی داری دیده شد (P<0.041). اختلاف بین گروه کنترل pcDNA3 در هر سه مرحله نیز معنی دار نبود (P>0.077) در حالی که مقایسه دو گروه کنترل دیگر قبل از چالش وبعد از چالش با انگل اختلاف معنی داری

جدول ۳: نتایج IL-4 در گروه های تست و کنترل

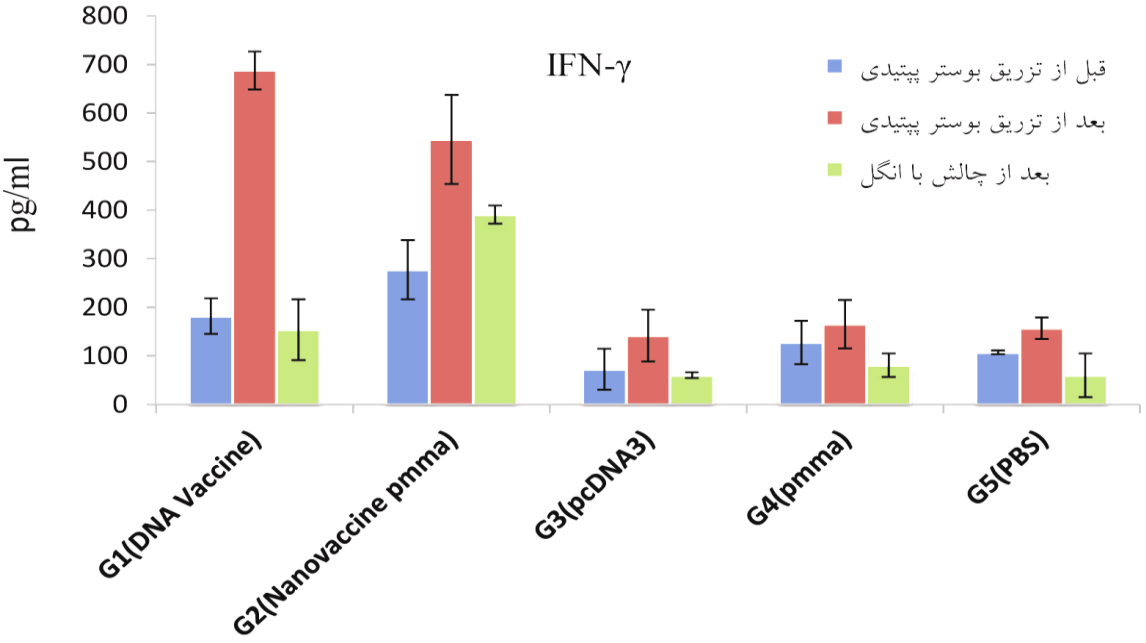
شماره گروه	نام گروه	قبل از بوستر پپتیدی		بعد از بوستر پپتیدی		بعد از چالش با انگل	
		میزان IL-4 بر حسب pg/ml	SD	میزان IL-4 بر حسب pg/ml	SD	میزان IL-4 بر حسب pg/ml	SD
۱	DNA Vaccine-test	۷۵/۱۷۲۷	۸/۵۶۱۳	۸۷/۹۵٤٤	۱۲/۰٤۳٤	۶۹/۶۲۳٤	۷/۶۳۹۳
۲	Nanovaccine	۱۳٤/۳۱۸۳	۱۱/۳۸٤۵	۱۱۰/۳۱۷۲	۱۰/٤۵۷۳	۷۰/۸۵۲۰	۷/۰۳۷۲
۳	pcDNA3-control	٤۳/۹۵۰۳	۱۲/۶۱۳٤	۶۸/۶۳۵۵	۹/۹۳۹٤	۷۰/۶۸٤۵	۰/۸۲۷۹
٤	PMMA -control	۶۶/۲۹۳۸	۹/۰۷٤۰	۶۷/۳۱۸۳	۰/۲۰۷۰	۷۰/۹۷۷۲	۳/۷۲۵۶
۵	PBS-control	۶۵/۸۵٤۷	۰/۷۳۱۸	۷۹/۰۲۶۷	۱۵/۹۳۷۲	٤۸/۵۸٤۹	۰/۶۲۰۹

جدول ٤: نتایج تعداد انگل در هر میلی گرم از بافت طحال پس از هفت هفته چالش با انگل

شماره گروه	نام گروه	تعداد انگل	SD
۱	DNA Vaccine-test	۵/۸۱۵۰	۰/۰۹۱۹
۲	Nanovaccine -test	٤/۸۱۵۰	۰/۰۹۱۹
۳	pcDNA3-control	۶/٤۳۵۰	۰/۰۷۷۸
٤	PMMA -control	۶/۶۷۳۳	۰/۰۹۱۹
۵	PBS-control	۷/۶۳۰۰	۰/۱۱۳۱



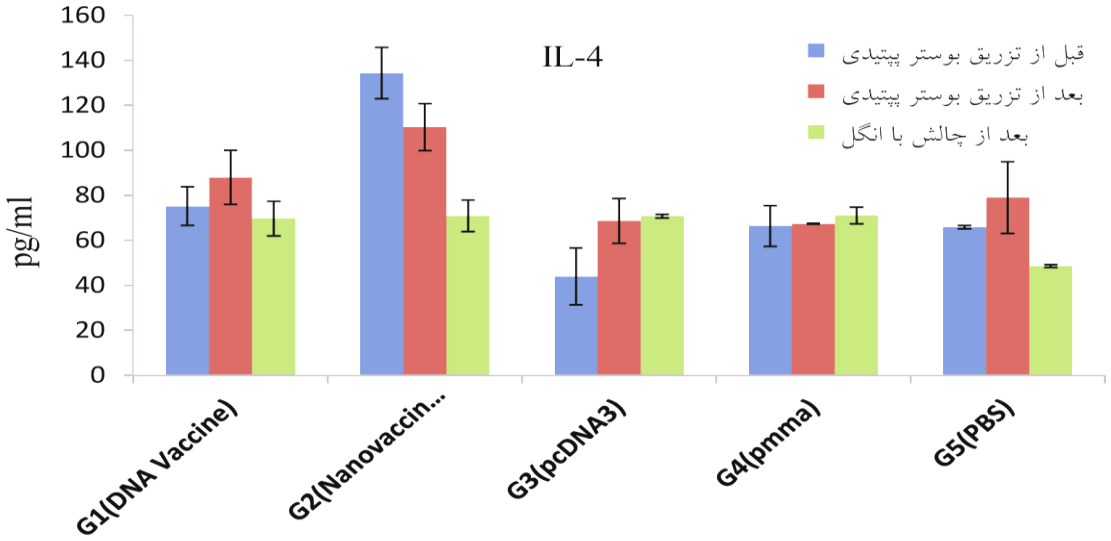
نمودار۱: بررسی پاسخ های تکثیری لنفوسیت ها



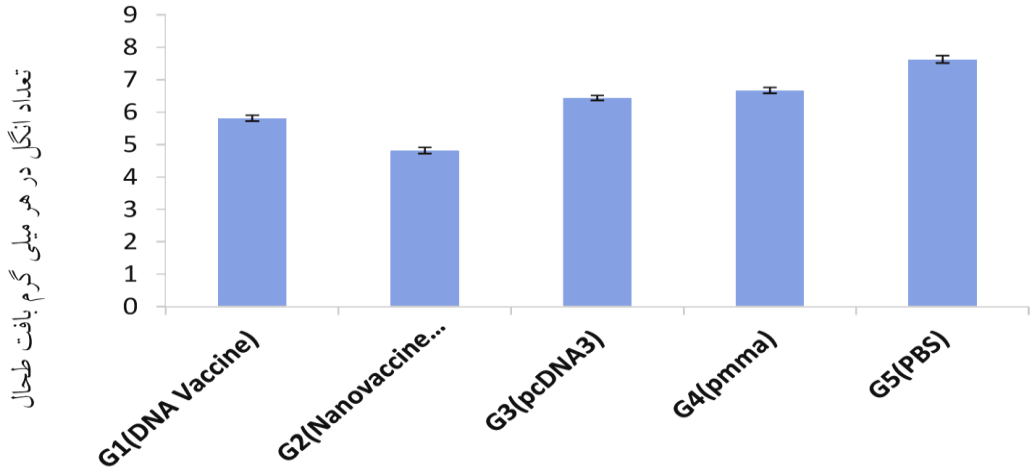
نمودار ۲: نتایج مربوط به سایتوکاین اینترفرون گاما در گروه های تست و کنترل.

را نشان داد (P<0.001).(جدول وشکل:۲)

بررسی نتایج سایتوکین IL-4 پس از تزریق DNA واکسن و نانوواکسن، افزایش معنی دار IL-4 را در گروه تست نانوواکسن نسبت به گروه تست DNA واکسن و گروه های کنترل نشان داد (P<0.0001). در گروه تست DNA واکسن نسبت به گروه های کنترل PMMA و PBS اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P>0. 879). این در حالی است که نسبت به گروه های کنترل pcDNA3 این اختلاف معنی دار بود(P=0.016) .در ضمن بین گروه های کنترل نیز اختلاف معنی داری دیده نشد (P>0. 149). بعد از تزریق بوستر پپتیدی در گروه تست نانوواکسن نسبت به گروه DNA واکسن (P=0.023) و گروه های کنترل



نمودار ۳: نتایج مربوط به سایتوکاین اینتر لوکین ٤ در گروه های تست و کنترل



نمودار ٤: نتایج تعداد انگل در هر میلی گرم از بافت طحال پس از هفت هفته چالش با انگل

(P<0.025) اختلاف معنی داری مشاهده شد. این اختلاف بین گروه DNA واکسن و گروه های کنترل معنی دار نبود (P>0. 092). در این مورد نیز بین گروه های کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P>430). بعد از چالش با انگل نیز بین گروه های تست DNA واکسن ، نانوواکسن و گروه های کنترل PMMA و pcDNA3 اختلاف معنی داری دیده نشد(P>0. 733). در حالی که این اختلاف با گروه کنترل PBS معنی دار بود(P<0.011). مقایسه بین گروه DNA واکسن قبل و بعد از بوستر پپتیدی نشان از افزایش معنی دار میزان IL-4 بعد از تزریق بوستر پپتیدی داد (P=0.025). همچنین بین گروه تست DNA واکسن بعد از تزریق بوستر پپتیدی و بعد از چالش با انگل اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P=0.001). در گروه نانوواکسن نیز اختلاف معنی داری بین تزریق نانوواکسن به تنهایی و به بعد از تزریق بوستر پپتیدی (P=0.116) و همچنین بین گروه نانوواکسن بعداز تزریق بوستر پپتیدی و پس از چالش با انگل (P=0.065) دیده نشد.(جدول و شکل :۳)

نتایج بررسی بار انگل در طحال موش ها بعد از هفت هفته چالش با انگل حاکی از این است که گروه‌های تست نانو واکسن و DNA واکسن کاهش معنی داری نسبت به گروه‌های کنترل دارند(P<0.0001).این اختلاف نیز بین بین دو گروه تست DNA واکسن و نانو واکسن معنی دار بود(P<0.0001).(جدول و شکل:٤)

بحث

در این پژوهش از ژن TSA لیشمانیا ماژور درون پلاسمید pcDNA3 به عنوان DNA واکسن و به همراه ادجوانت PMMA به عنوان نانو واکسن جهت بررسی ایمنی زایی استفاده شد. پروتئین TSA مشابه آنتی اکسیدانت ویژه تیول در یوکاریوت هاست. مطالعات گذشته نشان داده که این آنتی ژن در هردو سیستم موش و انسان آنتی ژنیک بوده و منجر به ایجاد ایمنی بالا و طولانی مدّت می گردد(۱۳-۱۵). نتایج این تحقیق نیز القای خوب پاسخ های ایمنی را به دنبال استفاده از این توالی نشان داد .علاوه بر این مطالعات گذشته نشان داد که استفاده از نانو ذرّات به عنوان ادجوانت موجب تحریک و افزایش پاسخ ایمنی سلولی (۱۶-۱۸) و همچنین موجب القای بیشترین تیتر آنتی بادی اختصاصی و پاسخ ایمنی بهتری نسبت به بقیه ادجوانت ها شده است(۱۲). از سوی دیگر بررسی ها نشان دادکه این ذرّات خیلی آهسته تجزیه شده است. بنابراین، به مدّت طولانی به سیستم ایمنی بدن عرضه می شوند (۹). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که استفاده ازاین ادجوانت موجب تحریک و بهبود پاسخ های ایمنی شده است. جهت بررسی پاسخ‌های تکثیری در این پژوهش از روش Brdu با توجّه به حساسیّت و دقّت بالای آن استفاده گردید.یافته ها در این پژوهش نشان داد که تزریق نانو واکسن کاندید قبل از تزریق بوستر پپتیدی موجب افزایش معنی دار پاسخ های تکثیری نسبت به گروه‌های DNA واکسن و گروهای کنترل شده است. پس از تزریق بوستر پپتیدی در گروه نانو واکسن اختلاف معنی داری با گروه‌های کنترل مشاهده شد. علاوه بر این افزایش پاسخ تکثیری در گروه نانو واکسن نسبت به DNA واکسن دیده شد؛ ولی، این اختلاف معنی دار نبود. چالش با انگل نیز موجب القایس پاسخ تکثیری لنفوسیت ها و اختلاف معنی دار گروه‌های تست نسبت به گروه های کنترل گردید.این نتایج با توجّه به ایمنی زایی توالی واکسن کاندید با قابلیّت تحریک پاسخ ایمنی(۱۹) و استفاده از نانوذرّه PMMA به عنوان ادجوانت(۱۱, ۲۰) دور از انتظار نبود. بنابراین، نتایج حاصل از پژوهش به ما نشان داد که استفاده از نانوذرّه PMMA در نقش ادجوانت می تواند در القای پاسخ های تکثیری لنفوسیت ها مؤثّر باشد. در این تحقیق دو سایتوکاین IL-4 و IFN-γ مورد ارزیابی قرار گرفتند، تا شیفت پاسخ‌های ایمنی مورد قضاوت قرار گیرد.عفونت لیشمانیایی در موش یکی از دو زیر گروه‌های سلولی CD+4 یعنی Th2,Th1 را فعّال می کند. به این معنی که پاسخ Th1 با بهبودی و پاسخ Th2 با عفونت منتشر ارتباط دارد. سلول‌های Th1 در القای ترشح سایتوکین ها یی مانند IFN-γ نقش دارند و IFN-γ حاصل از این سلول‌ها قوی‌ترین سایتوکین فعّال کننده ماکروفاژهاست .از سویی تولید و فعّال شدن سایتوکاین هایی نظیر IL-4, IL-10 به‌ویژه در موش BALB/c حسّاس به بیماری منجر به عدم کنترل بیماری و مرگ حیوان می شود. زیرا، این سایتوکین ها مستقیم و غیر مستقیم از راه مهار اینترفرون گاما از فعّال شدن ماکروفاژ ها جلوگیری می کنند(۲۱, ۲۲).بررسی سطح سایتوکین IFN-γ در مورد پژوهش ما افزایش معنی دار این سایتوکین را درگروه نانو واکسن کاندید در هر سه مرحله (قبل از تزریق بوستر پپتیدی ،بعد از تزریق بوستر پپتیدی ،بعد از چالش با انگل) نسبت به گروه‌های کنترل نشان می دهد.قبل از تزریق بوستر پپتیدی و بعد از چالش با انگل نیز افزایش سطح IFN-γ نسبت به گروه تست DNA واکسن به شکل معنی داری دیده شد.در ضمن افزایش مقدارIFN-γ بعد ازتزریق بوستر پپتیدی در هر دو گروه تست نسبت به قبل از تزریق بوستر مشاهده گردید که با توجّه به استراتژی استفاده از یاد آور پپتیدی دور از انتظار نیست. مطالعات گسترده ای نشان می دهد که DNA واکسن ها و واکسن های پروتئینی نوترکیب استفاده شده در مورد لیشمانیا القاءIFN-γ را به خوبی تحریک می کنند(٤, ۲۲). بنابراین، واکسن مورد مطالعه می تواند

کاندید مناسبی برای این انگل باشد. علاوه بر این نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ادجوانت PMMA منجر به القای سطح IL-4 نسبت به گروه تستDNA واکسن وگروه‌های کنترل شده است. با توجّه به این که این سایتوکین نقش مهمّی در تنظیم سطحIFN-γ در عفونت های ناشی از لیشمانیا داراست(۲۱)؛ بنابراین، استفاده از این ادجوانت در طراحی واکسن علیه لیشمانیا می تواند در کنترل عفونت مؤثّر باشد. نتایج کل بررسی الگوی سایتوکینی (Th2,Th1) نشان داد که این ادجوانت موجب القای هردو سایتوکین IFN-γو IL-4 شده ولی شدّت الگوی Th1نسبت بهTh2 بیشتر است. نتایج بررسی بار انگل نشان می دهد که بار انگل در هر میلی گرم از طحال موش های دریافت کننده نانو واکسن اختلاف معنی داری نسبت به گروه تست دیگر و گروه‌های کنترل را داراست. مطالعات و یافته های گذشته نیز نشان از کاهش بار انگل در طحال به دنبال استفاده از DNA واکسن ها (۱, ۲) و همچنین به‌کارگیری نانوذرّات به عنوان ادجوانت(۲۳،۲٤،٦) در تهیه واکسن علیه لیشمانیا داده است.بنابراین، استفاده از ادجوانت نانو در کناواکسن های ژنی می تواند به حذف انگل کمک کند. نتایج کلّ تحقیق حاضرنشان داد که نانوواکسن کاندید دارای قدرت ایمنی زایی در مدل موشی می باشد؛ به همین دلیل می تواند به عنوان کاندیدی برای مطالعات بعدی مطرح شود.

قدردانی و تشکر

از بخش انگل شناسی و قارچ شنا سی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران ودانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرّس و گروه ویروس شناسی انستیتو پاستور به سبب همکاریشان در انجام این مطالعه تشکر می نماییم.

References

1. Bolhassani A1, Gholami E, Zahedifard F, Moradin N, Parsi P, Doustdari F, Seyed N, Papadopoulou B, Rafati S.Leishmania major: Protective capacity of DNA vaccine using amastin fused to HSV-1 VP22 and EGFP in BALB/c mice model. Exp Parasitol. 2011;128(1):9-17.
2. Ahmed SB, Touihri L, Chtourou Y, Dellagi K, Bahloul C. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant Leishmania (Leishmania) major antigens confers full protection in BALB/c mice. Vaccine. 2009;27(1):99-106.
3. Danesh-Bahreini MA, Shokri J, Samiei A, Kamali-Sarvestani E, Barzegar-Jalali M, Mohammadi-Samani S. Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing Leishmania superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice. Int J Nanomedicine. 2011;6:835-42.
4. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Vaccine. 2008;26(14):1709-24.
5. Ghaffarifar F, Jorjani O, Sharifi Z, Dalimi A, Hassan ZM, Tabatabaie F, Khoshzaban F, Hezarjaribi HZ. Enhancement of immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete LACK and TSA genes against Leishmania major. APMIS. 2013;121(4):290-8.
6. Mutiso JM, Macharia JC, Mutisya RM, Taracha E. Subcutaneous immunization against Leishmania major - infection in mice: efficacy of formalin-killed promastigotes combined with adjuvants. RevInst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(2):95-100.
7. Rafati S, Ghaemimanesh F, Zahedifard F. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against Leishmania major infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. Vaccine. 2006;24(16):3290-7.
8. Ghaffarifar F, Tabatabaie F, Sharifi Z, Dalimiasl A, Hassan M Z, Mahdavi M. Cloning of a Recombinant Plasmid Encoding Thiol-Specific Antioxidant Antigen (TSA) Gene of Leishmania majorand Expression in the Chinese Hamster Ovary Cell Line. Malays J Med Sci: MJMS. 2012;19(1):15-9.
9. O'Hagan DT. Methods in Molecular Medicine , Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols: Humana Press; 2000. 105-7.
10. Kreuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. J Anat. 1996;189 (Pt 3):503-5.
11. Kreuter J. Nanoparticles as adjuvants for vaccines. Pharm Biotechnol. 1995;6:463-72.

12. Stieneker F, Kersten G, van Bloois L, Crommelin DJ, Hem SL, Lower J, Kreuter J. Comparison of 24 different adjuvants for inactivated HIV-2 split whole virus as antigen in mice. Induction of titres of binding antibodies and toxicity of the formulations. Vaccine. 1995;13(1):45-53.
13. Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, Reed SG, Grimaldi G Jr.Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. Infect Immun. 2001;69(6):4103-8.
14. Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against Leishmania major infection in susceptible BALB/c mice. Infect Imun. 2002;70(6):2828-36.
15. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. Infect Immun. 1998;66(7):3279-89.
16. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine. 2007;25(19):3752-62.
17. Look M, Bandyopadhyay A, Blum JS, Fahmy TM. Application of nanotechnologies for improved immune response against infectious diseases in the developing world. Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(4-5):378-93.
18. Foumani MG, Asadpour L, Azizi Saraji AR, Sharifat Salmani A, Aghasadeghi MR. Adjuvants and Their Mechanisms of Action. J Ardabil Univ Med Sci. 2012;12(3):276-91. [Persian]
19. Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends Parasitol. 2005;21(5):244-9.
20. Voltan R, Castaldello A, Brocca-Cofano E, Altavilla G, Caputo A, Laus M, Sparnacci K, Ensoli B, Spaccasassi S, Ballestri M,et al. Preparation and characterization of innovative protein-coated poly(methylmethacrylate) core-shell nanoparticles for vaccine purposes. Pharm Res. 2007;24(10):1870-82.
21. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nat Rev Immunol. 2002;2(11):845-58.
22. Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. Indian J Exp Biol. 2009;47(6):412-23.
23. Badiee A, Heravi Shargh V, Khamesipour A, Jaafari MR. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. Vaccine. 2013;31(5):735-49.
24. TehraniNKh, Mahdavi M, Imanifooladi AA,Tabatabaie F. Survey Protein Vaccine Formulated with MontanideISA 70 effects following Immunization and AfterChallenge with Leishmaniamajor,Biosciences Biotechnology Research Asia. 2014; 11(1): 53-60.

Production of new a nanovaccineand evaluation of it'sEffects onbalb/c ratswith L.major

Somayeh Zarati.,
MSc, Biology Dept., Sciences & Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Sobhan Fayez.,
Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Hamid Sedighian.,
Applied Microbiology, Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

AbasaliImani Fouladi.,
Applied Microbiology, Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Mahdi Mahdavi.,
Immunology Dept, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Reza Falak.,
Department of Immunology , Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran

Narges Tehrani.,
MSc, Biology Dept., Sciences & Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

FtemehTabatabai.,
Parasitology and Mycology Dept., School of medicine, Iran University of medical sciences, Tehran, Iran

Received:22/06/2014**, Revised:**27/08/2014**, Accepted:**05/10/2014

Correspondence Author:
FatemehTabatabaie,
School of medicine, Iran
University of medical sciences,
Tehran, Iran
E-mail: Tabatabaei.f@iums.ac.ir

Abstract

Background: Leishmaniasis is a major infectious disease caused by protozoan parasites of the genusLeishmania.Despite of many efforts have been madeno effective vaccineagainst Leishmania infectionhas been approved yet.The major advantage of DNAvaccine isto induce the expression of antigens, which are unaltered in their protein structure and antigenicity. In this study, in order to increase immunity, thecandidate DNA vaccine has been supplemented with nano-adjuvant and its immunogenicity was tested on BALB/c rats.

Materials and Methods: Considering other studies that have demonstratedLeishmania TSA protein is antigenic in both murine and human systems, in this study a new nanovaccinecontaining TSA recombinant plasmid and poly(methylmethacrylate) (PMMA) nanoparticles (as an adjuvant) was designed. After three intramuscular injection of nanovaccine (100 µg),the recombinant TSA protein(20 µg) was injected subcutaneously.3 weeks later,animal were infected by Leishmania major.Finally lymphocyte proliferation and cellular immune responses (IFN-γ,IL-4 prodution) were evaluated byusinigBrdu and ELISA methods.

Results: Theresultsof this study showed that the new nanovaccine was capable of inducing both cytokines secretion,but predominant Th1 immune response characterized by IFN-γ production compared to control groups.

Conclusion: Results revealed that, current candidate nanovaccine has potency for future studies to prepare vaccine against Leishmania.

Keywords: *TSA,Leishmania major, Poly (methylmethacrylate), Immune response*