بررسی ایمنی زایی انگل ترانسژنیک لیشمانیا ماژور در موشهای BALB/c

عباس دوستی*[1] و نوشین داودی[2]

۱. دانشجوی Ph.D. ژنتیک مولکولی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
۲. Ph.D فراورده های بیولوژیک، استادیار انستیتو پاستور ایران

* نشانی برای مکاتبه: شهرکرد- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰، doostiiranii@yahoo.com
دریافت مقاله: فروردین هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: تیر هشتاد و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *لیشمانیوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان از شیوع نسبتاً بالایی برخوردار است. این بیماری توسط تک یاخته تاژک داری به نام لیشمانیا ایجاد می شود. ابتلا به لیشمانیوز، پس از بهبودی سبب بروز مصونیت دائمی علیه این بیماری می شود. بنابراین واکسیناسیون بهترین راه کنترل لیشمانیوز می باشد. هدف از این تحقیق، ارزیابی میزان ایمنی زایی سوش مهندسی شده ای از لیشمانیا ماژور در موشهای BALB/c می باشد.*

روش کار: *در این تحقیق از یک سوش لیشمانیای ترانسژنیک استفاده شده که علاوه بر داشتن ژنوم کامل لیشمانیا ماژور ، حامل ژنهای سیستم خودکشی سلولی شامل HSV-tk و Yeast-cd نیز در ژنوم خود می باشد. این انگل مهندسی شده در برابر داروهای گانسیکلوویر و ۵-فلوروسیتوزین از بین می رود در حالی که این دو دارو هیچگونه اثر کشندگی روی لیشمانیا ماژور وحشی ندارند. در این آزمایش ابتدا موشهای BALB/c با انگل ترانسژنیک آلوده شدند و سپس توسط داروهای مذکور تحت درمان قرار گرفتند. سپس میزان ایمنی ایجاد شده علیه لیشمانیا در این حیوانات بررسی گردید.*

یافته ها: *ارزیابی میزان سایتوکاینها از طریق ELISA نشان دهنده افزایش سطح IFN-γ و کاهش IL-4 در موشهای درمان شده می باشد. از طرفی نتایج حاصل از آزمون چالش (challenge) نیز وجود میزان بالایی از ایمنی علیه لیشمانیا را در حیوانات تحت آزمایش تایید می کند.*

کلمات کلیدی: ***لیشمانیا ماژور، ترانسژنیک، گانسیکلوویر و ۵-فلوروسیتوزین***

مقدمه

لیشمانیوز، به گروهی از بیماریهای انگلی ناشی از گونه های مختلف لیشمانیا اطلاق می شود که اشکا ل گوناگونی دارد. لیشمانیا نوعی تک یاخته از خانواده Trypanosomatidae بوده که انگل درون سلولی اجباری می باشد و با نیش پشه خاکی آلوده، به میزبان مهردار منتقل می گردد(۱) و در حدود ۱۰۰ گونه حیوان مخزن آن می باشند. لیشمانیا هنوز یکی از مهمترین عوامل عفونی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان محسوب می شود. تخمین زده می شود که ۳۵۰ میلیون نفر در سطح دنیا در معرض ابتلا به این بیماری قرار دارند و حدود ۱۲ میلیون نفر نیز مبتلا هستند. سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون نفر بیمار جدید در ۸۸ کشور جهان به آن اضافه می گردد که ۹۰٪ آنها مبتلا به لیشمانیوز جلدی می باشند (۲).

لیشمانیوز جلدی که در ایران با نام سالک شناخته می شود، یکی از بیماریهای انگلی بومی ایران است. از آنجا که کشور ما دارای شرایط آب و هوایی مناسب برای رشد و تکثیر ناقلین و مخازن این بیماری است و از طرفی لیشمانیوز محدود به سن و جنس خاصی نمی باشد، لذا این بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار است. روشهای مبارزه با ناقلین و مخازن، کارایی چندانی نداشته و روشهای پیشگیری موثری وجود ندارد. همچنین درمانهای معمول نیز ، صد در صد موثر نیست. همگی این عوامل سبب شده تا لیشمانیوز یکی از مشکلات عمده مناطق اندمیک در سطح جهان باشد و از اهمیت بهداشتی خاصی برخوردار گردد. علی رغم تلاشهای وسیع محققان در سراسر دنیا، تا کنون واکسن موثری علیه لیشمانیا بدست نیامده است (۳).

روش کار

در این مطالعه از دو نوع انگل لیشمانیا ماژور استفاده شد. یکی انگل لیشمانیا ماژورکلون B100 از سوش MHOM/76/IR که این سوش ترانسژنیک دارای دو ژن سیتوزین دآمیناز(cd) و تیمیدین کیناز (tk) می باشد و حساس به داروهای گانسکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین است. همچنین این انگل مهندسی شده به دلیل داشتن دو ژن مقاومت به نورزئوترایسین (NS) و هیگرومایسین (Hyg) درون ژنوم خود، می تواند در مجاورت آنتی بیوتیک های مذکور رشد نماید که جهت جدا سازی سوش ترانسژنیک از سوش وحشی مفید است. انگل دیگر لیشمانیا ماژور Wild type یا وحشی می باشد که همان سوش MHOM/76/IR بدون دستکاری ژنتیکی است که هر دو این انگل ها از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران گرفته شده اند. موشهای BALB/c مورد نیاز در این تحقیق از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران گرفته شد.

گروه های مختلف حیوانات مورد آزمایش به صورت زیر طراحی شدند:

گروه ۱: موشهای آلوده به انگل ترانسژنیک که دارو دریافت می دارند.

گروه ۲: موشهای آلوده به انگل ترانسژنیک که دارو دریافت نمی دارند.

گروه ۳: موشهای آلوده به انگل وحشی که دارو دریافت می دارند.

گروه ۴: موشهای آلوده به انگل وحشی که دارو دریافت نمی دارند.

برای هر یک از گروه های چهارگانه فوق از ۱۶ سر موش BALB/c ماده ۸-۶ هفته ای استفاده شد که به هر یک، انگل لیشمانیا در ناحیه قاعده دم بعد از تمیز کردن با الکل تزریق گردید. قبل از تزریق، انگل ها در سرم فیزیولوژی شسته شده و در حجم معینی از محلول به صورت سوسپانسیون در آورده شدند و پس از شمارش با لام نئوبار، هر موش با تعداد یک میلیون انگل لیشمانیا آلوده شد. هر دو انگل سویه های وحشی و ترانسژنیک به تازگی از موشهای آلوده جدا شدند تا اثرات پاتوژنی خود را هنگام تزریق حفظ کرده باشند. موش BALB/c به صورت ژنتیکی به عفونت L. major حساس می باشد و به این دلیل قادر به کنترل لیشمانیوز جلدی نمی باشد و دچار عفونت منتشر شده و کبد و طحال آن چند هفته بعد از تزریق انگل، آلوده می شود تا جایی که بعد از مدتی در اثر پیشرفت بیماری حیوان از بین می رود.

درمان با داروهای گانسیکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین هر یک با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد. درمان یک هفته بعد از اولین تزریق انگل آغاز شد و به مدت ۱۴ روز ادامه یافت.

تزریق داروهای مذکور به صورت داخل صفاقی (I.P.) انجام گرفت موشهای درمان شده که در ناحیه تزریق انگل هیچ نشانه ای از زخم بروز ندادند، دو هفته بعد از قطع دارو از نظر میزان ایمنی ایجاد شده علیه لیشمانیا، مورد بررسی قرار گرفتند. بدین صورت که موشهای فاقد زخم به دو گروه تقسیم بندی شدند؛

دسته اول بوسیله تعداد یک میلیون انگل لیشمانیا ماژور وحشی بیماریزا، چالش شدند و ایندکس محافظت کننده نسبت به عفونت مجدد توسط اندازه گیری هفتگی قطر زخم بررسی گردید. قطر زخم توسط کولیس ورنیه تا انتهای هفته ۱۲ به صورت هفتگی اندازه گیری شد. همراه با گروه مورد چالش، همزمان یک گروه شاهد که تا کنون با انگل لیشمانیا مواجه نشده اند، مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که حیوانات گروه شاهد هم با تعداد یک میلیون انگل لیشمانیا ماژور وحشی آلوده شدند و پیشرفت بیماری در آنها با حیوانات گروه چالش مقایسه گردید. دسته دوم از سری موشهایی که درمان شده بودند، جهت مشخص شدن الگوی سایتوکاین ها از طریق ELISA بررسی شدند. بدین صورت که موشهای مورد آزمایش در شرایط استریل و زیر هود تشریح گردیده و استخراج طحال صورت گرفت. با تزریق محیط RPMI به کمک سرنگ به داخل طحال های جدا شده، محتویات طحال از آن خارج گردید که این محلول خود حاوی سلولهای لنفوسیتی فراوانی می باشد. پس از شمارش سلولها، غلظت سوسپانسیون سلولی در محیط RPMI طوری تنظیم گردید که در هر میلی لیتر آن $2x10^5$ عدد سلول وجود داشت. برای کشت لنفوسیت ها از پلیت ۲۴ خانه ای مخصوص کشت سلول استفاده شد و در هر خانه آن ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی فوق، ریخته شد. برای کشت لنفوسیت های طحال هر موش ۳ خانه در نظر گرفته شد. بدین ترتیب که در یک خانه آنتی ژن SLA (Soluble Leishmania Antigen) ، در خانه دیگر کونکاوالین A (ConA) و در نهایت خانه سوم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد یعنی به جای آنتی ژن، به آن فقط محیط RPMI افزوده شد. پلیت های مذکور در دمای۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط ۵ درصد CO2 به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. پلیت های کشت سلول در طول مدت گرمخانه گذاری، از لحاظ آلودگی به صورت روزانه با میکروسکوپ مورد بازبینی قرار گرفتند. بعد از رشد سلولها، مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی برداشت گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد و پس از آن به عنوان آنتی ژن در تست ELISA استفاده شد. در سیستم ELISA ، سایتوکاین های IFN-γ و IL-4 با استفاده از کیت نوع Module set ساخت شرکت Bendermed system (USA) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

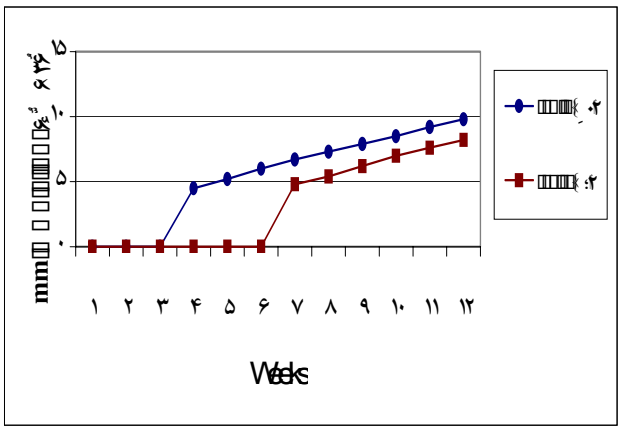
یافته ها

از دو گروه حیوانی که تحت درمان با داروهای گانسیکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین قرار داشتند، همه موشهای آلوده به لیشمانیا ماژور سوش وحشی، پس از گذشت ۳ هفته زخم ناشی از رشد انگل را در محل تزریق انگل (قاعده دم) نشان دادند اما در موشهای آلوده به انگل ترانسژنیک (انگل حساس به دارو) در مدت زمان مشابه هیچگونه ندول یا زخم ناشی از آلودگی با انگل مشاهده نشد. در دو گروهی که هیچگونه دارویی دریافت نمی داشتند و با انگل وحشی و یا ترانسژنیک آلوده شده بودند نیز پس از گذشت ۳ هفته، ظهور زخم دیده شد.

موشهایی که انگل ترانسژنیک در آنها با تزریق دارو تحت کنترل در آمد به دو دسته مساوی تقسیم شدند. دسته اول وارد مرحله چالش گردیدند و دسته دیگر برای انجام ELISA مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور انجام چالش، موشهای واکسینه شده با انگل ترانسژنیک، مجدداً با انگل لیشمانیا ماژور مواجه شدند. به طوری که پس از گذشت ۱۴ روز از زمان قطع دارو، تعداد یک میلیون انگل لیشمانیا ماژور وحشی بیماریزا، به همان محل قبلی (قاعده دم) تزریق شد. یک گروه شاهد (موشهایی که تا کنون با انگل لیشمانیا مواجه نشده اند) نیز با همین تعداد انگل آلوده شد. بررسی بروز زخم در این دو گروه نتایج زیر را به دست داد:

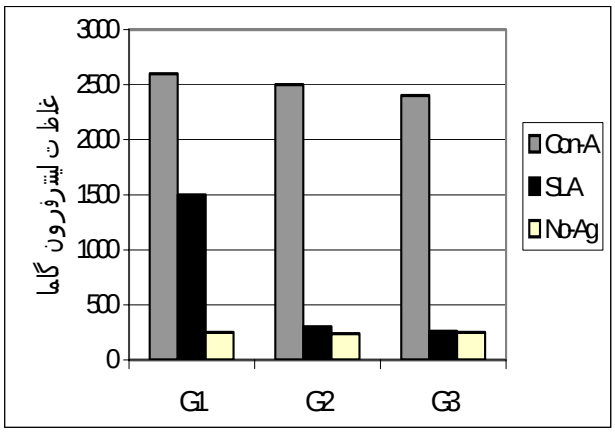
در گروه شاهد پس از گذشت ۳ هفته، ظهور زخم ناشی از لیشمانیا مشاهده شد در صورتی که در گروه واکسینه شده ظهور زخم با تاخیری قابل توجه و با گذشت ۷-۶ هفته از زمان چالش ملاحظه شد. نتایج این مرحله در نمودار شماره ۱ آمده است.

نمودار۱- توزیع موشهای BALB/c بر اساس میانگین اندازه قطر زخم قاعده



بررسی های ایمونولوژیک به روش ELISA، در مورد موشهای واکسینه شده با سوش ترانسژنیک، نشان دهنده پدید آمدن تغییراتی عمده در میزان سایتوکاین های مرتبط با ایمنی علیه لیشمانیوز می باشد. به طوری که سطح IFN-γ در این موشها نسبت به گروه شاهد، افزایش چشمگیری نشان میدهد و از طرفی کاهش میزان IL-4 نیز قابل تامل است. نتایج مذکور در نمودار شماره ۲ ملاحظه می شود.

نمودار شماره ۲- غلظت IFN-γ در سوپرناتانت کشت سلولی طحال موشهای BALB/c.



G1: سطح IFN-γ در موشهای واکسینه شده.
G2: سطح IFN-γ در موشهای با زخم باز.
G3: سطح IFN-γ در موشهای سالم که تا کنون با انگل لیشمانیا مواجه نشده اند.

بحث

انگل لیشمانیا متعلق به راسته کینتوپلاستیدا می باشد و عامل طیف وسیعی از بیماریهاست که شامل عفونت پوستی موضعی تا عفونت احشایی منتشر می شود که غالباً در صورت عدم درمان کشنده است. لیشمانیوز در ۸۸ کشور جهان و از جمله مناطق وسیعی از ایران به صورت اندمیک وجود دارد و کنترل این بیماری از طریق مبارزه با ناقلین و مخازن چندان موثر نبوده است. درمان بیماری نیاز به تزریق مکرر ترکیبات آنتیموان دارد که بعضاً دارای اثرات جانبی است و همیشه موفقیت آمیز نیست(۴). به نظر می رسد بهترین روش مبارزه با این بیماری یافتن واکسن موثر علیه این بیماری می باشد و واکسیناسیون جهت کنترل این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است.

موتانت های غیر بیماریزای حساس به حرارت، انگل های کشته شده با حرارت یا عصاره محلول بدست آمده از پروماستیگوت ها در ایمن سازی موش علیه لیشمانیوز پوستی تا حدی موفقیت آمیز بوده است. اخیراً واکسن های جدیدی نیز گزارش شده است که این واکسن ها شامل پروتئین های نوترکیب لیشمانیایی، وکتورهای نوترکیب بیان کننده آنتی ژنهای لیشمانیایی، سلولهای T ($CD4^+$) اختصاصی علیه لیشمانیا و یا انگل تخفیف حدت یافته ناشی از تعویض ژنها می باشند (۵ و۶). علی رغم تلاشهای زیاد، تا کنون واکسن موثری برای لیشمانیا بدست نیامده است(۷). برای کنترل عفونت لیشمانیایی در هر دو مدل تجربی حیوان و افراد بیمار، بوجود آمدن ایمنی سلولی موثر قادر به فعال کردن ماکروفاژ به حالت میکروبسیدال (میکروب کشی) مورد نیاز می باشد (۳). برای مشخص کردن پارامتر های با اهمیت در بوجود آمدن یک ایمنی حفاظتی به دنبال واکسیناسیون با یک انگل لیشمانیای نوترکیب (حساس به داروهای مجاز) نیاز به طراحی یک مدل حیوانی مناسب می باشد.

در این بررسی پتانسیل استفاده از سیستم ترکیبی ژن-دارو (تیمیدین کیناز- گانسیکلووير و سیتوزین دآمیناز- فلوروسیتوزین) به عنوان بخشی از استراتژی واکسیناسیون در لیشمانیوز مد نظر قرار گرفته است. یعنی با توجه به اینکه ابتلا به لیشمانیوز سبب بروز مصونیت دائمی بر علیه این بیماری می شود، استفاده از لیشمانیزاسیون به عنوان روشی به منظور پیشگیری از عفونت طبیعی، قرنها در بعضی مناطق اندمیک مرسوم بوده است. در این تحقیق، با استفاده از سوش لیشمانیا ماژور ترانسژنیک که دارای دو سیستم خودکشی سلولی cd-FC و tk-GCV می باشد و به داروهای گانسیکلووير و ۵- فلوروسیتوزین حساس است، در موش BALB/c ایجاد عفونت شد و سپس توسط داروهای مذکور، رشد انگل متوقف گردید. موشهای درمان شده پس از درگیر شدن مجدد با لیشمانیا، میزان مقاومت نسبتاً بالایی علیه این انگل از خود نشان دادند. به طوری که زمان بروز زخم در موشهای واکسینه شده نسبت به موشهای واکسینه نشده تا بیش از ۲ برابر به تعویق افتاد. این خود نشان دهنده بوجود آمدن ایمنی حفاظتی در سطحی بسیار بالا در موشهایی است که از نظر ژنتیکی به لیشمانیا ماژور حساس بوده و حتی در صورت عدم درمان ، این انگل موجب مرگ حیوان می گردد. بررسیهای ایمونولوژیک انجام شده نظیر ELISA نیز مؤید نتایج آزمون چالش است و حاکی از پدید آمدن میزان ایمنی مطلوب علیه این عامل عفونی است. نتایج این تحقیق تایید کننده این نظر است که، سیستم ترکیبی ژن-دارو می تواند به عنوان روشی کارآمد در راستای یافتن واکسنی موثر علیه لیشمانیا در تحقیقات آینده مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

REFERENCES

1. Garsia, LS.,(2001) Old world leishmaniasis:
Visceral leishmaniasis. Medical parasitology, ASM press, USA. P: 212

2. W.H.O. workshop and meeting, 12 march 1997. Geneva.

3. Davoudi N, Tate CA, Warburton C, Murray A, Mahboudi F, McMaster WR. Development of a recombinant Leishmania major strain sensitive to ganciclovir and 5-fluorocytosine for use as a live vaccine challenge in clinical trials.Vaccine. 2005 Jan 19;23(9):1170-7.

4. Bogdan,C.,A.Gessner, W.Salbach and M.Rollinghoff. (1996) Invasion,control and persistence of leishmania parasites. Curr.Opin.Immunol, 8:517-25

5. Cox, F. E. G.(1997) Designer vaccines for parasitic diseases. Inter.J.Parasitol , 27:1147-57.

6. Clayton,C.E. (1999) Genetic Manipulation of Kinetoplastida. Parasitology Today, vol. 15, no. 9,372-378.

7. Kenner, JU., Ibbi, A.G. and Kauh, Y.C. (2001). Leishmaniasis. Medicine Journal. 2(8)1-18.