

دانشور پزشکی

مقایسه اثر واکسیناسیون BCG استنشاقی با تزریق زیرپوستی بر تولید نیتریک اکساید در ماکروفازها و میزان نرفتگی انگل در بدن موش BALB/c آلوده به لیسمانیا ماژور

نویسندگان: سارا صعودي¹، دکتر احمد زواران حسینی^{2*}، دکتر
سیما رافتی³، دکتر رضا هاشمی فشارکی⁴، دکتر کسری
اشعایلنیا⁵ و سید محمود هاشمی¹

1. دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
2. استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
3. استاد، آزمایشگاه ایمنی‌شناسی مولکولی و تحقیقات واکسن، انستیتو پاستور ایران
4. استاد، گروه تک‌یاخته‌شناسی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی
5. استادیار، گروه تک‌یاخته‌شناسی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی

* نویسنده مسؤل: Email: zavarana@modares.ac.ir

دوماهنامه علمی
- پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال پانزدهم -
شماره 76
شهریور 1387

چکیده

سابقه و هدف: در این بررسی اثر واکسیناسیون BCG استنشاقی و زیرپوستی بر تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفازهای صفاقی و نرفتگی انگل در کبد و طحال موش BALB/c آلوده به لیسمانیا ماژور مقایسه شد.

روش بررسی: گروه‌های 20 تایی از موش‌های حساس BALB/c 6-8 هفته‌ای را با واکسن BCG در دزهای مناسب از مسیر استنشاقی و زیرپوستی واکسینه گردید. یک ماه بعد به گروه‌های آزمایش واکسن لیسمانیا ماژور اتوکلاو شده به همراه آلود (ALM+alum) به شکل زیرپوستی تزریق شد. پس از تزریق یادآور (21 روز بعد) موش‌ها با تزریق 10⁶ انگل لیسمانیا ماژور در ناحیه کف پا آلوده شدند و پیشروی زخم به طور نرفتگی در آن‌ها بررسی گردید. در ادامه کارایی واکسن BCG با بررسی پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری سنجیده شد. میزان تولید نیتریک اکساید در محلول گریس اندازه‌گیری شد. میزان نرفتگی انگل نیز در طحال و کبد موش‌های آلوده با سنجش نرفتگی انگل در هفته‌های مختلف پس از آلوده‌سازی تعیین گردید.

یافته‌ها: تحریک سیستم ایمنی پس از واکسن BCG در هر دو گروه به شکل افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری بررسی شد. سه هفته پس از آلوده‌سازی با انگل لیسمانیا در هر دو گروه واکسن BCG، تحریک تولید نیتریک اکساید صورت گرفت. اما تولید نیتریک اکساید در گروه‌های واکسن BCG نوسان زیادی داشت و پایدار نبود و منجر به غلبه بیماری در هر دو گروه گردید. نتایج به دست آمده از میزان نرفتگی انگل نشان می‌دهد که گرچه هر دو مسیر استنشاقی و زیرپوستی می‌تواند باعث فعالیت سیستم ایمنی گردد ولی در نهایت باعث ایجاد مقاومت در میزبان نمی‌شود. لازم به ذکر است تفاوت معناداری (p<0/05) بین دو روش واکسیناسیون استنشاقی و زیرپوستی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: واکسیناسیون BCG استنشاقی و زیرپوستی تفاوت معناداری در میزان تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفازهای صفاقی، نرفتگی انگل و مقاومت میزبان نداشتند. لذا پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتری از حیث نوع و جمعیت سلول‌های T فعال شده در اعضای لنفی مختلف انجام شود تا مقایسه بهتری از دو مسیر واکسیناسیون به عمل آید. به هر حال روش استنشاقی واکسیناسیون دارای مزیت خاصی است و می‌تواند به پیشگیری از شیوع بیماری‌های خطرناکی چون HIV کمک کند. چنانچه کارایی این واکسن‌ها بهبود یابد می‌تواند به سهولت جایگزین روش‌های مرسوم شوند.

کلمات کلیدی: لیسمانیا ماژور، BCG، واکسیناسیون استنشاقی، نیتریک اکساید، نرفتگی انگل

وصول: 85/11/14
ارسال اصلاحات: 86/3/27
دریافت اصلاحات: 86/6/14

مقدمه

لیشمانیوز جلدي عمده ترین شکل بیماری لیشمانیوزیس است که توسط حداقل 12 گونه تک یاخته از جنس لیشمانیا ایجاد می شود. اگر چه لیشمانیا در بیش از 80 کشور جهان گزارش شده است، 90 درصد موارد آن در تنها 6 کشور جهان، افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه قرار گرفته است [1]. شواهد موجود نشان داده است که افرادی که مبتلا به زخم های جلدي لیشمانیا می شوند پس از بهبود از زخم برای بار دیگر مبتلا به لیشمانیوزیس جلدي نمی شوند. به این ترتیب به نظر می رسد که بتوان با استفاده از لیشمانیا علیه آن ایمنی ایجاد نمود [2]. واکسن های کشته شده [3 و 4]، واکسن های زنده ضعیف شده [2 و 5]، واکسن های سنتزی و نو ترکیب [6-10] و واکسن های غیر پروتئینی، انواع واکسن های هستند که امروزه در حال بررسی می باشند و تاکنون هیچ واکسن عمومی علیه عفونت لیشمانیا در جهان به وجود نیامده است. استفاده از واکسن لیشمانیای کشته شده به تنهایی، در کار آزمایشی های خود نتوانست نتایج متفاوتی پدید آورد. اگرچه در جامعه برزیلی باعث حفاظت شده است ولی در آسیای میانه اثر حفاظتی خوبی نداشته است، چنین تفاوت های محققین را بر آن داشت تا فرمولاسیون های جدیدی از واکسن های کشته شده ارائه دهند [11 و 12]. نخستین بار در سال 1987، ناسی (Nacy) و همکارانش [13] ایده اثر مثبت واکسیناسیون BCG را در پیشگیری از لیشمانیوز جلدي مطرح کردند. کانویت (J. Convit) و همکارانش در سال 1987 نقش مؤثر ایمونوتراپی BCG را بر درمان دارویی با آنتی موان مطرح کردند [14 و 15] و نقش پیشگیری و درمان واکسن تهیه شده از پروماستیگوت های کشته شده *L. mexicana* یا *L. braziliensis* را به همراه BCG *M. bovis* علیه لیشمانیوزیس آمریکای جنوبی نشان دادند [16]. در ایران در مؤسسه رازی توسط دکتر فشارکی و همکاران بررسی های مربوط به تولید واکسن کشته

شده، بهینه گردید و در نهایت به تولید واکسن لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده یا ALM منجر گردید [17]. در سال 1996 دکتر دولتی و همکارانش، بی خطری و ایمونوژنیسیته واکسن BCG را به همراه لیشمانیای کشته شده ALM بررسی کردند و بی خطری آن را گزارش کردند [18]. در سال 1998 دکتر مدبر و همکارانش [19] طی یک بررسی به مقایسه اثر تزریق واکسن BCG + ALM در برابر BCG به تنهایی علیه لیشمانیای جلدي آنزوپونوتیک (انتقال از انسان به انسان) پرداختند و کاهش ابتلا به لیشمانیوزیس را در گروه ALM+BCG نسبت به گروه های کنترل نشان دادند. در ادامه بررسی های که در زمینه حفاظت بخشی واکسن BCG+ALM انجام شد، دکتر خامسی پور و همکارانش داوطلبان ناحیه شمال شرقی اصفهان را با دز کم BCG+ALM واکسینه کردند. سپس LST (Leishmanin Skin Test)، پاسخ تکثری و تولید IFN- γ و IL-4 را اندازه گیری کردند. نتایج نشان دادند که داوطلبان با سابقه لیشمانیوز جلدي (CL) یا افرادی که LST مثبت هستند پاسخ تکثری LST بیشتری نسبت به سایر داوطلبان نشان می دهند. افراد با سابقه CL یا با تست مثبت LST تولید اینترفرون گامای بیشتر و شاخص تحریکی (SI) بیشتری دارند [20]. گرچه بررسی های انجام شده [21 تا 24] همگی استفاده از واکسن BCG+ALM را مفید می دانند، اما کارایی آن را در ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی تأیید نمی کنند. امروزه یکی از راهکارها، غلبه بر کاهش اثر حفاظتی BCG و خطرات احتمالی آن از یک سو و افزایش کارایی و مزایای واکسیناسیون از سوی دیگر است. یکی از این راه ها استفاده از مسیرهای مخاطی برای واکسیناسیون BCG است [25-32]. از مدت ها پیش استفاده از آنتی ژن های متفاوت مایکوباکتریایی در واکسیناسیون استنشاقی توانسته بود پاسخ ایمنی موضعی و سیستمیک بالایی علیه این آنتی ژن ها ایجاد کند. استفاده از واکسن BCG از مسیر استنشاقی مکانیسم های ایمنی مؤثری را علیه

انگل *Lmajor* فاز ایستا و محل تزریق آن کف پای چپ موشها است. گروه پنجم، موشهایی که تنها با فرسفات سالین دریافت کردند. واکسن لیثمانیای اتوکلاو شده به همراه ادجوانت آلوم (ALM+alum) از انستیتو رازی تهیه شد. مقدار تزریقی به هر موش 0/1 میلیلیتر برابر 456 میکروگرم پروتئین و 376 میکروگرم ادجوانت است و محل تزریق آن قاعده دم موش است. واکسن

انجام تست واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری به PPD

به منظور بررسی پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری در موشهایی که با BCG واکسینه شده بودند، 28 روز پس از واکسیناسیون 5 میکروگرم PPD به کف پای راست کلیه موشها از هر گروه (در حجم 0/1 میلیلیتر بافر فسفات سالین) و هم حجم آن بافر فسفات سالین به کف پای چپ موشها در هر گروه تزریق گردید. قطر کف پا با استفاده از گولیس پس از 24، 48 و 72 ساعت اندازه‌گیری شد و درصد افزایش ضخامت آن طبق روشهایی که دیگران انجام داده بودند، گزارش گردید [12].

آلوده‌سازی موشها و اندازه‌گیری کف پا

به این منظور میزان 10^5 انگل لیثمانیا ماژورفاژ ایستا را در حجم 50 میکرولیتر به کف پای چپ موشهای گروه آزمایش تزریق شد و ایجاد و پیشروی زخم حاصل از تکثیر انگل، هر هفته با استفاده از گولیس بررسی گردید.

اندازه‌گیری میزان نیتريك اكسايد با روش گریس

به این منظور در فواصل زمانی سه، شش و نه هفته پس از آلوده‌سازی موشها با *Lmajor* از دو موش از هر گروه به طور تصادفی ماکروفاژ صفاقي تهیه شد. سپس محرکه‌های موردنظر به کشت ماکروفاژ اضافه گردید. به این

پاتوژن‌های درون سلولي به راه می‌اندازد که از آن جمله ترشح زیاد IgA در مجاری مخاطی و فعال شدن سلول‌های سیستم ایمنی در ریه و طحال است که سبب تولید مقادیر بالای IL-12 و IFN- γ می‌شود. در واکسیناسیون استنشاقی در مقایسه با تزریق زیرپوستی سلول‌های پاسخ‌دهنده CD4⁺Th1 بیش از سلول‌های CD8⁺T فعال می‌شوند و ایمنی حفاظتی مناسبی علیه پاتوژن‌های درون سلولي به راه می‌افتد، به طوری که میزان پاتوژن در اعضای لنفی نسبت به تزریق زیرپوستی به شدت کاهش می‌یابد [29-31]. در این تحقیق اثر واکسیناسیون BCG استنشاقی بر واکسیناسیون لیثمانیا و پیامد لیثمانیوز جلدی در موش BALB/c بررسی شده است.

مواد و روشها

برنامه واکسیناسیون

به منظور بررسی اثر تجویز واکسن BCG از مسیرهای مختلف بر واکسن لیثمانیا، برنامه واکسیناسیون به شرح زیر طراحی شد. موشهای BALB/c، 6-8 هفته به 5 گروه 20 تایی به شرح زیر تقسیم شده و واکسینه شدند. واکسیناسیون BCG در روز صفر، واکسیناسیون ALM+alum در روزهای 28 و 49 و آلوده‌سازی با انگل در روز 60 انجام شد. گروه اول، موشهایی که واکسن BCG را به صورت استنشاقی و واکسن ALM+alum را به صورت زیرپوستی دریافت کردند. به منظور واکسیناسیون استنشاقی موشها را به صورت سه‌تایی در محفظه نبولایزر قرار می‌دهیم. 10 میلیلیتر سوسپانسیون BCG واجد 10^7 cfu را در پیمانه نبولایزر ریخته و دستگاه را روی سرعت یک میلیلیتر در دقیقه تنظیم می‌کنیم. پس از 30 دقیقه موشها را از محفظه خارج می‌کنیم. گروه دوم، موشهایی که واکسن BCG و واکسن ALM+alum را به صورت زیرپوستی دریافت کردند. گروه سوم، موشهایی که فقط واکسن ALM+alum به صورت زیرپوستی دریافت کردند (کنترل واکسن لیثمانیا). گروه چهارم، موشهایی که فقط با انگل لیثمانیا ماژور آلوده شدند. مقدار انگل، برابر 10^5

نهفتگی انگل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [33 و 34]:
 رقت / وزن عضو = بار انگل-log

آنالیز آماری
 آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. برای رسم نمودار نیز از نرم افزارهای SPSS و Excel استفاده شد، از آزمون kruskal walis در آزمون‌های ناپارامتری و در سایر موارد از student t test استفاده شد. سطح معناداری در همه موارد $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به PPD

پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به PPD در گروه‌های واکسینه شده با BCG پس از 28 روز بررسی گردید تا میزان تحریک حاصل از واکسیناسیون BCG در گروه‌های مختلف مقایسه گردد.

بر اساس آزمون General Linear Model و با در نظر گرفتن سطح معناداری $p < 0/05$ ، بین گروه‌های واکسن BCG با کنترل در زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت پس از تزریق داخل جلدی PPD اختلاف معنادار وجود دارد. همان‌طور که در جدول 1 دیده می‌شود در این فاصله زمانی پاسخ ایجاد شده در گروه‌های واکسینه نسبت به موش‌های کنترل افزایش دارد (جدول 1).

مقایسه روند ایجاد زخم و پیشروی آن با استفاده از روش آماری Repeated measure (برای هفته 1 تا 7) و Friedman (برای هفته 7-12) و مقایسه چندگانه (multiple comparison)، میانگین اندازه زخم

منظور از آنتیژن PPD، لیشمانیا مازور F/T (Freezed-Thawed) به میزان $10 \mu\text{g/ml}$ به عنوان محرک ثانوی و از لیپوپولی ساکارید ($1 \mu\text{g/ml}$) به همراه اینترفرون گاما ($2 \mu\text{g/ml}$) به عنوان محرک مثبت استفاده شد. پس از 48 ساعت محلول رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد، هم حجم محلول رویی معرف گریس اضافه شد و تولید نیتریک اکساید (NO) با ایجاد رنگ توسط این معرف اندازه‌گیری گردید. جذب O.D. حاصل از اثر معرف گریس در 540 نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس منحنی استاندارد میزان نیتریک اکساید به میکرومول محاسبه گردید [3 و 4].

سنجش نهفتگی انگل

به منظور سنجش میزان تکثیر و پیشروی انگل در موش‌های گروه واکسینه و کنترل، در فواصل زمانی سه، شش و نه هفته پس از آلوده‌سازی موش‌ها با انگل لیشمانیا مازور، دو موش از هر گروه به طور تصادفی انتخاب شد و طحال و کبد آن‌ها در شرایط استریل خارج گردید. پس از تعیین وزن این اعضا، قسمتی از آن‌ها توسط هموژنایزر در 2 میلی‌لیتر محیط کشت اشنایدر واجد 10 درصد FCS هموژن شد و از آن سریال رقت تهیه گردید. از هر رقت میزان 200 میکرولیتر به هر چاهک 96 تایی به صورت دوبار تکرار اضافه شد. دور پلیت‌ها با پارافیلیم بسته شد تا از تبخیر در مدت انکوباسیون جلوگیری شود. آنگاه پلیت‌ها به مدت 7-15 روز در دمای $26-28^\circ\text{C}$ قرار گرفت. در این مدت پلیت‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند تا در هر گروه و هر عضو بیش‌ترین رقت واجد انگل لیشمانیا به دست آید. میزان

جدول 1. پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به PPD را در موش‌هایی که با BCG واکسینه شده‌اند، نشان می‌دهد. میانگین \pm انحراف معیار درصد افزایش قطر کف یا بر حسب میلی‌متر گزارش شده است ($p < 0/05$).

| 72 ساعت | 48 ساعت | 24 ساعت | زمان گروه‌های واکسن |
|-----------------|----------------|----------------|---------------------|
| $4/3 \pm 1/8$ | $2/8 \pm 0/86$ | $3/2 \pm 0$ | بافر فسفات سالین |
| $11/14 \pm 1/8$ | $22/3 \pm 1/8$ | $21/3 \pm 4/0$ | BCG استنشاقی |
| $6/7 \pm 1/9$ | $13/9 \pm 2/9$ | $24/4 \pm 4/9$ | BCG زیرجلدی |

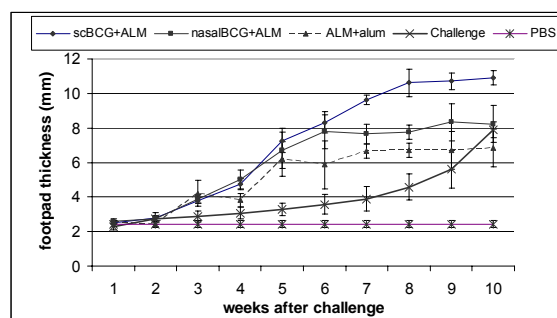
واکسیناسیون طی 12 هفته پس از

موش‌ها در گروه‌های مختلف

سوم بین گروه دوم (BCG زیربوستی) با همه گروه‌ها نسبت به محرک PPD اختلاف معناداری وجود دارد ($p < 0/05$). در هفته ششم اختلاف معناداری بین گروه‌ها مشاهده نمی‌شود و میزان تولید نیتریک اکساید در گروه‌های اول تا چهارم نسبت به هفته سوم کاهش می‌یابد. در هفته نهم میزان تولید نیتریک اکساید در گروه اول در پاسخ به محرک PPD و F/T افزایش می‌یابد، گرچه این اختلاف معنادار نیست. در گروه دوم نیز تولید نیتریک اکساید نسبت به PPD کمی افزایش می‌یابد. در هفته نهم بین تولید نیتریک اکساید در گروه‌های مختلف اختلاف معناداری مشاهده نمی‌شود. به نظر می‌رسد که در ابتدا تولید NO در گروه‌های واکسن BCG تحریک شده و افزایش می‌یابد ولی با گذشت زمان به دلیل غلبه لیشمانیا مازور تحریک تولید NO کاهش می‌یابد (شکل 2).

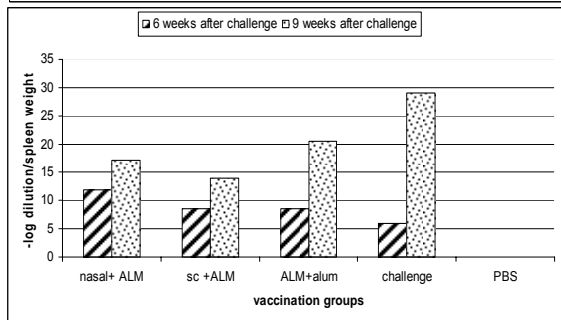
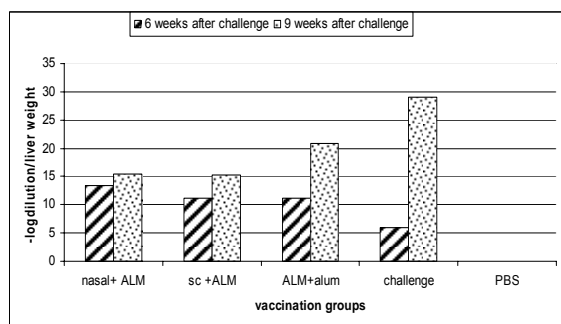
سنجش میزان نرفتگی تک یاخته میزان نرفتگی تک یاخته در هفته‌های شش و نه در گروه‌های آزمایش انجام شد. از آنجا که این بررسی‌ها به صورت دوتایی در پلیتهای 96 تایی انجام شده بود و نتایج در تکرارها برابر بود، خطای استاندارد میانگین یا انحراف معیار در همه موارد صفر خواهد بود. شکل 3 میانگین نرفتگی تک یاخته را در اعضای لنفی کبد و طحال نشان می‌دهد. بر این اساس تک‌یاخته لیشمانیا مازور از هفته ششم پس از آلوده‌سازی در همه گروه‌ها در هر دو عضو لنفی مورد بررسی دیده می‌شود. در هفته نهم تعداد تک یاخته در اعضای لنفی گروه‌های آزمایش افزایش یافته و در نهایت منجر به مرگ اکثر آن‌ها می‌شود. در گروهی که تنها با لیشمانیا آلوده شده بودند ازدیاد سریع‌تر انگل در اعضای لنفی دیده می‌شود.

آلوده‌سازی با یکدیگر مقایسه گردید و سطح معناداری برابر $p < 0/05$ در نظر گرفته شد. افزایش تورم بدون زخم در کف پا در هر دو گروه واکسینه با BCG از هفته اول پس از آلوده‌سازی آغاز شد. این تورم در گروه اول و دوم به زخم ناگهانی و شدید در سه هفته آخر تبدیل شد و در هفته نهم موش‌ها کاملاً از بین رفتند. در گروه‌های سوم و چهارم شروع تورم با شروع زخم همراه بود که از هفته سوم پس از آلوده‌سازی آغاز شد. بر این اساس، در مقایسه اندازه زخم گروه‌های چهارم و پنجم با سایر گروه‌ها اختلاف معنادار $p < 0/05$ مشاهده شد. در حالی که بین گروه‌های اول و دوم اختلاف معنادار وجود نداشت (شکل 1).



شکل 1. نمودار خطی میانگین درصد افزایش ضخامت کف پای موش‌ها را تا 10 هفته پس از آلوده‌سازی با انگل لیشمانیا مازور در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. گروه اول با BCG استنشاقی+ALM، گروه دوم با BCG زیربوستی+ALM و گروه سوم با ALM+alum واکسینه شده‌اند. به گروه چهارم و پنجم به ترتیب انگل زنده و بافر فسفات سالین تزریق شده است. افزایش تورم در گروه اول و دوم از هفته اول آغاز شده و در زمان‌های مورد بررسی نسبت به گروه چهارم و پنجم افزایش معنادار دارد.

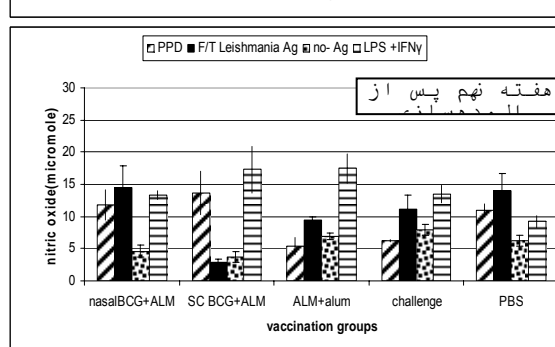
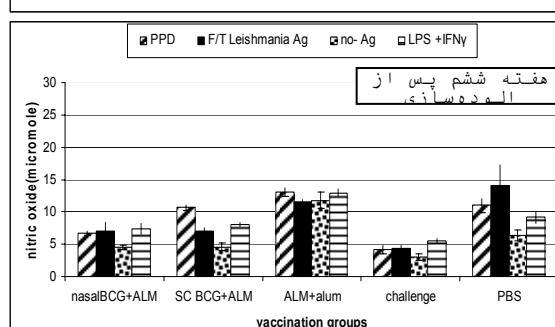
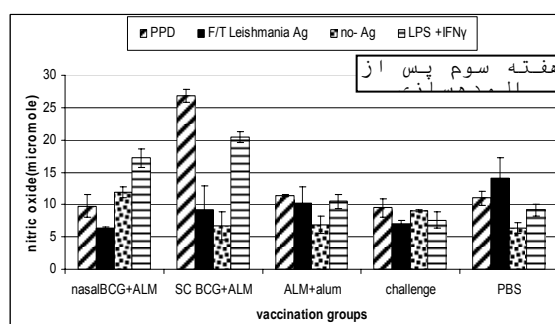
تولید نیتریک اکساید سنجش میزان تولید نیتریک اکساید در گروه‌های مختلف در حضور محرک‌های ثانوی شامل PPD, F/T و IFN- γ صورت گرفت. به کمک آزمون آماری ناپارامتری Kruskal-Wallis مقایسه آماری بین تیمارهای مختلف در هر گروه و در هفته‌های سه، شش و نه انجام شد. سطح معناداری در همه موارد $p < 0/05$ در نظر گرفته شد. بر این اساس در هفته



ماژور را در هفته‌های ششم و نهم پس از آلوده‌سازی با انگل در کبد وطحال نشان می‌دهد. شکل (الف) نهفتگی انگل در کبد و شکل (ب) نهفتگی انگل در طحال را نشان می‌دهد. بین میزان نهفتگی انگل در کبد و طحال اختلاف معناداری وجود ندارد. در هر دو عضو میزان نهفتگی انگل در گروه چهارم افزایش معناداری نسبت به سایر گروه‌ها دارد ($p < 0/05$). گروه اول با BCG استنشاقی ALM+، گروه دوم با BCG زیرپوستی ALM+ و گروه سوم با ALM+alum واکسینه شده‌اند. به گروه چهارم و پنجم به ترتیب انگل زنده و بافر فسفات سالی‌ن تزریق شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

BCG و لی‌شمانیا، هر دو از پاتوژن‌های درون سلولی هستند. BCG می‌تواند همراه با واکسن لی‌شمانیا به صورت ادجوانت یا به عنوان واکسن آغازگر یا دارو مورد استفاده قرار گیرد. ویژگی‌های زیر استفاده از BCG را در تحریک سیستم ایمنی به منظور مقابله با لی‌شمانیا مؤثر ساخته است. اول آن که میزبان هر دو آن‌ها ماکروفاژ است. دوم آن که گرچه این دو ارگانیسم در مسیر شبکه اندوزومی پس از فاگوسیتوز توسط ماکروفاژ با هم تفاوت دارند، اما هر یک در سیستم اندوزومی مکانیسم‌های فرار خاص خود را به اجرا در می‌آورند که به هر حال به بروز سیگنال‌های



شکل 2: میزان تولید نیتریک اکساید در ماکروفاهای صفاقی گروه‌های آزمایش را در حرکتهای متفاوت پس از آلوده‌سازی با انگل لی‌شمانیا ماژور نشان می‌دهد. در هفته سوم میزان تولید نیتریک اکساید در گروه دوم در حضور محرک PPD نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معناداری ($p < 0/05$) دارد (الف). در هفته ششم میزان تولید نیتریک اکساید در همه گروه‌های آزمایش کاهش می‌یابد (ب). در هفته نهم در گروه اول دوم میزان تولید نیتریک اکساید نسبت به هفته ششم در برابر حرکتهای PPD و F/T انگل لی‌شمانیا ماژور افزایش می‌یابد که به لحاظ آماری معنادار نیست (ج). گروه اول با BCG استنشاقی ALM+، گروه دوم با BCG زیرپوستی ALM+ و گروه سوم با ALM+alum واکسینه شده‌اند. به گروه چهارم و پنجم به ترتیب انگل زنده و بافر فسفات سالی‌ن تزریق شده است.

شکل 3: میزان نهفتگی انگل لی‌شمانیا

اما در روش استنشاقی پایدارتر و دو برابر روش زیرپوستی بود. بنابراین می‌توان گفت که در روش استنشاقی پاسخ ایمنی سلولی قوی‌تری ایجاد شده بود.

بروز زخم حاصل از لیشمانیا در محل تزریق لیشمانیا ماژور، ناشی از تکثیر بیش از حد انگل و آسیب به سلول‌ها و بافت‌های اطراف است. نتیجه آلوده‌سازی موش حساس BALB/c با انگل لیشمانیا ماژور در نهایت سیستمیک شدن (احشایی شدن) انگل و مرگ حیوان است. واکسن موفق در موش‌های BALB/c واکسنی است که بتواند به بهبود زخم ایجاد شده منتهی شود یا طول عمر موش‌های BALB/c را تا حد امکان افزایش دهد. در تحقیق حاضر از هفته اول پس از آلوده‌سازی لیشمانیا روند ایجاد زخم و پیشروی آن در گروه‌های آزمایش بررسی گردید. تورم در ناحیه تزریق انگل لیشمانیا ماژور زنده از هفته اول در تمام گروه‌های آزمایش به ویژه گروه‌هایی که واکسن BCG گرفته بودند، مشاهده شد، اما تشکیل زخم در گروه‌های استنشاقی و زیرپوستی تا هفته‌های چهارم-پنجم به تأخیر افتاد. در این مدت تورم و ارتشاح سلولی شدیدی در این گروه‌ها در ناحیه کف پا دیده می‌شد و ظاهراً بروز زخم به دلیل درگیری سلول‌های ایمنی به تأخیر افتاده بود. از هفته چهارم به بعد زخم تشکیل شد و با شدت زیادی در گروه‌های نامبرده گسترش یافته و موش‌های آلوده تا هفته یازدهم مردند. زخم در موش‌های گروه سوم و چهارم زودتر از گروه‌هایی که واکسن BCG گرفته بودند. یعنی در هفته دوم- سوم آغاز شد. به هر حال گروه‌هایی که واکسن BCG دریافت کرده بودند روند پیشروی زخم متغیری داشتند.

نیتریک اکساید (NO) یک مولکول بیولوژیک مهم است که اثر سایتوتوکسیک و سایتواستاتیک بر پاتوژن‌های درون سلولی از جمله لیشمانیا دارد. منبع اصلی و مهم تولید نیتریک اکساید ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا هستند که اگر موفق شوند

خطر در ماکروفاژ و تحریک ماکروفاژ منجر می‌شود [35]. سوم آن که بهترین روش حذف و مقابله با این دو ارگانیسم فعال شدن ماکروفاژ به ویژه از راه تولید متابولیت‌های فعال اکسیژن و نیترژن است که در این میان اثر کشندگی نیتریک اکساید در هر دو غالب است. بنابراین اگر بتوانیم از سویه غریب‌ماری‌زا BCG در جهت تحریک ماکروفاژ و سیستم ایمنی استفاده کنیم، توانسته ایم سطح فعالیت سیستم ایمنی را نسبت به لیشمانیا هم افزایش دهیم. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که استفاده از مسرهای مخاطی می‌تواند بر روش زیرپوستی برتری داشته و کارایی واکسیناسیون BCG را افزایش دهد. 80 درصد سلول‌های ایمنی در سیستم ایمنی مخاطی قرار دارند و پیوسته در حال گردشند. به کمک این‌سازی مخاطی می‌توانیم اعضای لنفی و سطوح مخاطی دورتر از محل ورود آنتیژن را این‌سازی. از سوی دیگر مسرهای مخاطی به دلیل آن که محل ورود پاتوژن‌ها هستند، پیوسته از یک سیستم دفاعی فعال برخوردارند. به نظر می‌رسد واکسیناسیون BCG از مسیر مخاطی سریع‌تر در دسترس سلول‌های ایمنی (ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌ها) قرار گیرد و شانس انتخاب پاسخ بهتر علیه لیشمانیا افزایش یابد [36 تا 38].

مطالعات جداگانه لیهائو چن (Lihao Chen) در سال 2004 و فالرودیاز (Falero Diaz) در سال 2000 نشان داد که استفاده از واکسن BCG استنشاقی اثر حفاظتی پایدارتر و طولانی‌تری علیه توبرکلوزیس ایجاد می‌کند. [30]. بر این اساس اثر واکسیناسیون BCG استنشاقی را علیه عفونت لیشمانیا بررسی کردیم. ابتدا به مقایسه پاسخ پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به PPD در گروه‌های واکسن BCG پرداختیم. بر اساس نتایج به دست آمده پس از 24 ساعت پاسخ برابری در گروه‌های استنشاقی و زیرپوستی مشاهده شد. در زمان‌های 48 و 72 ساعت بعد این پاسخ کاهش یافت.

مانع گسترش و تکثیر انگل لیشمانیا شوند. ضمن آن که تفاوت معناداری بین گروه های واکسن BCG و همچنین بین دو عضو مورد مطالعه (کبد و طحال) مشاهده نشد.

به هر حال یافته های حاصل از سنجش نهفتگی انگل به خوبی با یافته های اندازه زخم و میزان تولید نیتریک اکساید در گروه های واکسن هماهنگی داشت. در این بررسی نتایجی که پیشتر محققان در مورد اثر واکسیناسیون BCG از راه استنشاقی علیه توبرکلوزیس دیده بودند در مورد لیشمانیا دیده نشد. شاید نیاز باشد که در تحقیقی دیگر دز واکسیناسیون BCG یا دفعات تجویز آن را افزایش دهیم. با این حال حتی اگر تفاوتی در اثر حفاظتی واکسیناسیون از راه استنشاقی نسبت به زیرپوستی مشاهده نکنیم، به دلیل استفاده نکردن از سوزن در روش استنشاقی واکسیناسیون، از شیوع بیماری های خطرناکی چون HIV جلوگیری کرده ایم.

منابع

1. Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1999;17(3): 257-60.
2. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):229-43.
3. Cabrera M, Blackwell JM, Castes M, Trujillo D, Convit J, Shaw MA. Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunol* 2000; 22(2):73-9.
4. Castes M, Moros Z, Martinez A, Trujillo D, Castellanos PL, Rondon AJ, et al. Cell-mediated immunity in localized cutaneous leishmaniasis patients before and after treatment with immunotherapy or chemotherapy. *Parasite Immunol* 1989;11(3):211-22.
5. Rivier D, Shah R, Bovay P, Mauel J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunol* 1993;15(2):75-84.
6. Spitzer N, Jardim A, Lippert D, Olafson RW. Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. *Vaccine* 1999;17(11-12):1298-300.
7. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen

می توانند سبب حذف و از بین بردن انگل شوند.

بنابراین بدیهی است واکسیناسیون که بتواند تولید نیتریک اکساید را القا سازد، واکسن موفقی خواهد بود از این رو از جمله پارامترهای ایمونولوژیک که با هدف کشتن لیشمانیا در ماکروفاژ در ارزیابی واکسیناسیون خود به کار بردیم، سنجش تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژهای صفاقی بود. براساس نتایج به دست آمده که در شکل 2 ارائه شده است، تولید نیتریک اکساید در هفته های سوم، ششم و نهم پس از آلوده سازی با لیشمانیا ماژور نسبت به آنتی ژن های PPD و لیشمانیا ماژور F/T با یکدیگر مقایسه شده است. گروه BCG استنشاقی و زیرپوستی، بیشترین نیتریک اکساید را در هفته سوم پس از آلوده سازی، نسبت به آنتی ژن های مایکوباکتریوم تولید کرده بودند. در این زمان سطح تولید نیتریک اکساید در روش زیرپوستی با اختلاف معناداری ($p < 0/05$) بیش از روش استنشاقی بود. در هفته های بعد با روند کاهش- افزایش در تولید نیتریک اکساید روبرو بودیم که سطح تولید نیتریک اکساید در دو گروه همسان گردید.

دو عامل نقش مهمی در ایفای اثر کشندگی نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها دارند که به شرط آن می توان بر عفونت لیشمانیا غلبه کرد. 1- میزان تولید نیتریک اکساید و 2- زمان حضور نیتریک اکساید در محیط داخل سلولی ماکروفاژ و پایداری آن در طول دوره عفونت. از آنجا که میزان تولید نیتریک اکساید در گروه های واکسن BCG تفاوت نداشت، تفاوت زمان حضور نیتریک اکساید در محیط داخل سلولی ماکروفاژ و پایداری آن در طول دوره عفونت را می توان از بررسی نهفتگی انگل پیش بینی کرد. پیامد بررسی میزان نهفتگی انگل در اعضای مختلف لنفی- طحال و کبد در زمان های مختلف نشان دادند که پس از آلوده سازی با لیشمانیا هر دو روش واکسیناسیون BCG قادرند بیشتر از روش ALM+alum به تنهایی

22. Misra A, Dube A, Srivastava B, Sharma P, Srivastava JK, Katiyar JC, et al. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. *Vaccine* 2001;19(25-26):3485-92.
23. Molano I, Alonso MG, Miron C, Redondo E, Requena JM, Soto M, et al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 92 (1-2):1-13.
24. Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Hidalgo A, Cevallos W, Correa J. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2004;22 (9-10):1320-6.
25. Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine* 2000;18(13):1186-95.
26. Badiner G, Goodman TG, Lefrancois L. Selection of intestinal intraepithelial lymphocyte T cell receptors: evidence for a dynamic tissue-specific process. *Int Immunol* 1993;5(2):223-6.
27. Aldwell FE, Cross ML, Fitzpatrick CE, Lambeth MR, de Lisle GW, Buddle BM. Oral delivery of lipid-encapsulated *Mycobacterium bovis* BCG extends survival of the bacillus in vivo and induces a long-term protective immune response against tuberculosis. *Vaccine* 2005.
28. Aldwell FE, Tucker IG, de Lisle GW, Buddle BM. Oral delivery of *Mycobacterium bovis* BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in mice. *Infect Immun* 2003;71(1):101-8.
29. Lyadova IV, Vordermeier HM, Eruslanov EB, Khaidukov SV, Apt AS, Hewinson RG. Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent *Mycobacterium bovis* and accelerates production of IFN-gamma in their lungs. *Clin Exp Immunol* 2001;126(2):274-9.
30. Falero-Diaz G, Challacombe S, Banerjee D, Douce G, Boyd A, Ivanyi J. Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2000;18(28):3223-9.
31. Chen L, Wang J, Zganiacz A, Xing Z. Single intranasal mucosal *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2004;72(1):238-46.
32. Abolhassani M, Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. *Mycobacterium bovis* BCG induces similar immune responses and protection by rectal and parenteral immunization routes. *Infect Immun* 2000;68(10):5657-62.
33. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 1985;7(5):545-55.
34. Buffet P.A, Sulahian A. Culture microtitration: a sensitive confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1997;186(7):1137-47.
8. Handman E, Osborn AH, Symons F, van Driel R, Cappai R. The *Leishmania* promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 1995;74(2):189-200.
9. Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 1996;274(5286):421-3.
10. Alarcon JB, Waine GW, McManus DP. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Adv Parasitol* 1999;42:343-410
11. Alexander J. A radioattenuated *Leishmania major* vaccine markedly increases the resistance of CBA mice to subsequent infection with *Leishmania mexicana mexicana*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982;76(5):646-9.
12. Mayrink W, Antunes CM, Da Costa CA, Melo MN, Dias M, Michalick MS, et al. Further trials of a vaccine against American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80(6):1001.
13. Fortier AH, Mock BA, Meltzer MS, Nacy CA. *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against cutaneous and systemic *Leishmania major* infections of mice. *Infect Immun* 1987;55(7):1707-14.
14. Convit J, Castellanos PL, Rondon A, Pinardi ME, Ulrich M, Castes M, et al. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1987;1(8530):401-5.
15. Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Borges R, Aranzazu N, Valera M, et al. Immunotherapy of american cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97(4):469-72.
16. Hashemi-Fesharki R, Alle-Agha S, Ahourai P, et al. Vaccine preparation and quality control of killed *Leishmania major*. *Arch Inst Razi* 1992; 43:39-50.
17. Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Hashemi Fesharki R, et al. responses and reactions to *L. major* vaccination. WHO special program for research and training in tropical disease. 10-11 september 1990;20-1.
18. Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Alimohammadian MH, Khamesipour A, Ehsasi S, et al. Comparative safety and immunogenicity trial of two killed *Leishmania major* vaccines with or without BCG in human volunteers. *Clin Dermatol* 1996;14(5):489-95.
19. Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 1998;351(9115):1540-3.
20. Mahmoodi M, Khamesipour A, Dowlati Y, Rafati S, Momeni AZ, Emamjomeh M, et al. Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with low dose of BCG. *Clin Exp Immunol* 2003;134(2):303-8.
21. Khalil EA, El Hassan AM, Zijlstra EE, Mukhtar MM, Ghalib HW, Musa B, et al. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 2000;356(9241):1565-9.

37. Lehner T, Bergmeier L, Brooks R, Hussain L, Klavinski L, Mitchell E, Tao L. Genital and rectal mucosal immunity against transmission of SIV/HIV. Kagnoff M. and Kiyono H. *Essentials of Mucosal Immunology*. London: Academic Press 1996; 437-447.
38. Marinaro M, Kiyono H, Vancot J, Okahashi N. Vaccines for selective induction of Th1- and Th2-cell responses and their roles in mucosal immunology. Kagnoff M. and Kiyono H. *Essentials of Mucosal Immunology*. London: Academic Press 1996; 461-475.
- method for quantifying leishmania infantum in tissues of infected mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;2167-2168.
35. Russell D. Mycobacterium and leishmania; Stowaways in the endosomal network. *Trends in cell biology*. 1995;125-128.
36. Lagranderie M, Balazuk A.M. Abolhassani M. Development of mixed Th1/Th2 type immune response and protection against Mycobacterium tuberculosis after rectal or subcutaneous immunization of newborn and adult mice with Mycobacterium bovis BCG. *Scand J Immunol*. 2002; 55:293-303.

