

بررسی پاسخ ایمنی علیه لیشمانیوز جلدی با ایمن سازی به وسیله میکروسفرهای آلزینات حاوی لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده و ادجوانتهای ساپونین و CpG-ODN

دکتر ابراهیم حاجی^۱ - دکتر نبی شریعتی فر^۲ - دکتر محسن تفقدی^۳ - زینب سالاری^۴

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز یک بیماری انگلی است و عامل آن انگل تک‌یاخته داخل سلولی به نام لیشمانیا می‌باشد. ایمنی محافظتی در برابر لیشمانیوز ایمنی سلولیاست؛ نتایج کار آزمایشی بالینی واکسن لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده، میزان اثربخشی پایینی نشان داده است. میکروسفرهای تهیه شده از آلزینات یکی از سامانه‌های دارورسانی هستند که قدرت رساندن آنتی‌ژن به محل اثر مناسب را دارند و به عنوان ایمنو ادجوانت مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از ادجوانتهایی مثل ساپونین و الیگوداکسی نوکلئوتیدهای سیتوزین-فسفات-گوانین (CpG-ODNs) در سیستم میکروسفری، باعث افزایش قدرت ایمنی‌زایی فرمولاسیون می‌شود. مطالعه حاضر با هدف تعیین پاسخ ایمنی لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده (ALM) و محصور شده در میکروسفرهای آلزینات به همراه ادجوانتهای ساپونین و الیگوداکسی نوکلئوتیدهای CpG در موش‌های balb/c برای مشخص کردن فرمولاسیون مناسب‌تر جهت واکسیناسیون انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۵ و در پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد، اثرات ساپونین و CpG بر روی ایمنی ایجاد شده در موش Balb/c آلوده شده به انگل لیشمانیا مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام این پژوهش پس از تهیه فرمولاسیون‌های مختلف واکسن با این دو ادجوانت، به گروه‌های مختلف موش تزریق گردید و اثرات آن بررسی گردید.

یافته‌ها: مقدار آنتی‌بادی IgG total و IgG2a در موش‌های بلب سی ایمن‌سازی شده با فرمولاسیون‌های حاوی ادجوانت، به طور معنی‌داری بیشتر از بقیه فرمولاسیون‌ها بود ($P < 0.001$). در فرمولاسیون حاوی ساپونین عیار IgG2a بالاتری از فرمولاسیون حاوی CpG ایجاد نموده است ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد فرمولاسیون‌های میکروسفری که حاوی ساپونین هستند به عنوان یک یاور ایمونولوژیک مناسب برای ALM باعث تحریک بیشتر پاسخ ایمنی سلولی در مقایسه با فرمولاسیون‌های بدون ساپونین می‌شوند و CpG نیز خاصیت ایمنو ادجوانتی بالایی نشان داد.

کلید واژه‌ها: واکسن؛ لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده (ALM)؛ میکروسفر؛ لیشمانیا ماژور؛ ساپونین؛ CpG-ODN

افق دانش؛ مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد (دوره ۱۳؛ شماره ۴؛ زمستان سال ۱۳۸۶)

دریافت: ۱۳۸۷/۴/۱۲ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۳/۷ پذیرش: ۱۳۸۷/۳/۲۱

^۱ نویسنده مسؤول؛ داروساز، دانشکده علوم پزشکی گناباد، مدیریت غذا و دارو

آدرس: گناباد- دانشکده علوم پزشکی گناباد تلفن: ۰۵۳۵-۷۲۲۵۸۱۳ پست الکترونیکی: drhajie@yahoo.com

^۲ داروساز، دانشکده علوم پزشکی گناباد

^۳ متخصص فارماسوتیکس، استادیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۴ کارشناس علوم اجتماعی، دانشکده علوم پزشکی گناباد

مقدمه

لیشمانیوز، نوعی بیماری است که توسط یک انگل تک‌یاخته داخل سلولی به نام لیشمانیا ایجاد می‌شود و به صورت یکی از انواع پوستی (سالک)، احشایی (کالا آزار) و مخاطی-پوستی بروز می‌نماید. با توجه به این که انگل از نظر ژنتیکی زندگی دوگانه‌ای دارد، مشکلاتی را در تهیه واکسن ایجاد می‌کند (۱).

انگل لیشمانیا وارد ماکروفاژ فرد آلوده می‌شود و در صورتی که فرد از نظر ژنتیکی مقاوم باشد، پاسخ سلول‌های T کمکی نوع ۱ (Th1) که از دسته سلول‌های لنفوسیت T نوع CD4⁺ است، القا می‌شود که این سلول‌های Th1 باعث تولید اینترفرون گاما (IFN- γ) و اینترلوکین ۲ می‌شوند.

پاسخهای سلول‌های T کمکی نوع ۲ (Th2)، آنتی‌بادی‌های خونی و ترشحاتی IgE و ساتیوکاین‌های اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و اینترلوکین ۴ (IL-4) تولید می‌کند که باعث ایجاد ایمنی هومورال می‌شوند. میکروسفرها به عنوان یک سامانه دارورسانی جدید بعد از ورود به بدن توسط ماکروفاژها بلعیده می‌شوند و سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند و بنابراین در مواردی که آنتی‌ژن توسط سیستم ایمنی شناسایی نمی‌شود، می‌توان از میکروسفر استفاده کرد. آلژینات پلیمری از دسته پلی ساکاریدها است که از جلبک قهوه‌ای به دست می‌آید و ۴۰٪ وزن خشک آنها را تشکیل می‌دهد. اسید آلژینیک کopolymer خطی آنیونی با خاصیت هیدروفیلیک است و در pH ۱۰-۴ پایدار است (۲).

میکروسفر آلژینات، غیر سمی، ارزان، در دسترس و محلول در آب است. این میکروسفر اثر ادجوانتی نیز دارد که می‌تواند باعث افزایش پاسخ‌دهی سیستم ایمنی شود. برای تهیه میکروسفر آلژینات از روش امولسیون‌سازی آب در روغن (W/O) استفاده می‌شود (۳). ادجوانت‌های با خاصیت تحریک Th1، پاسخ ایمنی با واسطه سلولی ایجاد می‌کنند که IgG2a تولید می‌کند. ادجوانت‌هایی که سبب تحریک Th2 می‌شوند، ایمنی هومورال را تقویت می‌کنند (۴، ۵).

ادجوانت‌های ذره‌ای، برای داشتن اثر باید حاوی ایمونوژن باشند یا این که به آنها چسبیده باشد و به شکل ذرات میکروسکوپی هستند (۱). ادجوانت‌های غیر ذره‌ای که اثر و فعالیت این ادجوانت‌ها وابسته به طبیعت ذره‌ای آنها نیست و

همراه با ادجوانت‌های دیگر اثر آنها بهبود می‌یابد، در تهیه میکروسفر اندازه ذره‌ای اهمیت زیادی دارد و اگر میکروسفرهای کوچکتر از ۱۰ میکرون داشته باشیم، ایمنی‌زایی بیشتری ایجاد می‌کند. در صورت تجویز همزمان میکروسفرها با بقیه ادجوانت‌ها، می‌توان اثر ادجوانتی آنها را افزایش داد (۴، ۶).
ساپونین‌های مورد استفاده در تحقیقات واکسنی، حاوی ترکیبات مختلفی هستند و مخلوط پیچیده‌ای از تری‌ترینوئیدها هستند.

CpG-ODNs*، برای انواع واکسن‌ها ادجوانت‌های مناسبی می‌باشند که به عنوان مثال به واکسن‌های تهیه شده از آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس هپاتیت و ویروس غیرفعال شده آنفلوانزا می‌توان اشاره کرد.

مطالعه حاضر با هدف تعیین پاسخ ایمنی لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده (ALM) و محصور شده در میکروسفرهای آلژینات به همراه ادجوانت‌های ساپونین و الیگوداکسی نوکلئوتیدهای CpG در موش‌های balb/c برای مشخص کردن فرمولاسیون مناسب‌تر جهت واکسیناسیون انجام شد.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۵ و در پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد، ۸ گروه موش ۹ تایی از موش‌های balb/c، توسط فرمولاسیون‌های مختلف (جدول ۱) پس از آماده‌سازی به وسیله سرنگ انسولین به صورت زیر جلدی (SC) در ناحیه پشت، واکسینه شدند. تزریقات سه نوبت و به فواصل سه هفته انجام شد.

- اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی به روش الیزا[†] (ELISA)
خونگیری جهت جداسازی سرم برای الیزا یک مرتبه قبل از تزریق انگل به کف پای موش و یک مرتبه هم بعد از اتمام آزمون چالش انجام شد. سه هفته پس از آخرین تزریق، عیار ایمونوگلوبولین G (IgG) سرم موش‌ها اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری تیتراژ آنتی‌بادی‌های ایمونوگلوبولین G1، G2a و توتال، از روش ELISA استفاده گردید و بر اساس روش توصیه شده کارخانه سازنده کیت الیزا انجام شد.

* Cytosin-Phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotide

† Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

جدول ۱- فرمولاسیون‌های مختلف مورد استفاده در واکسیناسیون

گروه	فرمولاسیون	دوز آنتی ژن - دوز ادجوانت بر حسب میکروگرم
۱	PBS (بافر فسفات نمکی)	-
۲	ALM (لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده)	۰-۱۸۰
۳	مخلوط ALM و ساپونین کیلایا ALM+SAP	۱۷+۱۸۰
۴	میکروسفرهای آلزینات حاوی ALM	۰-۱۸۰
۵	میکروسفرهای آلزینات حاوی ALM مخلوط با محلول CpG-ODN CpG (ALM)+CpG	۲۰+۱۸۰
۶	میکروسفرهای آلزینات حاوی ALM مخلوط با محلول ساپونین (ALM)+SAP	۱۷+۱۸۰
۷	میکروسفرهای آلزینات حاوی ALM و ساپونین (ALM+SAP)	۱۷+۱۸۰
۸	میکروسفرهای آلزینات حاوی ALM و CpG-ODN CpG (ALM+CpG)	۲۰+۱۸۰

هرکدام تعداد پلیت مورد نیاز تهیه گردید و در هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سایتوکاین ریخته شد و درب آنها با نوار چسب محکم شد و از آنها تا روز بعد در یخچال نگهداری شد. روز بعد پلیت‌های روکش داده شده، سه مرتبه با PBS توئین دار شستشو داده شدند؛ سپس به هرکدام از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محلول BSA[†]+PBS Tween+۰/۱ ۰/۰۵٪ اضافه شد و از آنها به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد پلیت‌ها پنج مرتبه شستشو داده شدند. پلیت‌های حاوی نمونه‌های بعد چالش، که ۴۸ ساعته و ۷۲ ساعته بودند، از فریزر بیرون گذاشته شدند تا ذوب شوند. بعد از شستشوی بافر بلوک‌کننده مجدداً ۵۰ میکرولیتر از بافر به چاهک‌های مربوط به اینترلوکین ۴ افزوده شد و ۵۰ میکرولیتر از نمونه افزوده شد تا رقت ۱/۲ حاصل شد. به چاهک‌های مربوط به IFN- γ ۸۰ میکرولیتر از بافر و ۲۰ میکرولیتر نمونه افزوده شد تا رقت ۱/۵ حاصل شد. مقدار ۴۰ میکرولیتر از استاندارد و ۱۶۰ میکرولیتر بافر داخل چاهک ریخته شد و رقیق‌سازی با برداشت حجم ۱۰۰ میکرولیتر انجام شد تا حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر باقی بماند.

استاندارد اینترلوکین چهار موشی با استفاده از BSA+PBS ۰/۱٪ با غلظت ۱۰ میکروگرم در میکرولیتر تهیه شد. استاندارد IFN- γ نیز تهیه شد.

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد رقیق شده در بافر انکوباسیون به چاهک افزوده شد و از آن به مدت دو ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس شستشو انجام شد؛ سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی مونوکلونال BVD6-24G2 کنژوگه

جهت انجام آزمون چالش، پس از کشت و تکثیر انگل و شستشوی آنها با بافر PBS* و انجام شمارش، حجم به گونه‌ای تنظیم شد که در هر ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون انگلی حدود ۳ میلیون انگل زنده باشد و سپس این حجم به وسیله سرنگ انسولین به کف پای چپ موش‌ها به صورت زیرجلدی تزریق گردید و همان مقدار بافر PBS به کف پای راست موش‌ها تزریق شد و سپس قطر پای حیوان هفته‌ای یک مرتبه به مدت ۷۰ روز اندازه‌گیری شد و میزان التهاب زخمها به صورت اختلاف بین قطر پای تزریق شده و قطر پای مقابل برحسب درصد محاسبه گردید.

- تعیین مقدار سایتوکاین‌ها به روش الیزا:

پس از آماده‌سازی غلظت‌های مورد نیاز از آنتی‌ژن لیشمانیایی محلول (SLA) و آنتی‌ژن نوترکیب rGP63، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از هر کدام از آنها به دو چاهک از هر گروه ریخته شد و سپس به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه مقدار ۱۵۰ میکرولیتر محلول لنفوسیتی که حاوی یک میلیون لنفوسیت بود، اضافه گردید. پس از محکم کردن درب پلیت‌ها، داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، مقدار ۱۲۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و فریز شد و بعد از ۷۲ ساعت نیز مقدار ۱۲۰ میکرولیتر دیگر به پلیت جدید منتقل و منجمد شد تا تیتراژ اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها به روش الیزا طبق پروتکل کیت انجام شود. در مرحله روکش‌دهی سایتوکاین‌های اینترلوکین ۴ به غلظت ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر و IFN- γ به غلظت ۱ میکروگرم در میکرولیتر در بافر PBS تهیه شد و برای

[†] Bovin Serume Albumin

* Phosphate Buffer Solution

زیرین اضافه گردید و تا پایین ادامه پیدا کرد تا رفتهای مختلف تهیه شد. از این پلیتها به مدت دو هفته در دمای ۲۷ درجه نگهداری و در روزهای ۳، ۷ و ۱۲ از نظر رشد انگل کنترل شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از عیار آنتی‌بادی‌های IgG نشان داد که در موش‌های ایمن‌سازی شده با فرمولاسیون‌های میکروسفری حاوی آنتی ژن، مقدار IgGtotal و IgG2a به صورت معنی‌داری بیشتر از بقیه گروهها بود ($P < 0/001$) (نمودار ۱ و ۲).

گروه (ALM)+SAP بالاترین عیار IgG1 که شاخص پاسخ Th2 است را ایجاد کرده بود ($P < 0/001$) (نمودار ۳). عیار IgG2a شاخص Th1 است. در مقایسه بین گروههای حاوی ساپونین و CpG، گروههای حاوی ساپونین عیار IgG2a بالاتری ایجاد کرده بود ($P < 0/001$). بیشترین افزایش نسبت IgG2a/IgG1 با گروه ALM مشاهده شد ($P < 0/001$).

تأثیر فرمولاسیون‌های مختلف حاوی ALM در عیار

سایتوکاین‌ها:

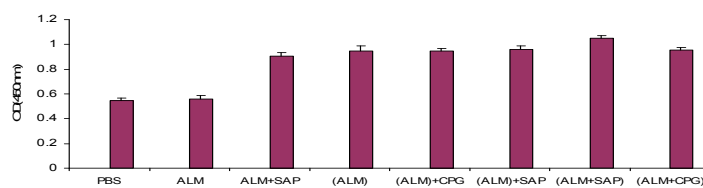
گروه (ALM)+SAP بیشترین عیار IL-4 را ایجاد کرده بود ($P < 0/001$) (نمودار ۵). در بررسی عیار $IFN-\gamma$ در فرمولاسیون‌های مختلف (نمودار ۶)، گروه (ALM)+SAP بیشترین عیار سایتوکاین را نشان داد ($P < 0/001$) (نمودار ۴). آزمون چالش نشان داد که گروه (ALM)+SAP، بیشترین افزایش ضخامت در پای موش را ایجاد کرده بود ($P < 0/001$) (نمودار ۷).

با بیوتین با غلظت ۰/۱ میکروگرم در میکرولیتر در بافر انکوباسیون به هر چاهک افزوده شد و از آن به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰۰ Streptavidin HRP که توسط بافر انکوباسیون رقیق شده بود، به هر چاهک اضافه شد و از آن به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس شستشو داده شد؛ محلول رنگ‌زای Tetramethylbenzidine (TMB) به چاهک‌ها افزوده شد و مدت ۱۵ دقیقه در محل تاریک نگهداری شد.

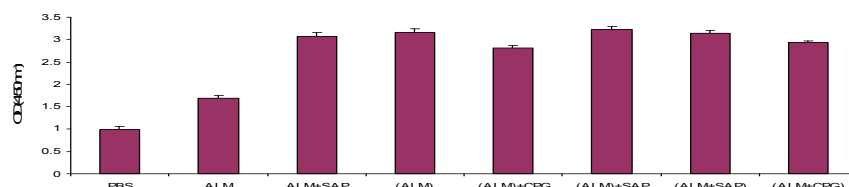
از محلول متوقف‌کننده رنگ استفاده شد و تغییر رنگ در چاهک‌های پلیتها با استفاده از دستگاه ELISA Reader Statfax 2100 در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

نحوه انجام تست بار انگلی (Parasite Burden):

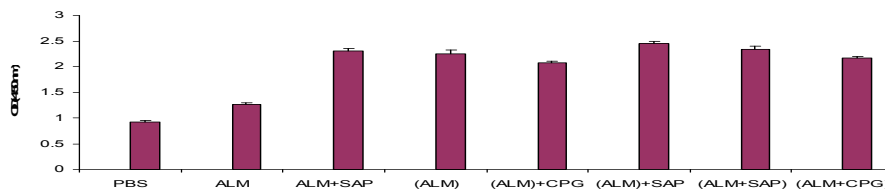
به ازای هر گروه از موش‌های مورد آزمایش یک پلیت ۹۶ خانه در نظر گرفت شد و به هریک از حفره‌های پلیت یک قطره از محیط (Novy-mac NEAL NOcille (NNN) (لاکتواگار، نمک و خون دفیبرینه خرگوش ۰/۱۰) ریخته و در سطح شیب‌دار قرار داده شد (فقط ردیف بالای پلیت جهت آبگوشت طحال خالی نگهداشته شد)؛ سپس از آبگوشت طحال هر موش به دو حفره از ردیف بالای پلیت، به مقدار ۱۴۰ میکرولیتر افزوده شد و سپس مقدار ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI (سرم ۰/۱۰ Fetal Calf Serum (FCS) + ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین + ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین) افزوده شد و سپس از چاهک مربوط به طحال مقدار ۲۰ میکرولیتر برداشته و به چاهک



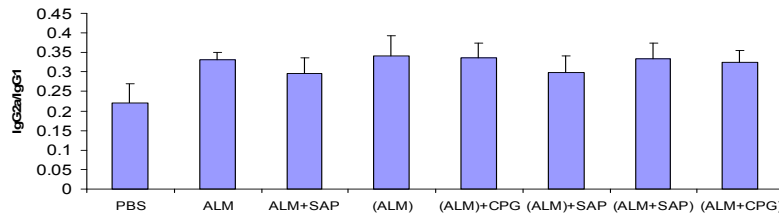
نمودار ۱- عیار IgG2a سرمی در گروههای ایمن‌سازی شده با فرمولاسیون‌های مختلف (تعداد=۳)



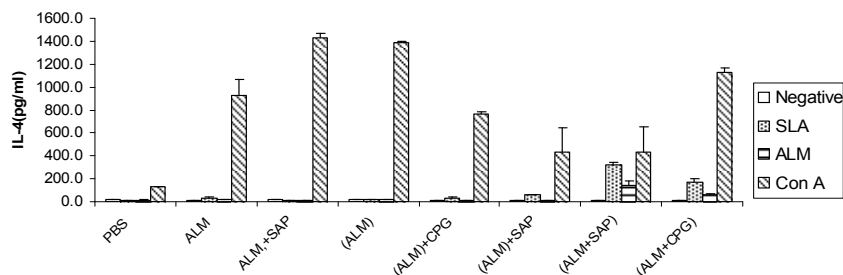
نمودار ۲- عیار IgG1 سرمی در گروههای ایمن‌سازی شده با فرمولاسیون‌های مختلف (تعداد=۳)



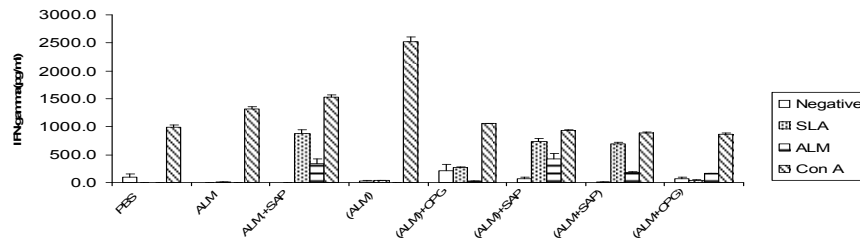
نمودار ۳- عیار IgG total سرمی در گروههای ایمن سازی شده با فرمولاسیون های مختلف (تعداد=۳)



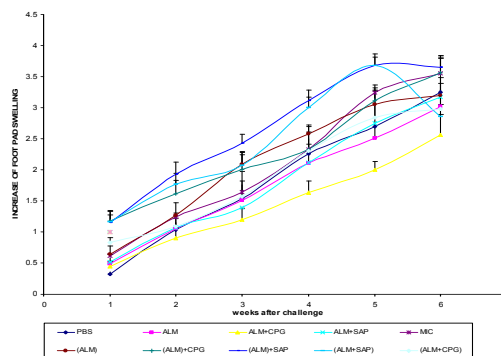
نمودار ۴- بررسی عیار IgG2a/IgG1 در گروههای ایمن سازی شده با فرمولاسیون های مختلف (تعداد=۳)



نمودار ۵- عیار IL-4 در گروههای ایمن سازی شده با فرمولاسیون های مختلف (تعداد=۳)



نمودار ۶- عیار IFN-γ در گروههای ایمن سازی شده با فرمولاسیون های مختلف (تعداد=۳)



نمودار ۷- مقایسه میانگین اندازه زخمهای ایجاد شده در کف پای گروههای موش ایمن سازی شده با فرمولاسیون های مختلف (تعداد=۶)

بحث

پاسخ ایمنی مصونیت‌بخش در لیشمانیا و سایر انگل‌های داخل سلولی از نوع ایمنی با واسطه سلولی و فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NKc) و لنفوسیت‌های TCD4+ می‌باشد که به وسیله تولید اینترلوکین ۲ و IFN- γ نشان داده می‌شود و باعث محافظت میزبان در مقابل انگل می‌گردد. شاخص Th1 که باعث ایمنی سلولی می‌شود، عیار IgG2a است و بنابراین افزایش IFN- γ نیز شاخص ایمنی سلولی است.

شاخص Th2 که باعث ایمنی هومورال می‌شود، عیار IgG1 است و بنابراین افزایش IL-4 نیز شاخص ایمنی هومورال است. افزایش IgGtotal نشان‌دهنده تحریک ایمنی است. عفونی شدن موش‌های حساس با لیشمانیا ماژور، باعث القای Th2 و افزایش آنتی‌بادی IgG1 می‌شود. ویژگی القای پاسخ ایمنی میکروسفرها همراه آنتی‌ژن‌های پروتئینی، می‌تواند به دلیل افزایش جذب آنتی‌ژن‌ها توسط سلول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن نظیر ماکروفاژها و به دنبال آن، ارائه آن به سلول‌های T می‌باشد که این خاصیت در حضور ادجوانت‌های دیگر مثل ساپونین و CpG افزایش می‌یابد.

CpG-ODN بیشتر باعث ایمنی سلولی می‌شود و برای مقابله با عفونت‌های انگلی نقش مهمی دارد. این ادجوانت باعث افزایش بیان کمپلکس سازگاری بافتی نوع II و باعث فعال‌سازی سلول‌های T می‌شود. ساپونین‌ها باعث تحریک سیستم ایمنی می‌شوند و یکی از عوامل تحریک‌کنندگی آنها، اثر میتوززایی روی لنفوسیت‌ها و فعال‌سازی ماکروفاژها می‌باشد (۷).

ساپونین باعث تحریک تولید آنتی‌بادی‌های IgG2a و IgG2b می‌شود و پاسخ اختصاصی CTL* از نوع CD8⁺ را القا می‌کند (۸). میکروسفرها پس از تزریق، به عنوان جسم خارجی توسط ماکروفاژها شناسایی می‌شوند و پس از تخریب میکروسفرها، آنتی‌ژن‌ها در محل سلول‌های هدف آزاد و در نتیجه باعث افزایش پاسخ ایمنی نسبت به آنتی‌ژن می‌شوند. در این بررسی از موش‌های balb/c به عنوان مدل تجربی استفاده شد که از نظر ژنتیکی به عفونت انگل لیشمانیا حساس بوده و در صورت عدم درمان عفونت به صورت سیستمیک درآمده و منجر به مرگ حیوان می‌شود. در بررسی پادتن‌ها افزایش IgG2a که در اثر

* Cytotoxic T Lymphocyte

تحریک توسط IFN- γ ایجاد می‌شود، ایمنی سلولی و افزایش IgG1 که در اثر تحریک توسط IL-4 حاصل می‌شود، ایمنی هومورال را نشان می‌دهد (۸).

علاوه بر این نشان داده شده که موش‌های حساس در صورت عفونی شدن، باعث القای Th2 و افزایش آنتی‌بادی IgG1 می‌شود ولی در موش‌های مقاوم، این فعالیت سرکوب و باعث افزایش Th1 و تولید IgG2a می‌شود. نتایج در رابطه با IgG total (نمودار ۳) مؤید این مطلب است که وقتی ALM به صورت انکپسوله در میکروسفر تجویز می‌شود، افزایش معنی‌داری در تحریک ایمنی نسبت به حالت بدون میکروسفر می‌شود ($P < 0/001$).

در صورت حضور ساپونین و CpG همراه آنتی‌ژن در میکروسفر، گروه حاوی ادجوانت عیار بالاتری نشان داده بود ($P < 0/001$)؛ از طرف دیگر عیار IgG2a که شاخص پاسخ Th1 است، در گروه میکروسفری حاوی ALM بیشترین عیار آنتی‌بادی مشاهده شد. در مقایسه عیار سایتوکاین‌ها، ALM+Sap عیار IFN- γ بیشتری ایجاد کرده بود ($P < 0/001$). در مورد عیار IL-4، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$).

افزودن ساپونین به سوسپانسیون ALM و همچنین به میکروسفرهای حاوی ALM اثر بسیار مثبتی در افزایش پاسخ ایمنی اعم از عیار آنتی‌بادی‌ها و سایتوکاین‌ها ایجاد نموده است. در زمینه جهت‌دهی به پاسخ ایمنی، افزوده شدن ساپونین به ALM (ALM+SAP) توانسته است ضمن عدم ایجاد افزایش در عیار IL-4، عیار IFN- γ را افزایش دهد و از این نظر در هدایت پاسخ ایمنی به سمت ایمنی سلولی موفق عمل نماید، اما در مقایسه نسبت IgG2a/IgG1 چنین اثری معنی‌دار نیست و تاییدکننده ادعای قبلی نمی‌باشد.

افزودن محلول ساپونین به میکروسفرهای حاوی ALM، (ALM+SAP) توانست در مقایسه با میکروسفرهای حاوی ALM به تنهایی ضمن افزایش فراگیر در پاسخ‌های ایمنی، ایمنی را بخوبی به سمت ایمنی سلولی سوق دهد. مقایسه پاسخ‌های ایمنی به دست آمده با فرمولاسیون‌های (ALM)+SAP و (ALM+SAP) حاکی از این است که محصورسازی همزمان ساپونین با ALM در میکروسفرها، اثر بارزی روی عیار آنتی‌بادی‌ها، IFN- γ و آزمون چالش نداشته است. (ALM+SAP)

CpG) (ALM+CpG)، ایجاد عیار بیشتری از IL-4 در مقایسه با CpG را باید به عنوان یک امتیاز منفی برای ساپونین در نظر گرفت. در مجموع با توجه به این نتایج نمی‌توان انتخاب دقیقی بین ساپونین و CpG-ODN انجام داد؛ اما با در نظر گرفتن ارزش اقتصادی دو ادجوانت و گرانی چند صد برابری CpG در مقایسه با ساپونین، می‌توان ساپونین کیلایا را به عنوان یک ادجوانت با قابلیت‌های مثبت فراوان و مقرون به صرفه‌تر از نظر اقتصادی معرفی نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد فرمولاسیون‌های میکروسفری که حاوی ساپونین هستند، به عنوان یک یاور ایمونولوژیک مناسب برای لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده (ALM) باعث تحریک بیشتر پاسخ ایمنی سلولی در مقایسه با فرمولاسیون‌های بدون ساپونین می‌شوند و CpG نیز خاصیت ایمنو ادجوانتی بالایی نشان داد.

توانست در مقایسه با (ALM)+SAP نسبت IgG2a/IgG1 را افزایش دهد و از این نظر در سوق‌دهی پاسخ ایمنی به سمت ایمنی سلولی اثر مثبتی نشان داد؛ از طرف دیگر افزایش عیار IL-4 توسط این فرمولاسیون نتیجه‌ای عکس نتایج بالا را نشان می‌دهد؛ بنابراین در مجموع هر چند ساپونین توانسته است به عنوان یک ادجوانت، اثر بسیار مناسبی در افزایش پاسخ‌های ایمنی و هدایت آنها به سمت ایمنی سلولی نشان دهد اما محصورسازی همزمان آن با آنتی‌ژن، اثر بارزی روی قابلیت ادجوانتی آن ندارد. با توجه به مقایسه فرمولاسیون‌های حاوی دو ادجوانت CpG و ساپونین با در نظر گرفتن عیار سایتوکاین‌ها، گروه (ALM)+SAP با ایجاد عیار بیشتری از IFN- γ و عدم ایجاد تفاوت معنی‌دار در عیار IL-4 و همچنین داشتن نتایج مثبت در آزمون چالش، قابلیت‌های بیشتری از CpG نشان داده است اما با توجه به عیار IgG، با معنی‌دار نبودن تفاوت عیارهای IgG2a، عیار IgG1 بیشتری که توسط (ALM)+SAP در مقایسه با (ALM)+CpG ایجاد شده، به عنوان یک قابلیت منفی در نظر گرفته می‌شود؛ همچنین در مقایسه (ALM)+SAP و

منابع:

- 1- Handman, E. Leishmaniasis: current of vaccine development. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 229-43.
- 2- Gombots WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. Adv Drug Del Rev. 1998; 31: 267-85.
- 3- Lacaille-d Duboise MA. Saponines as immunoadjuvants and immunostimulants. In: Wagner H. (ed). Immunomodulatory agents from plants. Switzerland: Birkhauser Verlag; 1999. pp.243-72.
- 4- Cho NH, Seong SY, Chun KH, Kim Y, Kwon IC, Ahn BY, et al. Novel mucosal immunization with polysaccharide-protein conjugates entrapped in alginate microspheres. J Con Rel. 1998; 53: 215-24.
- 5- Rajesh K, Gupta GR. Adjuvants for human vaccine current status problems and future prospects. Vaccine. 1995; 14: 1263-76.
- 6- Tafaghodi M, Jaafari M, Sajjadi S. Adjuvants in Razi letter. 2004; 6; 34-45.
- 7- Lemoine D, Wauters F, Bouchendhomme S. Microspher containing a model antigen. Int J Pharm. 1995; 176: 9-19.
- 8- Aleth M, Dubois L. Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants. In: Immunomodulatory agents from plants. Wagner H (ed). Mosby; St.Louis: pp. 243-72.

Title: Evaluation of immune response against cutaneous leishmaniasis induced by alginate microspheres encapsulated with autoclaved *Leishmania major* (ALM), Quillaja saponin or CpG-ODN adjuvants

Authors: E. Haji¹, N. Shariatifar², M. Tafaghodi³, Z. Salari⁴

Abstract

Background and Aim: Leishmaniasis caused by compulsory intercellular parasite of leishmania. Suitable immunity for this infection is cellular immunity that depends on CD4+ T cell. Vaccination is a suitable way for controlling the disease and autoclaved leishmania major is a suitable choice for preparation of vaccine against this disease. Particulate drug delivery systems such as microspheres increase the immune response against encapsulated antigen and have immunoadjuvant potential. Alginate microspheres have been used for vaccination in several immunisation studies. Saponins have also shown high immune stimulation potential both for Th1 and Th2. CpG-ODN can be used as an immunity adjuvant for vaccines for increasing the immune responses.

Materials and Methods: In this investigation various formulations of ALM (free or encapsulated in microsphere) with saponin and CpG-ODN adjuvants have been studied to find the best formulation for leishmaniasis vaccine. Also various formulations of ALM (free or encapsulated in microspheres alone or with CpG-ODN or saponin) were injected to balb/c mice. S.C. immunizations were repeated three times in three weeks intervals. For challenge test, after the last immunization, 10⁶ live promastigotes were injected to the left foot pad of mice and foot pad thickness was recorded until 70 days. Serum antibody titers were determined three weeks after the last immunization by an ELISA method. For cytokine assay, the spleen lymphocytes were incubated with recall antigens and IFN- γ and IL-4 titers were determined in culture supernatant with a sandwich ELISA method.

Results: Results of this investigation showed that saponin and CpG have immunoadjuvant property in leishmania vaccine. (ALM)+SAP showed better result in immunostimulation (P<0.001). Addition of saponin and ALM in microsphere (ALM+SAP) increased the concentration of IFN- γ but didn't have significant effect on concentration of IL-4 (P>0.05). Encapsulation of ALM and CpG in alginate microsphere showed higher concentration of cytokines than CpG solution (P<0.001).

Conclusion: So that we can not choice one of these adjuvants is better by results of this investigation and investigation must be continue for better result and selection one of this adjuvant.

Key Words: Leishmania vaccine; Microsphere; Alginate; Quillaja saponin; CpG-ODN; Adjuvant

¹ Corresponding Author; Gonabad University of Medical Sciences. Gonabad, Iran

drhaje@yahoo.com

² Pharmacist; Gonabad University of Medical Sciences. Gonabad, Iran

³ Assistant Professor, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, Faculty of pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ BS. In Social Sciences, Gonabad University of Medical Sciences. Gonabad, Iran