دانشور پزشكي

دوماهنامه علمي - پژوهشي دانشگاه شاهد
سال پانزدهم - شماره 76
شهريور 1387

مقايسه اثر واكسيناسيون BCG استنشاقي با تزريق زيرپوستي بر توليد نيتريك اكساید در ماكروفاژها و ميزان نهفتگي انگل در بدن موش BALB/c آلوده به ليشمانيا ماژور

نويسندگان: سارا صعودي[1]، دكتر احمد زواران‌حسيني[2*]، دكتر سيما رافتي[3]، دكتر رضا هاشمي‌فشاركي[4]، دكتر كسري اسماعيل‌نيا[5] و سيدمحمود هاشمي[1]

1. دانشجوي دكتري، گروه ايمني‌شناسي، دانشكده پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس
2. استاد، گروه ايمني‌شناسي، دانشكده پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس
3. استاد، آزمايشگاه ايمني‌شناسي مولكولي و تحقيقات واكسن، انستيتو پاستور ايران
4. استاد، گروه تكيا‌خته‌شناسي، موسسه واكسن و سرم‌سازي رازي
5. استاديار، گروه تكيا‌خته‌شناسي، موسسه واكسن و سرم‌سازي رازي

* نويسنده مسئول:
Email: zavarana@ modares.ac.ir

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

چكيده

سابقه و هدف: در اين بررسي اثر واكسيناسيون BCG استنشاقي و زيرپوستي بر توليد نيتريك اكساید توسط ماكروفاژهاي صفاقي و نهفتگي انگل در كبد و طحال موش BALB/c آلوده به ليشمانيا ماژور مقايسه شد.

روش بررسي: گروه‌هاي 20 تايي از موش‌هاي حساس BALB/c 6-8 هفته‌اي را با واكسن BCG در دزهاي مناسب از مسير استنشاقي و زيرپوستي واكسينه گرديد. يك ماه بعد به گروه‌هاي آزمايش واكسن ليشمانيا ماژور اتوكلاو شده به همراه آلوم (ALM+alum) به شكل زيرپوستي تزريق شد. پس از تزريق يادآور (21 روز بعد) موش‌ها با تزريق 10^5 انگل ليشمانيا ماژور در ناحيه كف پا آلوده شدند و پيشروي زخم به طور هفتگي در آن‌ها بررسي گرديد. در ادامه كارايي واكسن BCG با بررسي پاسخ ازدياد حساسيت تأخيري سنجيده شد. ميزان توليد نيتريك اكساید در محلول رويي كشت ماكروفاژ به روش گريس اندازه‌گيري شد. ميزان نهفتگي انگل نيز در طحال و كبد موش‌هاي آلوده با سنجش نهفتگي انگل در هفته‌هاي مختلف پس از آلوده‌سازي تعيين گرديد.

يافته‌ها: تحريك سيتم ايمني پس از واكسن BCG در هر دو گروه به شكل افزايش پاسخ ازدياد حساسيت تأخيري بررسي شد. سه هفته پس از آلوده‌سازي با انگل ليشمانيا در هر دو گروه واكسن BCG، تحريك توليد نيتريك اكساید صورت گرفت. اما توليد نيتريك اكساید در گروه‌هاي واكسن BCG نوسان زيادي داشت و پايدار نبود و منجر به غلبه بيماري در هر دو گروه گرديد. نتايج به دست آمده از ميزان نهفتگي انگل نشان مي‌دهد كه گرچه هر دو مسير استنشاقي و زيرپوستي مي‌تواند باعث فعاليت سيستم ايمني گردد ولي در نهايت باعث ايجاد مقاومت در ميزبان نمي‌شود. لازم به ذكر است تفاوت معناداري ($p \leq 0/05$) بين دو روش واكسيناسيون استنشاقي و زيرپوستي وجود ندارد.

نتيجه‌گيري: واكسيناسيون BCG استنشاقي و زيرپوستي تفاوت معناداري در ميزان توليد نيتريك اكساید توسط ماكروفاژهاي صفاقي، نهفتگي انگل و مقاومت ميزبان نداشتند. لذا پيشنهاد مي‌شود بررسي‌هاي بيشتري از حيث نوع و جمعيت سلول‌هاي T فعال شده در اعضاي لنفي مختلف انجام شود تا مقايسه بهتري از دو مسير واكسيناسيون به عمل آيد. به هر حال روش استنشاقي واكسيناسيون داراي مزيت خاصي است و مي‌تواند به پيشگيري از شيوع بيماريهاي خطرناكي چون HIV كمك كند. چنانچه كارايي اين واكسن‌ها بهبود يابد مي‌توانند به سهولت جايگزين روش‌هاي مرسوم شوند.

كلمات كليدي : ليشمانيا ماژور، BCG، واكسيناسيون استنشاقي، نيتريك اكساید، نهفتگي انگل

مقدمه

ليشمانيوز جلدي عمده‌ترين شكل بيماري ليشمانيوزيس است كه توسط حداقل 12 گونه تك ياخته از جنس ليشمانيا ايجاد مي‌شود. اگر چه ليشمانيا در بيش از 80 كشور جهان گزارش شده است، 90 درصد موارد آن در تنها 6 كشور جهان، افغانستان، برزيل، ايران، پرو، عربستان سعودي و سوريه قرار گرفته است [1] شواهد موجود نشان داده است كه افرادي كه مبتلا به زخم‌هاي جلدي ليشمانيا مي‌شوند پس از بهبود از زخم براي بار ديگر مبتلا به ليشمازيس جلدي نمي‌شوند. به اين ترتيب به نظر مي‌رسد كه بتوان با استفاده از ليشمانيا عليه آن ايمني ايجاد نمود[2] واكسن‌هاي كشته شده [3و4]، واكسن‌هاي زنده ضعيفشده [2و5]، واكسن‌هاي سنتزي و نوتركيب [6-10] و واكسن‌هاي غيرپروتئيني، انواع واكسن‌هايي هستند كه امروزه در حال بررسي مي‌باشند و تاكنون هيچ واكسن عمومي عليه عفونت ليشمانيا در جهان به وجود نيامده است.

استفاده از واكسن ليشمانياي كشته شده به تنهايي، در كار آزمايي‌هاي خود نتوانست نتايج متفاوتي پديد آورد. اگرچه در جامعه برزيلي باعث حفاظت شده است ولي در آسياي ميانه اثر حفاظتي خوبي نداشته است، چنين تفاوت‌هايي محققين را بر آن داشت تا فرمولاسيون‌هاي جديدي از واكسن‌هاي كشته شده ارائه دهند [11و12]. نخستين بار در سال 1987، ناسي (Nacy) و همكارانش[13] ايده اثر مثبت واكسيناسيون BCG را در پيشگيري از ليشمانيوز جلدي مطرح كردند. كانويت (J.Convit) و همكارانش در سال 1987 نقش مؤثر ايمونوتراپي BCG را بر درمان دارويي با آنتيموان مطرح كردند [14و15] و نقش پيشگيري و درمان واكسن تهيه شده از پروماستيگوت‌هاي كشته‌شدة *L.mexicana* يا *L.braziliensis* را به همراه BCG *M.bovis* عليه ليشمانيازيس آمريكاي جنوبي نشان دادند [16].

در ايران در مؤسسه رازي توسط دكتر فشاركي و همكاران بررسي‌هاي مربوط به توليد واكسن كشته شده، بهينه گرديد و در نهايت به توليد واكسن ليشمانيا ماژور اتوكلاو شده يا ALM منجر گرديد [17]. در سال 1996 دكتر دولتي و همكارانش، بي‌خطري و ايمونوژنيسيته واكسن BCG را به همراه ليشمانياي كشته شده ALM بررسي كردند و بي‌خطري آن را گزارش كردند [18]. در سال 1998 دكتر مدبر و همكارانش[19] طي يك بررسي به مقايسه اثر تزريق واكسن ALM + BCG در برابر BCG به تنهايي عليه ليشمانياي جلدي انتروپونوتيك (انتقال از انسان به انسان) پرداختند و كاهش ابتلا به ليشمانيازيس را در گروه ALM+BCG نسبت به گروه‌هاي كنترل نشان دادند.

در ادامه بررسي‌هايي كه در زمينه حفاظتبخشي واكسن BCG+ALM انجام شد، دكتر خامسي‌پور و همكارانش داوطلبان ناحيه شمال شرقي اصفهان را با دز كم BCG+ALM واكسينه كردند. سپس LST (Leishmanin Skin Test)، پاسخ تكثيري و توليد IFN-γ و IL-4 را اندازه‌گيري كردند. نتايج نشان دادند كه داوطلبان با سابقه ليشمانيوز جلدي (CL) يا افرادي كه LST مثبت هستند پاسخ تكثيري LST بيشتري نسبت به ساير داوطلبان نشان مي‌دهند. افراد با سابقه CL يا با تست مثبت LST توليد اينترفرون گاماي بيشتر و شاخص تحريكي (SI) بيشتري دارند [20].

گرچه بررسي‌هاي انجام شده [21تا24] همگي استفاده از واكسن ALM+BCG را مفيد مي‌دانند، اما كارايي آن را در ايجاد يك پاسخ ايمني قوي تأييد نمي‌كنند. امروزه يكي از راهكارها، غلبه بر كاهش اثر حفاظتي BCG و خطرات احتمالي آن از يك سو و افزايش كارايي و مزاياي واكسيناسيون از سوي ديگر است. يكي از اين راه‌ها استفاده از مسيرهاي مخاطي براي واكسيناسيون BCG است [25-32]. از مدت‌ها پيش استفاده از آنتي‌ژن‌هاي متفاوت مايكوباكتريايي در واكسيناسيون آستنشاقي توانسته بود پاسخ ايمني موضعي و سيستميك بالايي عليه اين آنتي‌ژن‌ها ايجاد كند. استفاده از واكسن BCG از مسير استنشاقي مكانيسم‌هاي ايمني مؤثري را عليه

پاتوژن‌هاي درون سلولي به راه مي‌اندازد كه از آن جمله ترشح زياد IgA در مجاري مخاطي و فعال شدن سلول‌هاي سيستم ايمني در ريه و طحال است كه سبب توليد مقادير بالاي IL-12 و IFN-γ مي‌شود. در واكسيناسيون استنشاقي در مقايسه با تزريق زيرپوستي سلول‌هاي پاسخ‌دهنده $CD4^+Th1$ بيش از سلول‌هاي $CD8^+T$ فعال مي‌شوند و ايمني حفاظتي مناسبي عليه پاتوژن‌هاي درون سلولي به راه مي‌افتد، به‌طوري كه ميزان پاتوژن در اعضاي لنفي نسبت به تزريق زيرپوستي به شدت كاهش مي‌يابد [29-31]. در اين تحقيق اثر واكسيناسيون BCG استنشاقي بر واكسيناسيون ليشمانيا و پيامد ليشمانيوز جلدي در موش BALB/c بررسي شده است.

مواد و روش‌ها

برنامه واكسيناسيون

به منظور بررسي اثر تجويز واكسن BCG از مسيرهاي مختلف بر واكسن ليشمانيا، برنامه واكسيناسيون به شرح زير طراحي شد. موش‌هاي نر BALB/c ، 8-6 هفته به 5 گروه 20 تايي به شرح زير تقسيم شده و واكسينه شدند. واكسيناسيون BCG در روز صفر، واكسيناسيون ALM+alum در روزهاي 28 و 49 و آلوده‌سازي با انگل در روز 60 انجام شد. گروه اول، موش‌هايي كه واكسن BCG را به صورت استنشاقي و واكسن ALM+alum را به صورت زيرپوستي دريافت كردند. به منظور واكسيناسيون استنشاقي موش‌ها را به صورت سه‌تايي در محفظه نبولايزر قرار مي‌دهيم. 10 ميلي‌ليتر سوسپانسيون BCG واجد 10^7cfu را درپيمانه نبولايزر ريخته و دستگاه را روي سرعت يك ميلي‌ليتر در دقيقه تنظيم مي‌كنيم. پس از 30 دقيقه موش‌ها را از محفظه خارج مي‌كنيم. گروه دوم، موش‌هايي كه واكسن BCG و واكسن ALM+alum را به صورت زيرپوستي دريافت كردند. گروه سوم، موش‌هايي كه فقط واكسن ALM+alum به صورت زيرپوستي دريافت كردند (كنترل واكسن ليشمانيا). گروه چهارم، موش‌هايي كه فقط با انگل ليشمانيا ماژور آلوده شدند. مقدار انگل، برابر 10^5 انگل *L.major* فاز ايستا و محل تزريق آن كف پاي چپ موش‌ها است. گروه پنجم، موش‌هايي كه تنها بافرفسفات سالين دريافت كردند. واكسن ليشمانياي اتوكلاو شده به همراه ادجوانت آلوم (ALM+alum) از انستيتو رازي تهيه شد. مقدار تزريقي به هر موش 0/1 ميلي‌ليتر برابر 456 ميكروگرم پروتئين و 376 ميكروگرم ادجوانت است و محل تزريق آن قاعده دم موش است. واكسن BCG (pasture strain 1173-P2)، در غلظت 60 ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر محيط كشت sauton كه حاوي cfu 20×10^6 در هر ميلي‌گرم است، از انستيتوپاستور ايران تهيه شد.

انجام تست واكنش ازدياد حساسيت تأخيري به PPD

به منظور بررسي پاسخ ازدياد حساسيت تأخيري در موش‌هايي كه با BCG واكسينه شده بودند، 28 روز پس از واكسيناسيون 5 ميكروگرم PPD به كف پاي راست كليه موش‌ها از هر گروه (در حجم 0/1 ميلي‌ليتر بافر فسفات سالين) و هم حجم آن بافر فسفات سالين به كف پاي چپ موش‌ها در هر گروه تزريق گرديد. قطر كف پا با استفاده از كوليس پس از 24، 48 و 72 ساعت اندازه‌گيري شد و درصد افزايش ضخامت آن طبق روش‌هايي كه ديگران انجام داده بودند، گزارش گرديد [12].

آلوده‌سازي موش‌ها و اندازه‌گيري كف پا

به اين منظور ميزان 10^5 انگل ليشمانيا ماژورفاز ايستا را در حجم 50 ميكروليتر به كف پاي چپ موش‌هاي گروه آزمايش تزريق شد و ايجاد و پيشروي زخم حاصل از تكثير انگل، هر هفته با استفاده از كوليس بررسي گرديد.

اندازه‌گيري ميزان نيتريك اكساید با روش گريس

به اين منظور در فواصل زماني سه، شش و نه هفته پس از آلوده‌سازي موش‌ها با *L.major* از دو موش از هر گروه به طور تصادفي ماكروفاژ صفاقي تهيه شد. سپس محرك‌هاي موردنظر به كشت ماكروفاژ اضافه گرديد. به اين

منظوراز آنتيژن PPD، ليشمانيا ماژور F/T (Freezed-Thawed) به ميزان 10µg/ml به عنوان محرک ثانوي و از ليپوپلي ساکارايد (1µg/ml) به همراه اينترفرون گاما (2µg/ml) به عنوان محرک مثبت استفاده شد. پس از 48 ساعت محلول رويي سلول‌ها جمع‌آوري شد، هم حجم محلول رويي معرف گريس اضافه شد و توليد نيتريک اکسايد (NO) با ايجاد رنگ توسط اين معرف اندازه‌گيري گرديد. جذب O.D. حاصل از اثر معرف گريس در 540 نانومتر اندازه‌گيري شد و براساس منحني استاندارد ميزان نيتريک اکسايد به ميکرومول محاسبه گرديد [3و4].

سنجش نهفتگي انگل

به منظور سنجش ميزان تکثير و پيشروي انگل در موش‌هاي گروه واکسينه و کنترل، در فواصل زماني سه، شش و نه هفته پس از آلوده‌سازي موش‌ها با انگل ليشمانيا ماژور، دو موش از هر گروه به طور تصادفي انتخاب شد و طحال و کبد آن‌ها در شرايط استريل خارج گرديد. پس از تعيين وزن اين اعضا، قسمتي از آن‌ها توسط هموژنايزر در 2 ميلي‌ليتر محيط کشت اشنايدر واجد 10 درصد FCS هموژن شد و از آن سريال رقت تهيه گرديد. از هر رقت ميزان 200 ميکروليتر به هر چاهک 96تايي به صورت دوبار تکرار اضافه شد. دور پليت‌ها با پارافيلم بسته شد تا از تبخير در مدت انکوباسيون جلوگيري شود. آنگاه پليت‌ها به مدت 15-7 روز در دماي 28-26 °c قرار گرفت. در اين مدت پليت‌ها با ميکروسکوپ معکوس بررسي شدند تا در هر گروه و هر عضو بيش‌ترين رقت واجد انگل ليشمانيا به‌دست آيد. ميزان نهفتگي انگل با استفاده از فرمول زير محاسبه شد [33و34]:

رقت / وزن عضو = بار انگل log-

آناليز آماري

آناليز آماري نتايج با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. براي رسم نمودار نيز از نرم‌افزارهاي SPSS و Excel استفاده شد، از آزمون kruskal walis در آزمون‌هاي ناپارامتري و در ساير موارد از student t test استفاده شد. سطح معناداري در همه موارد $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

يافته‌ها

پاسخ ازدياد حساسيت تأخيري نسبت به PPD

پاسخ ازدياد حساسيت تأخيري نسبت به PPD در گروه‌هاي واکسينه شده با BCG پس از 28 روز بررسي گرديد تا ميزان تحريک حاصل از واکسيناسيون BCG در گروه‌هاي مختلف مقايسه گردد.

براساس آزمون General Linear Model و با در نظر گرفتن سطح معناداري $p<0/05$، بين گروه‌هاي واکسن BCG با کنترل در زمان‌هاي 24، 48 و 72 ساعت پس از تزريق داخل جلدي PPD اختلاف معنادار وجود دارد. همان‌طور که در جدول 1 ديده مي‌شود در اين فاصله زماني پاسخ ايجاد شده در گروه‌هاي واکسينه نسبت به موش‌هاي کنترل افزايش دارد (جدول 1).

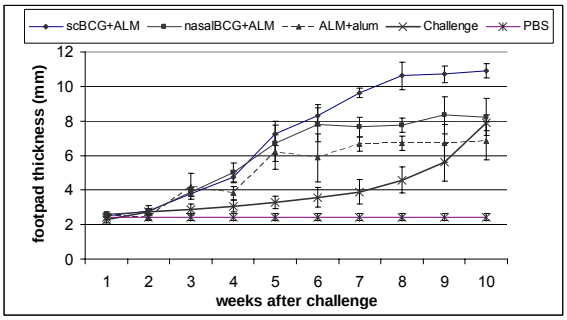
مقايسه روند ايجاد زخم و پيشروي آن

با استفاده از روش آماري Repeated measure (براي هفته 1 تا 7) و Friedman (براي هفته 12-7) و مقايسه چندگانه (multiple comparison)، ميانگين اندازه زخم موش‌ها در گروه‌هاي مختلف واکسيناسيون طي 12 هفته پس از

جدول 1. پاسخ ازدياد حساسيت تأخيري نسبت به PPD را در موش‌هايي که با BCG واکسينه شده‌اند، نشان مي‌دهد. ميانگين ± انحراف معيار درصد افزايش قطر کف پا بر حسب ميلي‌متر گزارش شده است ($p<0/05$).

زمان / گروه‌هاي واکسن	24 ساعت	48 ساعت	72 ساعت
بافر فسفات سالين	3/2 ± 0	2/8 ± 0/86	4/3 ± 1/8
BCG استنشاقي	21/3 ± 4/0	22/3 ± 1/8	11/14 ± 1/8
BCG زيرجلدي	24/4 ± 4/9	13/9 ± 2/9	6/7 ± 1/9

آلوده‌سازي با يكديگر مقايسه گرديد و سطح معناداري برابر $p<0/05$ در نظر گرفته شد. افزايش تورم بدون زخم در كف پا درهر دو گروه واكسينه با BCG از هفته اول پس از آلوده‌سازي آغاز شد. اين تورم در گروه اول و دوم به زخم ناگهاني و شديد در سه هفته آخر تبديل شد و در هفته نهم موش‌ها كاملاً از بين رفتند. در گروه‌هاي سوم و چهارم شروع تورم با شروع زخم همراه بود كه از هفته سوم پس از آلوده‌سازي آغاز شد. بر اين اساس، در مقايسه اندازه زخم گروه‌هاي چهارم و پنجم با ساير گروه‌ها اختلاف معنادار $p<0/05$ مشاهده شد. در حالي كه بين گروه‌هاي اول و دوم اختلاف معنادار وجود نداشت (شكل1).



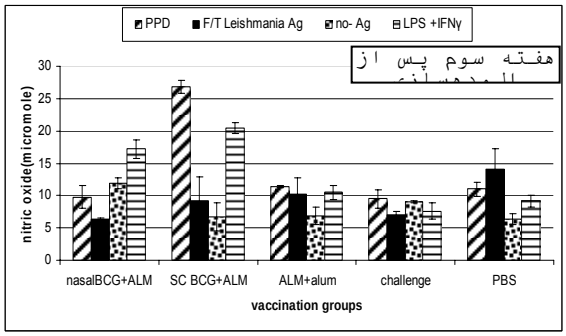
شكل 1. نمودار خطي ميانگين درصد افزايش ضخامت كف پاي موش‌ها را تا 10 هفته پس از آلوده‌سازي با انگل ليشمانيا ماژور در گروه‌هاي مختلف نشان مي‌دهد. گروه اول با BCG استنشاقي +ALM، گروه دوم با BCG زيرپوستي+ALM و گروه سوم با ALM+alum واكسينه شده‌اند. به گروه چهارم و پنجم به ترتيب انگل زنده و بافر فسفات سالين تزريق شده است. افزايش تورم در گروه اول و دوم از هفته اول آغاز شده و در زمان‌هاي مورد بررسي نسبت به گروه چهارم و پنجم افزايش معنادار دارد.

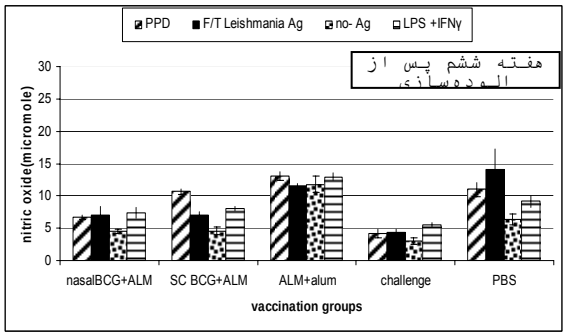
توليد نيتريك اكسايد

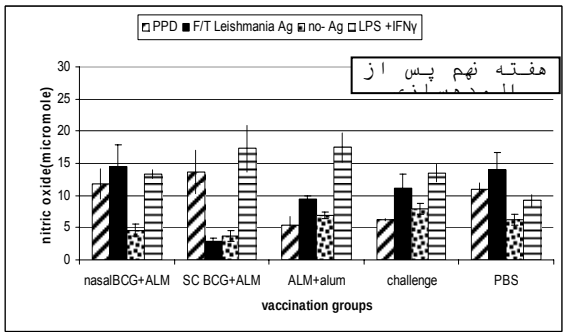
سنجش ميزان توليد نيتريك اكسايد در گروه‌هاي مختلف در حضور محرك‌هاي ثانوي شامل PPD, F/T و IFN-γ+ LPS صورت گرفت. به كمك آزمون آماري ناپارامتري Kruskal-Wallis مقايسه آماري بين تيمارهاي مختلف در هر گروه و در هفته‌هاي سه، شش و نه انجام شد. سطح معناداري در همه موارد $p<0/05$ در نظر گرفته شد. بر اين اساس در هفته سوم بين گروه دوم (BCG زيرپوستي) با همه گروه‌ها نسبت به محرك PPD اختلاف معناداري وجود دارد ($p<0/05$). در هفته ششم اختلاف معناداري بين گروه‌ها مشاهده نمي‌شود و ميزان توليد نيتريك اكسايد در گروه‌هاي اول تا چهارم نسبت به هفته سوم كاهش مي‌يابد. در هفته نهم ميزان توليد نيتريك اكسايد در گروه اول در پاسخ به محرك PPD و F/T افزايش مي‌يابد، گرچه اين اختلاف معنادار نيست. در گروه دوم نيز توليد نيتريك اكسايد نسبت به PPD كمي افزايش مي‌يابد. در هفته نهم بين توليد نيتريك اكسايد در گروه‌هاي مختلف اختلاف معناداري مشاهده نمي‌شود. به نظر مي‌رسد كه در ابتدا توليد NO در گروه‌هاي واكسن BCG تحريك شده و افزايش مي‌يابد ولي با گذشت زمان به دليل غلبه ليشمانيا ماژور تحريك توليد NO كاهش مي‌يابد (شكل 2).

سنجش ميزان نهفتگي تك ياخته

ميزان نهفتگي تك ياخته در هفته‌هاي شش و نه در گروه‌هاي آزمايش انجام شد. از آنجا كه اين بررسي‌ها به صورت دوتايي در پليت‌هاي 96 تايي انجام شده بود و نتايج در تكرارها برابر بود، خطاي استاندارد ميانگين يا انحراف معيار در همه موارد صفر خواهد بود. شكل 3 ميانگين نهفتگي تك ياخته را در اعضاي لنفي كبد و طحال نشان مي‌دهد. بر اين اساس تك‌ياخته ليشمانيا ماژور از هفته ششم پس از آلوده‌سازي در همه گروه‌ها در هر دو عضو لنفي مورد بررسي ديده مي‌شود. در هفته نهم تعداد تك ياخته در اعضاي لنفي گروه‌هاي آزمايش افزايش يافته و در نهايت منجر به مرگ اكثر آن‌ها مي‌شود. در گروهي كه تنها با ليشمانيا آلوده شده بودند ازدياد سريع‌تر انگل در اعضاي لنفي ديده مي‌شود.

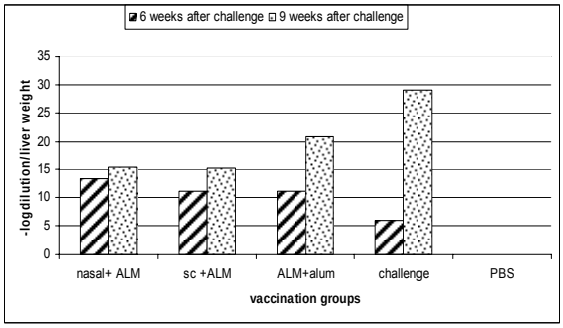


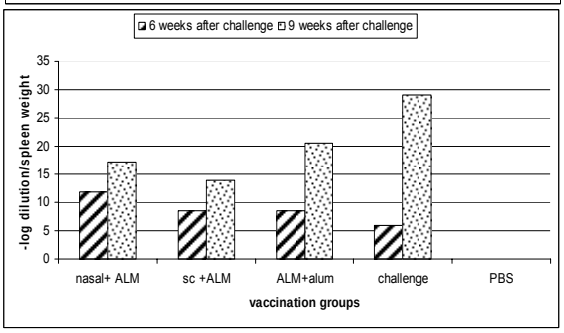




شكل 2: ميزان توليد نيتريك اكساید در ماكروفاهاي صفاقي گروه‌هاي ازمايش را در محرك‌هاي متفاوت پس از آلوده‌سازي با انگل ليشمانيا ماژور نشان مي‌دهد. در هفته سوم ميزان توليد نيتريك اكساید در گروه دوم در حضور محرك PPD نسبت به ساير گروه‌ها افزايش معناداري ($p<0/05$) دارد (الف). در هفته ششم ميزان توليد نيتريك اكساید در همه گروه‌هاي آزمايش كاهش مي‌يابد (ب). در هفته نهم در گروه اول دوم ميزان توليد نيتريك اكساید نسبت به هفته ششم در برابر محرك‌هاي PPD و F/T انگل ليشمانيا ماژور افزايش مي‌يابد كه به لحاظ آماري معنادار نيست (ج). گروه اول با BCG استنشاقي +ALM، گروه دوم با BCG زيرپوستي +ALM و گروه سوم با ALM+alum واكسينه شده‌اند. به گروه چهارم و پنجم به ترتيب انگل زنده و بافر فسفات سالين تزريق شده است.

شكل 3: ميزان نهفتگي انگل ليشمانيا





ماژور را در هفته‌هاي ششم و نهم پس از آلوده‌سازي با انگل در كبد و طحال نشان مي‌دهد. شكل (الف) نهفتگي انگل در كبد و شكل (ب) نهفتگي انگل در طحال را نشان مي‌دهد. بين ميزان نهفتگي انگل در كبد و طحال اختلاف معناداري وجود ندارد. در هر دو عضو ميزان نهفتگي انگل در گروه چهارم افزايش معناداري نسبت به ساير گروه‌ها دارد ($p<0/05$). گروه اول با BCG استنشاقي +ALM، گروه دوم با BCG زيرپوستي + ALM و گروه سوم با ALM+alum واكسينه شده‌اند. به گروه چهارم و پنجم به ترتيب انگل زنده و بافر فسفات سالين تزريق شده است.

بحث و نتيجه‌گيري

BCG و ليشمانيا، هر دو از پاتوژن‌هاي درون سلولي هستند. BCG مي‌تواند همراه با واكسن ليشمانيا به صورت ادجوانت يا به عنوان واكسن آغازگر يا دارو مورد استفاده قرار گيرد. ويژگي‌هاي زير استفاده از BCG را در تحريك سيستم ايمني به منظور مقابله با ليشمانيا مؤثر ساخته است. اول آن كه ميزبان هر دو آن‌ها ماكروفاژ است. دوم آن كه گرچه اين دو ارگانيسم در مسير شبكه اندوزومي پس از فاگوسيتوز توسط ماكروفاژ با هم تفاوت دارند، اما هر يك در سيستم اندوزومي مكانيسم‌هاي فرار خاص خود را به اجرا در مي‌آورند كه به هر حال به بروز سيگنال‌هاي

خطر در ماكروفاژ و تحريك ماكروفاژ منجر مي‌شود [35]. سوم آن كه بهترين روش حذف و مقابله با اين دو ارگانيسم فعال شدن ماكروفاژ به ويژه از راه توليد متابوليت‌هاي فعال اكسيژن و نيتروژن است كه در اين ميان اثر كشندگي نيتريك اكسايد در هر دو غالب است. بنابراين اگر بتوانيم از سويه غيربيماري‌زا BCG در جهت تحريك ماكروفاژ و سيستم ايمني استفاده كنيم، توانسته ايم سطح فعاليت سيستم ايمني را نسبت به ليشمانيا هم افزايش دهيم. تحقيقات اخير نشان مي‌دهد كه استفاده از مسيرهاي مخاطي مي‌تواند بر روش زيرپوستي برتري داشته و كارايي واكسيناسيون BCG را افزايش دهد. 80 درصد سلول‌هاي ايمني در سيستم ايمني مخاطي قرار دارند و پيوسته در حال گردشند. به كمك ايمن‌سازي مخاطي مي‌توانيم اعضاي لنفي و سطوح مخاطي دورتر از محل ورود آنتي‌ژن را ايمن‌سازيم. از سوي ديگر مسيرهاي مخاطي به دليل آن كه محل ورود پاتوژن‌ها هستند، پيوسته از يك سيستم دفاعي فعال برخوردارند. به نظر مي‌رسد واكسيناسيون BCG از مسير مخاطي سريع‌تر در دسترس سلول‌هاي ايمني (ماكروفاژها، سلول‌هاي دندريتيك و لنفوسيت‌ها) قرار گيرد و شانس انتخاب پاسخ بهتر عليه ليشمانيا افزايش يابد [36تا38].

مطالعات جداگانه ليهائو چن (Lihao Chen) در سال 2004 و فالروديياز (Falero Diaz) در سال 2000 نشان داد كه استفاده از واكسن BCG استنشاقي اثر حفاظتي پايدارتر و طولاني‌تري عليه توبركلوزيس ايجاد مي‌كند. [30]. بر اين اساس اثر واكسيناسيون BCG استنشاقي را عليه عفونت ليشمانيا بررسي كرديم. ابتدا به مقايسه پاسخ پاسخ ازدياد حساسيت تأخيري نسبت به PPD در گروه‌هاي واكسن BCG پرداختيم. بر اساس نتايج به دست آمده پس از 24 ساعت پاسخ برابري در گروه‌هاي استنشاقي و زيرپوستي مشاهده شد. در زمان‌هاي 48 و 72 ساعت بعد اين پاسخ كاهش يافت. اما در روش استنشاقي پايدارتر و دو برابر روش زيرپوستي بود. بنابراين مي‌توان گفت كه در روش استنشاقي پاسخ ايمني سلولي قوي‌تري ايجاد شده بود.

بروز زخم حاصل از ليشمانيا در محل تزريق ليشمانيا ماژور، ناشي از تكثير بيش از حد انگل و آسيب به سلول‌ها و بافت‌هاي اطراف است. نتيجه آلوده‌سازي موش حساس BALB/c با انگل ليشمانيا ماژور در نهايت سيستميك شدن (احشايي شدن) انگل و مرگ حيوان است. واكسن موفق در موش‌هاي BALB/c واكسني است كه بتواند به بهبود زخم ايجاد شده منتهي شود يا طول عمر موش‌هاي BALB/c را تا حد امكان افزايش دهد. در تحقيق حاضر از هفته اول پس از آلوده‌سازي ليشمانيا روند ايجاد زخم و پيشروي آن در گروه‌هاي آزمايش بررسي گرديد. تورم در ناحيه تزريق انگل ليشمانيا ماژور زنده از هفته اول در تمام گروه‌هاي آزمايش به ويژه گروه‌هايي كه واكسن BCG گرفته بودند، مشاهده شد، اما تشكيل زخم در گروه‌هاي استنشاقي و زيرپوستي تا هفته‌هاي چهارم-پنجم به تأخير افتاد. در اين مدت تورم و ارتشاح سلولي شديدي در اين گروه‌ها در ناحيه كف پا ديده مي‌شد ولي ظاهراً بروز زخم به دليل درگيري سلول‌هاي ايمني به تأخير افتاده بود. از هفته چهارم به بعد زخم تشكيل شد و با شدت زيادي در گروه‌هاي نامبرده گسترش يافته وموش‌هاي آلوده تا هفته يازدهم مردند. زخم در موش‌هاي گروه سوم و چهارم زودتر از گروه‌هايي كه واكسن BCG گرفته بودند. يعني در هفته دوم- سوم آغاز شد. به هر حال گروه‌هايي كه واكسن BCG دريافت كرده بودند روند پيشروي زخم متغيري داشتند.

نيتريك اكسايد (NO) يك مولكول بيولوژيك مهم است كه اثر سايتوتوكسيك و سايتواستاتيك بر پاتوژن‌هاي درون سلولي از جمله ليشمانيا دارد. منبع اصلي و مهم توليد نيتريك اكسايد ماكروفاژهاي آلوده به ليشمانيا هستند كه اگر موفق شوند

مي‌توانند سبب حذف و از بين بردن انگل شوند.

بنابراين بديهي است واكسني كه بتواند توليد نيتريك اكسايد را القا سازد، واكسن موفقي خواهد بود از اين‌رو از جمله پارامترهاي ايمونولوژيك كه با هدف كشتن ليشمانيا در ماكروفاژ در ارزيابي واكسيناسيون خود به كار برديم، سنجش توليد نيتريك اكسايد از ماكروفاژهاي صفاقي بود. براساس نتايج به دست آمده كه در شكل 2 ارائه شده است، توليد نيتريك اكسايد در هفته‌هاي سوم، ششم و نهم پس از آلوده‌سازي با ليشمانيا ماژور نسبت به آنتي‌ژن‌هاي PPD و ليشمانيا ماژور F/T با يكديگر مقايسه شده است. گروه BCG استنشاقي و زيرپوستي، بيشترين نيتريك اكسايد را در هفته سوم پس از آلوده‌سازي، نسبت به آنتي‌ژن‌هاي مايكوباكتريوم توليد كرده بودند. در اين زمان سطح توليد نيتريك اكسايد در روش زيرپوستي با اختلاف معناداري ($p<0/05$) بيش از روش استنشاقي بود. در هفته‌هاي بعد با روند كاهش- افزايش در توليد نيتريك اكسايد روبرو بوديم كه سطح توليد نيتريك اكسايد دردو گروه همسان گرديد.

دو عامل نقش مهمي در ايفاي اثر كشندگي نيتريك اكسايد توسط ماكروفاژها دارند كه به شرط آن مي‌توان بر عفونت ليشمانيا غلبه كرد. 1- ميزان توليد نيتريك اكسايد و 2- زمان حضور نيتريك اكسايد در محيط داخل سلولي ماكروفاژ و پايداري آن در طول دروه عفونت. از آنجا كه ميزان توليد نيتريك اكسايد در گروه‌هاي واكسن BCG تفاوت نداشت، تفاوت زمان حضور نيتريك اكسايد در محيط داخل سلولي ماكروفاژ و پايداري آن در طول دروه عفونت را مي‌توان از بررسي نهفتگي انگل پيش‌بيني كرد. پيامد بررسي ميزان نهفتگي انگل در اعضاي مختلف لنفي- طحال و كبد در زمان‌هاي مختلف نشان دادند كه پس از آلوده‌سازي با ليشمانيا هر دو روش واكسيناسيون BCG قادرند بيشتر از روش ALM+alum به تنهايي مانع گسترش و تكثير انگل ليشمانيا شوند. ضمن آن كه تفاوت معناداري بين گروه‌هاي واكسن BCG و همچنين بين دو عضو مورد مطالعه (كبد و طحال) مشاهده نشد.

به هر حال يافته‌هاي حاصل از سنجش نهفتگي انگل به خوبي با يافته‌هاي اندازه زخم و ميزان توليد نيتريك اكسايد در گروه‌هاي واكسن هماهنگي داشت. در اين بررسي نتايجي كه پيشتر محققان در مورد اثر واكسيناسيون BCG از راه استنشاقي عليه توبركلوزيس ديده بودند در مورد ليشمانيا ديده نشد. شايد نياز باشد كه در تحقيقي ديگر دز واكسيناسيون BCG يا دفعات تجويز آن را افزايش دهيم. با اين حال حتي اگر تفاوتي در اثر حفاظتي واكسيناسيون از راه استنشاقي نسبت به زيرپوستي مشاهده نكنيم، به دليل استفاده نكردن از سوزن در روش استنشاقي واكسيناسيون، از شيوع بيماري‌هاي خطرناكي چون HIV جلوگيري كرده‌ايم.

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

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, immunogenecity, 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 FesharkiR, 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.

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. Treands 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.

37. Lehner T, Bergmeier L, Brooks R, Hussain L,Klavinski L, Mitchell E, Tao L. Genital and rectalmucosal immunity against transmission of SIV/HIV.Kagnoff M. and Kiyono H. Essentials of MucosalImmunology. 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 mucosalimmunology. Kagnoff M. and Kiyono H. Essentials of Mucosal Immunology. London: Academic Press1996; 461-475.