مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ١٤، شماره ١: از ١٧-٢٧
بهار ١٣٩٠

مقایسه تأثیر دو ترکیب آلومینیمی همراه با DNA واکسن حاوی ژن راپتری پروتئین ١ توکسوپلاسما گوندیی سویه RH به‌منظور ایمنی‌زایی و سنجش میزان بقا در مقابل عفونت توکسوپلاسمایی در مدل حیوانی

زهرا اسلامی‌راد[١]، عبدالحسین دلیمی[٢*]، فاطمه غفاری‌فر[٣]، زهره شریفی[٤]

١- استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
٢- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٣- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ٨٩/٠٧/١٧ پذیرش مقاله: ٨٩/١١/١٩

چکیده

هدف: توکسوپلاسموزیس یک بیماری انگلی شایع در سراسر دنیا است که می‌تواند منجر به عوارض شدید در انسان و حیوان شود. تاکنون انواع مختلفی از DNA واکسن‌ها که حاوی یک یا چند آنتی‌ژن این انگل بوده علیه آن مورد آزمایش قرار گرفته است که برخی از آن‌ها مقاومت نسبی ایجاد نمودند. در این مطالعه DNA واکسن حاوی ژن راپتری پروتئین ١ توکسوپلاسما گوندیی به همراه آلومینیم فسفات و آلوم به‌عنوان آدجوانت معدنی استفاده شد و تأثیر آن مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: گروه‌های مختلف موش‌های BALB/c به تنهایی با پلاسمید بیانی حاوی راپتری پروتئین ١ (pcROP1) یا همراه با آلومینیم فسفات و آلوم ایمنی‌زایی شده و سپس شاخص‌های ایمنولوژیک شامل تکثیر لنفوسیت‌های طحالی، سایتوکین‌ها، آنتی‌بادی‌ها و میزان بقا در این موش‌ها اندازه‌گیری و مقایسه شد.

نتایج: در گروهی که DNA واکسن حاوی راپتری پروتئین ١ توکسوپلاسما همراه با آلوم تجویز شده بود، پاسخ ایمنی هومورال و سلولی (نوع Th1) قوی‌تر از گروهی بود که همین DNA واکسن را همراه با آلومینیم فسفات دریافت کرده بود. ولی در گروهی که DNA واکسن حاوی راپتری پروتئین ١ توکسوپلاسما به تنهایی تجویز شده بود، پاسخ‌های ایمنی از هر دو گروه مذکور بالاتر بود.

بعد از چالش موش‌ها، میزان بقا در گروه‌هایی که DNA واکسن مذکور را همراه با آلوم یا به تنهایی دریافت نموده بودند به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ولی میزان بقا در گروهی که همین DNA واکسن را همراه با آلومینیم فسفات دریافت نموده بود، افزایش چشمگیری نشان نداد ($P\leq ٠/٠٥$)

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی حاضر نشان داد که آلوم و آلومینیم فسفات توانایی بالقوه برای افزایش تأثیر DNA واکسن حاوی ژن راپتری پروتئین ١ توکسوپلاسما گونه‌ای را ندارد.

کلیدواژگان: آلوم، آلومینیم فسفات، DNA واکسن، ژن راپتری پروتئین ١، توکسوپلاسما گوندیی

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، کدپستی: ١٤١١٧١٣١١٦
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

۱- مقدمه

توکسوپلاسما گوندیی (*Toxoplasma gondii*) تک یاخته‌ای اجباری داخل سلولی متعلق به شاخه آپی‌کمپلکسا (Apicomplexa) است. این انگل انتشار جهانی داشته و تخمین زده می‌شود که حدود یک سوم انسان‌ها به آن آلوده هستند. این انگل تقریباً تمام انواع سلول‌های مهره‌داران را آلوده می‌نماید. عفونت طی بارداری می‌تواند منجر به سقط جنین و انتقال از مسیر جفت شود. عفونت نهفته (مزمن) در افراد دچار ضعف ایمنی نیز می‌تواند منجر به انسفالیت (اغلب کشنده) شود [۱]. بیماری توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) می‌تواند به زیان‌های اقتصادی در صنعت دامی منجر شود. بنابراین واکسن ضد توکسوپلاسما گوندیی می‌تواند از دو جنبه پزشکی و دامپزشکی بسیار با ارزش باشد [۲].

توکسوپلاسما گوندیی مانند سایر موجودات تک سلولی متشکل از آنتی‌ژن‌های مختلف است. مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های توکسوپلاسما گوندیی آنتی‌ژن‌های پیکره‌ای و دفعی/ترشحی است [۳]. تاکنون انواع مختلفی از DNA واکسن‌ها که حاوی یک یا چند آنتی‌ژن این انگل بودند بر ضد توکسوپلاسما آزمایش شده است [٤]. امروزه توجه به آنتی‌ژن‌های پیکره‌ای کاهش یافته و مطالعات روی آنتی‌ژن‌هایی که اگزو آنتی‌ژن (Exoantigen) یا آنتی‌ژن دفعی/ترشحی نامیده می‌شود تمرکز بیشتری یافته است [٥]. پروتئین‌های ترشحی توکسوپلاسما گوندیی باعث فعال شدن پاسخ‌های ایمنی قوی می‌شود. یکی از این آنتی‌ژن‌ها راپتری پروتئین ۱ (Rhoptry Protein 1: ROP1) توکسوپلاسما است که از اندامک راپتری ترشح می‌شود. ROP1 در محیط کشت سلولی (In vitro) باعث افزایش تهاجم انگل می‌شود [٦]. این پروتئین در تاکی‌زوئیت (Tachyzoites)، برادی زوئیت (Bradyzoites) و اسپوروزوئیت (Sporozoite) انگل بیان می‌شود. این خصوصیت ROP1 را به‌عنوان یکی از کاندیدهای واکسن علیه این انگل مطرح می‌نماید [٥، ٦].

به‌منظور تهیه DNA واکسن بر پایه این آنتی‌ژن در مطالعه قبلی که توسط محققان حاضر انجام شد، پلاسمید کد کننده ژن ROP1 ساخته شد [۷]. به‌منظور افزایش قدرت واکسن‌ها در تحریک سیستم ایمنی از آدجوانت (Adjuvant) استفاده می‌شود. آدجوانت‌هایی که در واکسیناسیون استفاده می‌شود باید سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells) را تحریک نموده، کمپلمان را فعال و سایتوکین‌های افزایش دهنده پاسخ ایمنی را نیز ترشح نماید [۸]. در ابتدا فکر می‌کردند که آدجوانت‌ها عواملی هستند که تولید آنتی‌بادی را افزایش داده و آن را تداوم می‌بخشد ولی شواهد جدید نشان داده که آدجوانت‌ها مقدار، طول دوره، ایزوتایپ و میل ترکیبی آنتی‌بادی را تحت تأثیر قرار داده و بر ایمنی سلولی نیز مؤثر است [۹]. تنها آدجوانت‌های کلاسیکی که توسط انجمن دارو و غذا (Food and Drug Administration: FDA) مورد تأیید قرار دارد نمک‌های آلومینیمی است. آلومینیم هیدروکسید یا آلوم ذراتی (Particles) تشکیل می‌دهد که با واکسن رسوب می‌کند. با این که رسوب ایمنی‌زاها در آلوم جذب آن را افزایش می‌دهد ولی آلوم محرک ضعیفی برای سلول‌های دندریتیک بوده و نمی‌تواند باعث تحریک تولید اینترلوکین ۱۲ (Interleukin 12: IL-12) شود پس به‌نظر می‌رسد که واکسن‌هایی بر پایهٔ آلوم پاسخ‌های ایمنی نوع ۲ را به‌راه می‌اندازد [۱۰، ۱۱]. نتایج مطالعات اخیر نشان داده که مصرف نمک‌های آلومینیمی با DNA واکسن‌ها دوز پلاسمید مورد نیاز برای تحریک پاسخ‌های ایمنی را کاهش می‌دهد ولی تأثیر آن در سوق دادن پاسخ‌ها به سمت ایمنی نوع Th1 هنوز روشن نشده است [۱۲]. با توجه به این‌که مطالعه روی نوع پاسخ‌های ایمنی با تأکید بر نوع آدجوانت‌ها به‌ویژه آدجوانت‌های آلومینیمی (که مورد تأیید FDA است) بسیار کم انجام شده و نتایج قطعی و مشابهی از این مطالعات به‌دست نیامده، هدف مطالعه حاضر، بررسی و مقایسه پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده علیه DNA واکسن حاوی ژن ROP1 توکسوپلاسما گونده‌ای با استفاده از دو نوع آدجوانت آلومینیمی است و به‌منظور فعال نمودن پاسخ ایمنی نوع ۱ (Th1) نیز ایمن‌سازی موش‌ها به روش داخل عضلانی انجام شد [۱۳]. به این منظور میزان مرگ و میر موش‌های ایمن شده بعد از چالش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

و نیز تکثیر سلول‌های طحالی و پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در این موش‌ها ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- موش

تکثیر و نگهداری انگل توکسوپلاسما گوندیی در صفاق موش سوری انجام شد. تمام مطالعات ایمن‌زایی نیز روی موش‌های مادهٔ BALB/c در سن ٦-٨ هفته‌ای (تهیه شده از انستیتو رازی ایران) انجام شد. این موش‌ها تحت شرایط استاندارد نگهداری و تغذیه شدند.

۲-۲- سویه باکتریایی

سویه TOP10 باکتری اشریشیا کولی (*Escherichia coli*) به‌عنوان سلول میزبان در تهیه پلاسمید استفاده شد. باکتری‌ها در محیط کشت جامد یا مایع لوریا- برتانی (Luria-Bertani: LB) که حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین (Ampicillin) بود، کشت داده شدند.

۲-۳- انگل و آنتی‌ژن‌های انگلی

سویه RH انگل توکسوپلاسما گوندیی توسط گروه انگل‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران اعطا شد. تاکی‌زوئیت‌ها با تزریق مکرر به صفاق موش‌های سوری تکثیر شده و انگل‌های به‌دست آمده از مایع صفاقی، پس از جمع‌آوری، سانتریفوژ شده و دو بار با بافر فسفاته (Phosphate Buffered Saline: PBS) استریل شستشو شدند.

آنتی‌ژن محلول تاکی‌زوئیتی (Soluble Tachyzoite Antigen: STAg) انگل توکسوپلاسما که در آزمایش‌های الایزا (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA) و اندازه‌گیری سایتوکین استفاده شد، از طریق سونیکاسیون (Sonication) این تاکی‌زوئیت‌های شسته شده تهیه و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-٤- ساخت پلاسمید

برای استخراج DNA انگل روش فنل- کلروفرم استفاده شد [١٤]. جداسازی و تکثیر قطعه ROP1 توکسوپلاسما گونه‌ای از DNA ژنومی انگل به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد و در این واکنش از یک جفت آغازگر (Primer) به توالی زیر استفاده شد:

جلویی (Forward): 5′-CA GAA TTC ATG GAC TTC GCC TCC GAC GAC-3′

برگشتی (Reverse): 5′-CG CTCGAG TTA CAG ACT GGC ACC ACT TGT-3′

محصول خالص شده PCR بر طبق روش ذکر شده در کیت کلونینگ (InsT/A clone^{TM} PCR production cloning Kit, Fermentas)، به ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T متصل و سپس طبق برنامه به داخل باکتری ترانسفورم (منتقل) شد و به این ترتیب پلاسمید کلونینگ حاوی ROP1 (pT-ROP1) تهیه شد [١٤]. پس از استخراج این پلاسمید، قطعه مذکور طبق برنامه و با استفاده از آنزیم‌های *Eco*RI و *Xho*I در پلاسمید بیانی pcDNA3 ساب‌کلون شده و پلاسمید بیانی حاوی ROP1 (pcROP1) به‌دست آمد [١٤]. تأیید کلونینگ و ساب‌کلونینگ قطعه مذکور با استفاده از روش‌های الکتروفورز روی ژل، PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی مولکولی (Sequencing) انجام شد. پلاسمید تهیه شده به‌وسیله کیت (Endofree plasmid giga kit, Qiagen GmbH) در حجم زیاد استخراج و برای استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-٥- بیان ROP1 در محیط کشت سلولی

به‌منظور بررسی بیان پروتئین مذکور در سلول یوکاریوت، پلاسمید بیانی حاوی قطعه ROP1 در سلول یوکاریوت ترانسفکت (Transfect) شد. برای این منظور از سلول یوکاریوت CHO (Chinese Hamster Ovary) و کیت ترانسفکت (FuGENE 6, Roche) استفاده شد. در هر چاهک ۳۵ میلی‌متری از پلیت شش خانه‌ای تعداد $۱-۳\times۱۰^{٦}$ سلول

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

یوکاریوت درون ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد از سرم جنین گاوی (Fetal Calf Serum: FCS)، ۱۰۰ واحد (Unit) در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میلی‌گرم در میکرولیتر استرپتومایسین (Streptomycin) کشت داده شد و به‌طور شبانه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد. وقتی ۵۰ تا ۸۰ درصد هر یک از چاهک‌ها از سلول پر شد ترانسفکشن (Transfection) بر طبق برنامه کیت انجام شد. سلول‌های چاهک‌های ترانسفکت شده و چاهک‌های کنترل بعد از ٤٨ تا ٧٢ جمع‌آوری و به‌طور جداگانه نگهداری شد. این سلول‌ها برای استخراج RNA و آزمایش PCR معکوس (RT-PCR) استفاده شد. RNA سلول‌های ترانسفکت شده و کنترل با استفاده از کیت (RNX^{TM}(-Plus)Isolation of RNA, Fermentas) استخراج RNA و مطابق با دستور کار آن استخراج شد و سپس با استفاده از کیت (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR) در واکنش تولید کتابخانه ژنومی (cDNA) و RT-PCR استفاده شد.

۲-٦- ایمن‌سازی

موش‌ها به ۷ گروه متشکل از ۷-١٤ موش تقسیم شدند. تزریق به موش‌های گروه‌های ۷ گانه به‌ترتیب با مواد زیر انجام شد.

به گروه اول PBS، به گروه دوم پلاسمید بیانی کلون نشده (pcDNA3)، به گروه سوم پلاسمید بیانی کلون نشده همراه با آلوم (pcDNA3+Alum)، به گروه چهارم پلاسمید بیانی کلون نشده همراه با فسفات آلومینیم (pcDNA3+Alpo4)، به گروه پنجم پلاسمید بیانی حاوی ROP1 (pcROP1)، به گروه ششم پلاسمید بیانی حاوی ROP1 همراه با آلوم (pcROP1+Alum) و به گروه هفتم پلاسمید بیانی حاوی ROP1 همراه با فسفات آلومینیم (pcROP1+Alpo4) تزریق شد. گروه اول تا چهارم به‌عنوان گروه‌های کنترل در کنار ۳ گروه اصلی بررسی شدند. تزریق به‌طور عضلانی در عضله چهار سر موش انجام شد. به هر موش ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمید (۵۰ میکروگرم در حجم ۵۰ میکرولیتری در هر یک از عضلات چهار سر پا) تزریق شد. تزریق‌های یادآور در روزهای ۲۱ و ٤٢ انجام شد.

۲-۷- ایمنی هومورال

در روزهای ۲۱، ٤٢ و ٦٣ بعد از ایمن‌سازی، خون‌گیری از شبکه مویرگی گوشه چشم موش‌ها انجام شد. IgG کل به روش ELISA و ایزوتایپ IgG2a با استفاده از کیت (Mouse monoclonal antibody isotyping) و طبق دستور کار آن اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری IgG کل، ابتدا پلیت (Nunc-Immuno plate, Maxisorp) ٩٦ خانه‌ای مخصوص این آزمایش با ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌ژن محلول انگل پوشانده (Coat) و به‌طور شبانه در ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس بلوک کننده که از شیر خشک فاقد چربی، محلول در PBS حاوی توئین ۲۰ (Tween-20) تشکیل شده بود به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت به‌مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس پلیت با PBS حاوی توئین ۲۰ شستشو و سرم موش‌ها که به نسبت ۱ به ۱۰ در بلوک کننده رقیق شده بود در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو، آنتی‌موس کونژوگه با پراکسیداز که به نسبت ۱ به ۳۰۰۰ در بلوک کننده رقیق شده بود در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو، حجم ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای تترامتیلن بلو (Tetra Methylene Blue: TMB) به هر چاهک (در تاریکی) اضافه شد و پلیت به‌مدت ۲۰ دقیقه به دور از نور انکوبه شد. در انتها به هر چاهک، ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده یعنی اسید سولفوریک ۲ مولار افزوده و میزان جذب‌نوری (Optical Density: OD) هر چاهک در طول موج ٤٥٠ نانومتر با دستگاه قرائت‌گر ELISA (ELISA Reader) قرائت شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

۲-۸- ایمنی سلولی

۲-۸-۱- اندازه‌گیری تکثیر لنفوسیت‌ها

۵ هفته پس از آخرین تزریق، ۵ سر موش از هر گروه کشته شدند. طحال هر موش در داخل پلیت شش سانتی‌متری استریل که حاوی ۵ میلی‌لیتر از محلول سرد فسفاته استریل (٤ درجه سانتی‌گراد) بود، غوطه‌ور و با ته سرنگ له شد. با پیپتاژ کردن، قطعات بافتی حاصل به سوسپانسیون سلولی تبدیل شد و در نهایت این سوسپانسیون به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل منتقل شد. پس از لیز کردن گلبول‌های قرمز با بافر لیز (حاوی کلرور آمونیم ۱۵۰ میلی‌مولار، دی کربنات پتاسیم ۱ میلی‌مولار و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminotetraacetate: EDTA) با نمک سدیم ۰/۰۰۱ میلی‌مولار) سلول‌های طحالی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غوطه‌ور شد. تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول طحال هر یک از موش‌ها در ۳ چاهک از چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای کشت داده شد. هر یک از چاهک‌ها علاوه بر سلول طحال حاوی ٤۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر آنتی‌ژن محلول انگل بود. در چاهک‌هایی که به‌عنوان کنترل مثبت محسوب می‌شد، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر فیتوهماگلوتینین A (Phytohemagglutinin: PHA) نیز اضافه شد. پلیت مذکور به‌مدت ۳ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده و پلیت به‌مدت ٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد. در انتها سوسپانسیون رویی هر چاهک به آرامی برداشته شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ماده دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) به چاهک‌ها افزوده شد و میزان OD هر چاهک در طول موج ٤۵۰ نانومتر قرائت شد و نتایج به‌صورت شاخص تحریک (Stimulation Index: SI) محاسبه و بیان شد [۱۵].

۲-۸-۲- اندازه‌گیری سایتوکین

طحال ۵ سر موش از هر گروه طبق روش ذکر شده در مرحله قبل برداشته شد و سپس تعداد $۱/۵\times۱۰^{٦}$ سلول طحالی هر موش در هر چاهک پلیت ٢٤ خانه‌ای کشت داده شد. این سلول‌ها توسط ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌ژن محلول توکسوپلاسما تحریک شدند. بعد از ۷۲ ساعت محلول رویی هر یک از چاهک‌ها جمع‌آوری و برای اندازه‌گیری اینترفرون گاما (Interferon-gamma: IFN-γ) و IL-4 استفاده شد [١٤]. اندازه‌گیری سایتوکین‌ها با استفاده از کیت و طبق برنامه (R&D) آن انجام شد. OD هر چاهک در طول موج ٤۵۰ نانومتر قرائت شد و نتایج با استفاده از منحنی استاندارد براساس پیکوگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.

۲-۹- چالش

۳ هفته پس از آخرین ایمن‌سازی نیمی از موش‌های هر گروه با ۳×۱۰^{۵} تاکی‌زوئیت انگل به روش تزریق داخل صفاقی چالش شدند. میزان مرگ و میر این موش‌ها ۲ بار در روز ثبت شد.

۲-۱۰- آزمون آماری

برای بررسی آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ١٦ و آزمون من‌ویتنی (Mann-Whitney) استفاده شد.

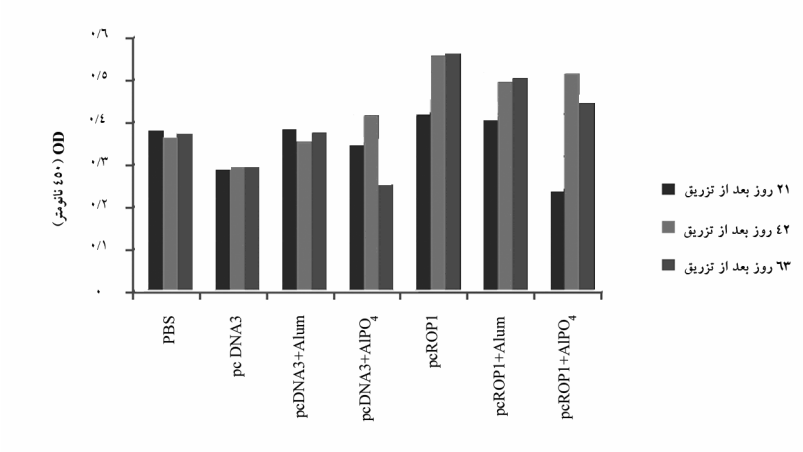
۳- نتایج

در نمودار ۱ نتایج اندازه‌گیری آنتی‌بادی نشان داده شده است. این نتایج تأیید کننده تحریک تولید آنتی‌بادی است. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود ایمن‌سازی با پلاسمید بیانی حاوی ROP1 به تنهایی یا همراه با آدجوانت‌ها باعث تولید مقادیر بیشتر IgG کل می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش دفعات ایمن‌سازی سطح آنتی‌بادی افزایش چشمگیر و معنی‌داری نیافته و غلظت IgG کل بعد از تزریق یادآور دوم (٦۳ روز پس از اولین تزریق) تقریباً بدون تغییر و

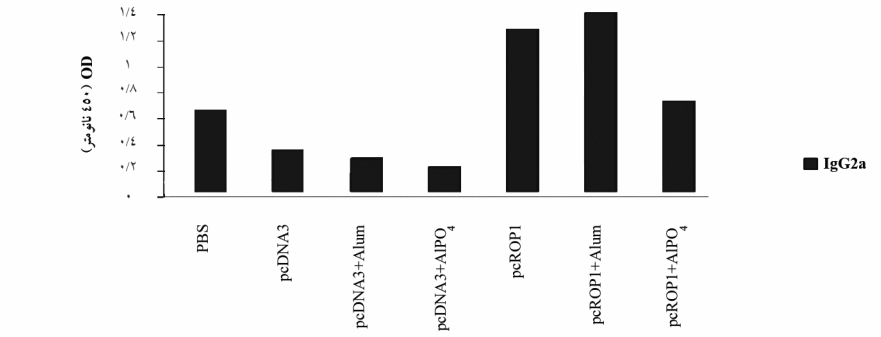
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

نزدیک به‌هم مانده است. همچنین یافته‌های این تحقیق بیانگر آن است که ۲ نوع آدجوانت آلومینیمی که در این مطالعه استفاده شده، در افزایش پاسخ هومورال نقشی نداشته است ($P\leq ۰/۰۵$).

همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود در موش‌هایی که پلاسمید بیانی حاوی ROP1 همراه با آلوم یا بدون آن تزریق شده بود، سطح ایزوتایپ IgG2a آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بیشتر از همه گروه‌های کنترل بود ولی در موش‌هایی که همین پلاسمید همراه با آدجوانت Alpo4 تزریق شد بود، سطح ایزوتایپ IgG2a فقط با گروه‌های کنترلی که pcDNA3 همراه با هر یک از ۲ نوع آدجوانت استفاده شده بود، تفاوت معنی‌دار داشت ($P\leq ۰/۰۵$).



نمودار ۱ سطح IgG کل اختصاصی ROP1 در موش‌های ایمن شده را نشان می‌دهد. سرم موش‌ها در روزهای ۲۱، ۴۲ و ۶۳ بعد از اولین تزریق جمع‌آوری شده بود.



نمودار ۲ سطح ایزوتایپ IgG2a اختصاصی ROP1 در موش‌های ایمن شده را نشان می‌دهد. سرم موش‌ها در روزهای ۲۱، ۴۲ و ۶۳ بعد از اولین تزریق جمع‌آوری شده بود.

جدول ۱ نتایج بررسی ایمنی سلولی شامل MTT و اندازه‌گیری سایتوکین‌ها را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در گروهی که پلاسمید حاوی ROP1 به تنهایی تزریق شده بود، سطح IFN-γ به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

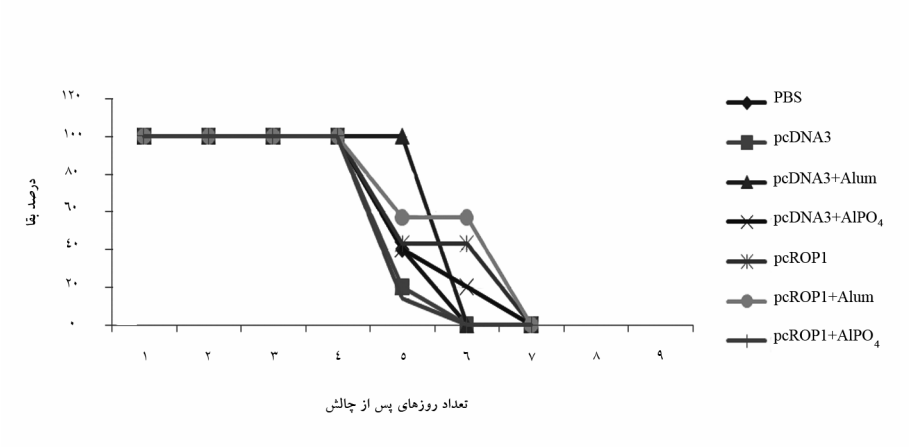
گروه‌ها است. سطح IL-4 نیز در همه گروه‌ها به‌طور چشمگیری پایین‌تر از سطح IFN-γ بوده و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد.

نتایج اندازه‌گیری MTT بیانگر این است که تکثیر چشمگیری در سلول‌های طحالی گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نشده است (P≤۰/۰۵).

جدول ۱ نتایج بررسی پاسخ‌های ایمنی سلولی

گروه‌های تحت مطالعه	SI*	IFN-γ** (پیکوگرم در میلی‌لیتر)	IL4** (پیکوگرم در میلی‌لیتر)
PBS	۱/٦±۰/٤	٤٦/٦١±۱/۷۹	۱۳/۷۳±۳/٦۱
pcDNA3	۱/٤±۰/۵	۱۳۳±۳٦/٦	۱٤/۹٦±۱/۳۸
pcDNA3+Alum	۱/٦±۰/۳	۳٦/۳۵±۱٤/٤	۳٤/۸۱±۱۲/۷
pcDNA3+Alpo4	۱/۲±۰/٤	۳۲۵/۲۵±۳۷/۹	٤۰/۵±۹/۹
pcROP1	۱/۳±۰/۲	۱۱٦۱±۷٦/۱	۱۹/٤٤٦±۱۳/۱
pcROP1+Alum	۱/۷±۰/٤	٤۳۳±۵۱	۱۲/۱±۲/۳٦
pcROP1+Alpo4	۱/٤±۰/٤	٤۲۸/۸±۲٤۳/٦	۱۰/۹±۲/۸

* براساس نسبت میان OD سلول‌های تحریک شده و سلول‌های تحریک نشده به‌دست می آید.
** مقادیر این دو پارامتر بعد از ۲٤ ساعت اندازه‌گیری شده است.
تمام مقادیر جدول براساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.



نمودار ۳ منحنی بقای موش‌های BALB/c بعد از چالش با ۳×۱۰^{۵} تاکی‌زوئیت سویه RH توکسوپلاسما گوندیی (۳ هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی)؛ در هر گروه ۵-۷ موش وجود دارد.

۳ هفته پس از آخرین تزریق، نیمی از موش‌های همه گروه‌ها با ۳×۱۰^{۵} تاکی‌زوئیت سویه بیماری‌زا انگل توکسوپلاسما (RH) چالش شدند. نتایج نشان داد که میزان بقا در گروه‌هایی که پلاسمید حاوی ROP1 را به تنهایی یا همراه با آلوم دریافت کرده بودند، به‌طور معنی‌داری بیش از گروهی است که پلاسمید مذکور را به همراه فسفات آلومینیوم دریافت نموده بودند (P≤۰/۰۵) (نمودار ۳).

٤- بحث

تکنولوژی DNA واکسن می‌تواند در ایجاد پاسخ‌های مختلف و متضاد، توسط اجزای متفاوت سیستم ایمنی استفاده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

شود [۱۶]. DNA واکسن‌ها می‌تواند به‌منظور تولید پاسخ‌های قوی ایمنی نوع Th1 و Th2 در میزبان استفاده شوند. همین خصوصیت DNA واکسن‌ها را به‌عنوان راه حل جدیدی برای مقابله با عفونت‌های انگلی مطرح می‌نماید. زیرا در عفونت‌های انگلی ما به پاسخ‌های ایمنی نیاز داریم که برحسب نوع محافظت مورد نظر قابل طراحی و تغییر باشد [۱۷]. نتایج برخی از مطالعات نشان داده که اکثر DNA واکسن‌های طراحی شده بر علیه انگل توکسوپلاسما قادر به القا و تحریک پاسخ‌های نوع Th1 هستند که این نوع پاسخ همان پاسخ مورد نظر و دلخواه به‌منظور ایجاد مقاومت علیه انگل توکسوپلاسما است [۱۸]. انتخاب نوع آدجوانت در طراحی واکسن از دو جنبه دارای اهمیت است. این دو جنبه شامل خاصیت ایمنوآدجوانتی (Immunoadjuvant) ماده و امکان استفاده از آن در حیوان و انسان است [۱۸]. نمک‌های آلومینیمی رایج‌ترین آدجوانت‌هایی هستند که در واکسن‌های حیوانی و انسانی استفاده می‌شود. مهم‌ترین خصوصیات این آدجوانت‌ها بی‌خطر بودن، ارزان بودن و نیز کارایی آن همراه با طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌ها است [۱۹]. استفاده از نمک‌های آلومینیمی همراه با DNA واکسن‌ها مطلب جدیدی است و مطالعات نشان داده که این نمک‌ها ممکن است جانشین‌های مناسبی برای افزایش اثر این نوع از واکسن‌ها باشد [۱۲].

در مطالعه حاضر اثر دو نوع آدجوانت آلومینیمی (هیدروکسید آلومینیم (آلوم) و فسفات آلومینیم) همراه با DNA واکسن حاوی ROP1 توکسوپلاسما گونده‌ای مقایسه شد. علت انتخاب آلوم به‌عنوان یکی از آدجوانت‌های مورد مطالعه این بود که این ماده سال‌ها است به‌عنوان آدجوانت، همراه واکسن‌های انسانی استفاده شده و مورد تأیید FDA است و علاوه بر این، نتایج برخی از مطالعات که با استفاده از این آدجوانت در ایمن‌سازی بر علیه تریپانوزوم کروزی (*Trypanosoma cruzi*) و توکسوپلاسما گوندیی به‌دست آمده، نشان دهندهٔ تأثیر مناسب این آدجوانت در ایمنی‌زایی بود [۲۰]. عامل مهم ایجاد مصونیت در آدجوانت آلوم، خاصیت ایمنوآدجوانتی آن است که به میزبان امکان می‌دهد پس از تماس با سرعت بیشتری IFN-γ تولید نماید [۱۸، ۲۱]. مطالعات قبلی در موش‌ها نشان داده که ایمنی‌زایی با استفاده از آلوم به‌عنوان آدجوانت، موجب تحریک تولید ایزوتایپ IgG1 می‌شود که یکی از مکانیسم‌های مرتبط با عملکرد Th2 است. برخی از مطالعات نیز نشان داده که وقتی آلوم به‌همراه واکسن‌های نوترکیب یا مصنوعی استفاده می‌شود عملکرد دیگری دارد؛ به‌طوری که مطالعات اخیر نشان داده مصرف نمک‌های آلومینیمی همراه با DNA واکسن‌ها می‌تواند باعث سوق دادن پاسخ‌های ایمنی به سمت Th1 یا حفظ پاسخ مذکور باشد. البته این نتیجه برای برخی از محققان مشخص نشده و این گروه فقط بر تأثیر این آدجوانت در افزایش پاسخ هومورال تأکید می‌نمایند [۱۲]. همان‌طور که در مبحث نتایج ذکر شده در مطالعه حاضر، افزایشی در فاکتورهای مرتبط با پاسخ‌های ایمنی نوع ۲ (Th2) مشاهده نشد. یافته‌های حاضر نشان داد که آلوم و فسفات آلومینیم همراه با DNA واکسن حاوی ROP1 تأثیری در افزایش پاسخ‌های ایمنی Th2 بر علیه انگل توکسوپلاسما نداشته‌اند و به همین دلیل در گروه‌هایی که پلاسمید بیانی حاوی ROP1 به تنهایی یا همراه آدجوانت‌ها استفاده شد سطح IgG کل در مقایسه با گروه‌های کنترل، به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P\leq ۰/۰۵$).

همچنین یافته‌های حاضر نشان داد که در گروه‌هایی که پلاسمید بیانی حاوی ROP1 همراه آدجوانت یا بدون آن‌ها تزریق شده بود، سطح ایزوتایپ IgG2a آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود که این افزایش در گروهی که پلاسمید همراه با آدجوانت آلوم استفاده شده چشمگیرتر بود. نتیجه این مشاهده این است که الگوی ایزوتایپ آنتی‌بادی در مطالعه حاضر به سمت پاسخ ایمنی Th1 میل می‌نماید. این نتیجه با نتایج برخی از مطالعات قبلی همسو و هماهنگ است [۱۸، ۲۲، ۲۳]. همچنین محققان حاضر مشاهده نمودند که در گروه‌هایی که DNA واکسن با یا بدون آدجوانت تزریق شده در مقایسه با برخی از گروه‌های کنترل مقادیر بیشتری از IFN-γ ترشح

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

می‌شود. در حقیقت به‌نظر می‌رسد که تولید مقادیر بالای IFN-γ و IgG2a در گروهی از موش‌ها که پلاسمید بیانی حاوی ROP1 را بدون آدجوانت دریافت نموده‌اند، نمایانگر تمایل پاسخ ایمنی به سمت پاسخ ایمنی نوع Th1 است.

از طرفی یافته‌های مطالعه حاضر در خصوص تکثیر سلول‌های طحالی با مقادیر سایتوکین‌های مورد مطالعه هماهنگی ندارد. باید توجه داشت که روش به‌کار رفته برای ارزیابی تکثیر سلول‌های طحالی در مطالعه حاضر یک روش رنگ‌سنجی با دقت پایین است که عوامل مختلف آن را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد. نکته دوم این‌که در آزمایش MTT که در بررسی حاضر انجام شد به دلیل عدم دسترسی به آنتی‌ژن اختصاصی (ROP1 توکسوپلاسما) از آنتی‌ژن کل (آنتی‌ژن محلول انگل) برای تحریک لنفوسیت‌های طحالی کشت شده استفاده شد که همین می‌تواند در پاسخ آزمایش تأثیر گذار باشد.

به‌منظور ارزیابی مقدار محافظت ایجاد شده توسط پلاسمید حاوی ROP1 توکسوپلاسما، همه گروه‌های مورد مطالعه با انگل توکسوپلاسما چالش شده و مدت بقای آن‌ها با یکدیگر مقایسه شد. در بررسی حاضر محققان با چالش موش‌های گروه‌های مختلف مورد آزمایش و مقایسه مدت بقای آن‌ها با گروه‌های کنترل، میزان مقاومت ایجاد شده علیه انگل توکسوپلاسما ارزیابی شد. مدت بقای موش‌هایی که با پلاسمید بیانی حاوی ROP1 همراه فسفات آلومینیم ایمن شده بودند با گروه‌های کنترل مشابه بود ولی مدت بقای موش‌هایی که با پلاسمید مذکور به همراه آدجوانت آلوم یا به تنهایی تزریق شده بودند نسبت به سایر گروه‌ها طولانی‌تر بود. ممکن است مشاهده کم بودن مدت بقا (مقاومت موش‌ها)، در مطالعه حاضر به علت تعداد انگل و نیز بیماری‌زایی انگل مورد استفاده در چالش باشد؛ زیرا آنگوس (Angus) و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند که موش‌هایی که با پلاسمید حاوی آنتی‌ژن سطحی ۱ توکسوپلاسما (pcSAG1) ایمن شده‌اند در برابر چالش با سویه غیر بیماری‌زای انگل توکسوپلاسما مقاوم شده ولی در برابر سویه بیماری‌زای RH مقاوم نمی‌شوند [۲٤]. همچنین ورکامن (Vercammen) و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که ایمن‌سازی موش‌های C3H با هر یک از ژن‌های ROP2، پروتئین گرانولی ۲ (GRA2) و GRA7 مقاومت نسبی بر ضد سویه غیر بیماری‌زای توکسوپلاسما گوندی ایجاد می‌نماید [۲٤، ۲۵].

مکانیسم عمل نمک‌های آلومینیمی با DNA واکسن‌ها به‌طور کامل شناخته نشده است ولی به‌نظر می‌رسد که با مکانیسم این نمک‌ها با واکسن‌های پروتئینی تفاوت دارد. در واقع، مطالعات نشان داده که در حالی‌که واکسن‌های پروتئینی باید جذب آلومینیم شود، احتمالاً در بیشتر مواقع DNA جذب آدجوانت نمی‌شود [۱۲]. همچنین مطالعات نشان داده که ترکیبات آلومینیمی بیان آنتی‌ژن را افزایش نمی‌دهد ولی مهاجرت و هجوم سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (Antigen-Presenting Cells: APCs) به محل ایمن‌سازی را افزایش می‌دهد [۱۱، ۱۲].

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، آلومینیم هیدروکسید و آلومینیم فسفات توانایی بالقوه افزایش تأثیر DNA واکسن حاوی ROP1 را ندارد ولی این ترکیبات به‌عنوان آدجوانت احتمالی در ایمنی‌زایی علیه توکسوپلاسما قابل استفاده است.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دکتری تخصصی گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه متبوع انجام شده است. نویسندگان از آقایان دکتر احمد زواران‌حسینی و دکتر جاوید صدرایی و خانم دکتر خوش‌زبان و خانم قاسمی‌نیکو بابت همکاری همه‌جانبه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

٦- منابع

[1] Leyva R, Hérion P, Saavedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res 2001; 87(1): 70-9.

[2] Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna MC, Miska K, Sreekumar C, Kwok OC, Shen SK, Gamble HR. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. J Parasitol 2005; 91(5): 1082-93.

[3] Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. Microbes Infect 2003; 5(5): 457-62.

[4] Schaap D, Vermeulen AN, Roberts CW, Alexander J. Vaccination against Toxoplasmosis: current status and future prospects. In: Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Chapter 24. Elsevier 2007: p: 341-61.

[5] Reichmann G, Długońska H, Fischer HG. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. Mol Biochem Parasitol 2002; 119(1): 43-54.

[6] Bradley PJ, Hsieh CL, Boothroyd JC. Unprocessed *Toxoplasma* ROP1 is effectively targeted and secreted into the nascent parasitophorous vacuole. Mol Biochem Parasitol 2002; 125(1-2): 189-93.

[7] Eslamirad Z, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sharifi Z. Cloning rhoptry protein 1 (ROP1) gene of *Toxoplasma gondii* (RH) in expression vector. Arch Razi 2009; 63(2): 11-7.

[8] HogenEsch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. Vaccine 2002; 20 Suppl 3: S34-9.

[9] Rajput ZI, Hu SH, Xiao CW, Arijo AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. J Zhejiang Univ Sci B 2007; 8(3): 153-61.

[10] Rosenthal KS, Zimmerman DH. Vaccines: All Things Considered. Clin Vaccine Immunol 2006; 13(8): 821-9.

[11] Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. Infect Immun 2001; 69(2): 1151-9.

[12] Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Friedman A, Donnelly JJ, McClements WL, Caulfield MJ, Bohannon KE, Volkin DB, Evans RK. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. Vaccine 1999; 18(1-2): 18-28.

[13] Montgomery DL, Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. DNA vaccines. Pharmacol Ther 1997; 74(2): 195-205.

[14] Sambrook J, Fritsch EF. Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; chapter 1, p: 32, 123; Chapter 5; p: 25; Chapter 8, p: 18, 95.

[15] Farnandez-Botran R, Vetyickaz V. Methods in Cellular Immunology. 2nd edition, USA CRF Press, 2001; p: 93.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

[16] Ivory C, Chadee K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. Genet Vaccines Ther 2004; 2(1): 17.

[17] Crampton A, Vanniasinkam T. Parasite vaccines: the new generation. Infec Genet Evol 2007; 7(5): 664-73.

[18] Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, De Roodt AR, Guarnera EA, Angel SO. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11(4): 704-10.

[19] Gupta RK, Rost B. Aluminum Compounds as vaccine adjuvants. In: Hagan DT, (Ed). Methods in molecular medicine, Vaccine adjuvant: preparation methods and research protocols. Vol. 42, Boston: Humana Press Inc, 2000; p: 65-89.

[20] Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chioccola VL. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii.* Exp Parasitol 2008; 120(3): 227-34.

[21] Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J. Immunization with E. coli produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with Toxoplasma gondii. Vaccine 1998; 16(13): 1283-9.

[22] Fatoohi AF, Cozon GJ, Greenland T, Ferrandiz J, Bienvenu J, Picot S, Peyron F. Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii.* Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9(3): 704-7.

[23] Cuppari AF, Sanchez V, Ledesma B, Frank FM, Goldman A, Angel SO, Martin V. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. Vaccine 2008; 26(39): 5040-5.

[24] Angus CW, Klivington-Evans D, Dubey JP, Kovacs JA. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. J Infec Dis 2000; 181(1): 317-24.

[25] Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, Verschueren H. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. Infect Immun 2000; 68(1): 38-45.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]