

مقایسه اثر حفاظتی واکسیناسیون مایکوباکتریوم بویس (BCG) به روش مخاطی و زیرجلدی علیه عفونت لیشمانیا ماژور در موش حساس BALB/c

سارا صعودی^۱، M.Sc.، احمد زواران حسینی^۱، Ph.D.، سیما راقتی^۲، Ph.D.، رضا هاشمی فشارکی^۳، Ph.D.، کسری اسماعیل نیا^۲، Ph.D.، سید محمود هاشمی^۱، M.Sc.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی
۲. انستیتو پاستور ایران، گروه ایمنی شناسی
۳. موسسه واکسن و سرم سازی رازی، گروه تک یاخته شناسی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

پست الکترونیک: zavarana@modares.ac.ir

مکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۷/۱۶، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۱/۳

هدف: بررسی اثر حفاظتی واکسیناسیون مخاطی مایکوباکتریوم بویس (BCG) با واکسیناسیون زیر جلدی علیه عفونت لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

مواد و روش‌ها: موش‌های نر BALB/c، شش تا هشت هفته به دو گروه بیست تایی آزمایش و چهار گروه بیست تایی کنترل تقسیم و واکسینه شدند. دو گروه بیست تایی آزمایش با واکسن BCG در دوزهای مناسب از مسیر رکتال و زیرجلدی واکسینه شدند. یک ماه بعد به گروه‌های آزمایش واکسن ALM+alum به شکل زیرجلدی تزریق شد. پس از تزریق یادآور (بیست و یک روز بعد) موش‌ها با تزریق ۱۰^۵ انگل لیشمانیا ماژور در ناحیه کف پا آلوده شدند و روند پیش‌روی زخم به طور هفتگی بررسی شد. پاسخ‌های ایمنولوژیک شامل پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به (Purified Protein Derivatives: PPD)، پاسخ تکثیری سلول‌های طحال و تولید سایتوکاین اینترفرون گاما و اینترلوکین ۵ در مایع رویی کشت سلول‌های طحال گروه‌های آزمایش اندازه‌گیری شد. گروه‌های کنترل شامل گروه‌هایی بود که فقط واکسن ALM+alum یا فقط ادجوانت الوم را به شکل زیر جلدی دریافت کردند، بدون دریافت واکسن فقط با لیشمانیا آلوده‌سازی شدند یا هیچ تیماری درباره آنها صورت نگرفت و به عنوان کنترل محیط در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: تحریک سیستم ایمنی پس از واکسن BCG در هر دو گروه افزایش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری و تولید اینترفرون گاما از سلول‌های طحال را نشان داد. تا سه هفته پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا این تحریک پاسخ ایمنی همچنان با افزایش ضریب تکثیر لنفوسیتی در هر دو گروه حفظ شد. اما پس از آن گروه‌های واکسن BCG نوسان زیادی را در پاسخ‌های ایمنی پشت سر گذاشتند که منجر به غلبه بیماری در گروه BCG زیرجلدی شد. مشخصه آن کاهش معنی‌دار اینترفرون گاما و کاهش ضریب تکثیر لنفوسیتی نسبت به گروه رکتال بود ($p \leq 0.05$). افزایش انگل نیز به طور معنی‌دار نسبت به گروه رکتال در اعضای لنفی مشاهده شد. در مقابل گروه رکتال در روشی متفاوت توانست با حفظ و افزایش پاسخ‌های ضد لیشمانیایی مقاومت بالایی نشان دهد.

نتیجه‌گیری: واکسیناسیون BCG از راه رکتال می‌تواند نسبت به مسیر زیرجلدی پاسخ ایمنی سلولی پایدارتری ایجاد کند و با ممانعت از گسترش لیشمانیا ماژور سبب حفاظت علیه بیماری گردد.

کلیدواژگان: واکسیناسیون، لیشمانیا ماژور، BCG، رکتال، زیرجلدی، مخاطی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۲۴۵-۲۳۸

مقدمه

BCG به عنوان یک باکتری درون سلولی تضعیف شده می‌تواند مکانیسم‌های مرتبط با سیستم ایمنی Type I را به راه اندازد. پس از واکسیناسیون موفق BCG، طیف وسیعی از سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن فعال می‌شوند و قدرت تکثیر بالایی می‌یابند. سلول‌های CD4⁺T و CD8⁺T هر دو به شدت فعال می‌شوند و اینترلوکین ۲ ترشح می‌کنند که به ترتیب سبب ترشح سایتوکاین‌های محرک ماکروفاژ، IFN- γ و حذف سلول‌های آلوده از بدن می‌شوند. BCG به شدت ایمنی هومورال را تحت تاثیر قرار می‌دهد و نسبت IgG2a به IgG1 را به نفع IgG2a بر هم می‌زند (۱).

نخستین بار در سال ۱۹۸۷، ناسی و همکارانش (۲) ایده اثر مثبت BCG به عنوان یک باکتری درون سلولی تضعیف شده می‌تواند مکانیسم‌های مرتبط با سیستم ایمنی Type I را به راه اندازد. پس از واکسیناسیون موفق BCG، طیف وسیعی از سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن فعال می‌شوند و قدرت تکثیر بالایی می‌یابند. سلول‌های CD4⁺T و CD8⁺T هر دو به شدت فعال می‌شوند و اینترلوکین ۲ ترشح می‌کنند که به ترتیب سبب ترشح سایتوکاین‌های محرک ماکروفاژ، IFN- γ و حذف سلول‌های آلوده از بدن می‌شوند. BCG به شدت ایمنی هومورال را تحت تاثیر قرار می‌دهد و نسبت IgG2a به IgG1 را به نفع IgG2a بر هم می‌زند (۱).

طی بررسی کانویت و همکارانش مشخص شد که ایمونوتراپی به وسیله BCG می‌تواند بسیار موثرتر از درمان دارویی با آنتی‌موان باشد. افزون بر این اثرات جانبی در گروه ایمونوتراپی کم (۵/۸ درصد) و

طحال در پاسخ به آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریومی، ترشح بالای سایتوکاین IFN- γ و TNF- α و فعالیت مناسب سلول‌های T سایتوتوکسیک نشان داد که مسیر رکتال می‌تواند مسیر جایگزین مناسبی برای تزریق زیرجلدی یا داخل جلدی باشد و با توجه به شیوع بیشتر عفونت‌های ویروسی (HIV) خطر انتقال پاتوژن‌ها را کاهش دهد. نیاز به بهبود کارایی این واکسن و نتایج حاصل از بررسی در زمینه واکسیناسیون BCG مخاطی سبب طراحی این تحقیق شد. در این تحقیق اثر واکسیناسیون BCG از مسیر مخاطی رکتال بر پیامد لیشمانیوز جلدی در موش BALB/c بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

برنامه واکسیناسیون

به منظور بررسی اثر تجویز واکسن BCG از مسیرهای مختلف برواکسن لیشمانیا، برنامه واکسیناسیون به شرح زیر طراحی شد: واکسیناسیون BCG در روز صفر، واکسیناسیون ALM+alum در روزهای ۲۸ و ۴۹ و آلوده‌سازی با انگل در روز ۶۰ انجام شد. واکسن لیشمانیای اتوکلاو شده به همراه ادجوانت الوم (ALM+alum) از انستیتو رازی تهیه شد. مقدار تزریقی به هر موش ۰/۱ میلی‌لیتر برابر ۴۵۶ میکروگرم پروتیین و ۳۷۶ میکروگرم ادجوانت و محل تزریق آن قاعده دم است. از ادجوانت آلوم (alum)، در ویال‌های ۳۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که از انستیتورازی ایران تهیه شده بود برای کنترل ادجوانت استفاده شد. واکسن BCG(pasture strain 1173-P2)، در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط کشت sauton که حاوی cfu $10^6 \times 20$ در هر میلی‌گرم است، از انستیتوپاستور ایران تهیه شد. انجام این مطالعه به تصویب شورای پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

گروه‌های آزمایش

موش‌های نر ALB/c، ۸-۶ هفته به شش گروه ۲۰ تایی به شرح زیر تقسیم شدند. ده موش از هر گروه به منظور بررسی اندازه زخم تا پایان آزمایش در نظر گرفته شد و ده موش دیگر از همان گروه در فواصل زمانی مختلف به منظور سنجش پاسخ تکثیری و سنجش نهفتگی انگل کشته شدند.

گروه اول، موش‌هایی که واکسن BCG و واکسن ALM+alum را به صورت زیرجلدی (subcutaneous: s.c.) دریافت کردند. گروه دوم، موش‌هایی که واکسن BCG را از راه رکتال و واکسن ALM+alum را به صورت زیرجلدی دریافت کردند. به منظور واکسیناسیون از راه رکتال به موش‌ها در طول شب گرسنگی داده شد و روز بعد با استفاده از سرننگ گاوآژ میزان cfu 10^6 باکتری به آرامی از راه رکتوم وارد بدن موش‌ها شد.

گروه سوم، موش‌هایی که فقط واکسن ALM+alum را به صورت زیرجلدی دریافت کردند (کنترل واکسن لیشمانیا).

گروه چهارم، موش‌هایی که فقط ادجوانت alum را به صورت

خفیف است در حالی که در گروهی که دارو مصرف کرده‌اند برگشت‌پذیری (۵۲/۴ درصد) و وخامت بیماری دیده می‌شود. از سوی دیگر ایمونوتراپی کم هزینه و جایگزین کم خطری برای درمان دارویی در لیشمانیوز جلدی محسوب می‌شود (۴، ۳). به دنبال مشاهده اثر واکسن BCG، بررسی‌ها در این زمینه بیشتر شد و نقش BCG به ویژه در ایجاد پاسخ ایمنی علیه لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفت. کانویت و همکارانش در واکسن تلفیقی از پروماستیگوت‌های کشته شده L.mexicana یا L.braziliensis به همراه M.bovis BCG نقش پیشگیری و درمانی این واکسن ترکیبی را در لیشمانیازیس آمریکای جنوبی نشان دادند. آنها نشان دادند که BCG می‌تواند ایمنی سلولی را به ویژه نسبت به درمان شیمیایی برانگیزد و آن را کاندید مناسبی برای واکسیناسیون و درمان لیشمانیا معرفی کردند (۵، ۶). زمانی که این واکسن در درمان به کار رفت، توانست سبب بهبود بیماران حتی در انواع حاد شود. این اثر درمانی را حاصل ایجاد یک پاسخ ایمنی سلولی نوع I با تولید IFN- γ و عدم تولید اینترلوکین ۴ دانستند.

سرانجام از سال ۱۹۹۱ به دنبال بررسی‌های مشابه در انسان و حیوان آزمایشگاهی و نتایج جالبی که به دست آمد همچنین با توجه به اولویت فعالیت‌های تحقیقاتی WHO در ایجاد روشی مناسب برای واکسیناسیون علیه لیشمانیا، برنامه‌ای منظم به منظور تعیین بی‌خطری (ایمنی)، کارایی و ایمونوژنیسته دوزهای مختلف واکسن L.major کشته شده به همراه مقادیر مختلف BCG طراحی شد (۷).

دولتی و همکارانش به دنبال بررسی‌هایی که پیشتر انجام داده بودند، بی‌خطری و ایمونوژنیسته واکسن BCG را به همراه لیشمانیای کشته شده (Autoclaved Leishmania Major: ALM) با لیشمانیای کشته شده با تایمرسول به همراه انجاماد و ذوب مکرر مقایسه کردند (۸). مدبر و همکارانش (۹) طی یک بررسی به مقایسه اثر تزریق واکسن ALM+BCG در برابر BCG به تنهایی علیه لیشمانیای جلدی انتروپونتیک (انتقال از انسان به انسان) پرداختند.

به هر حال این بررسی‌ها و انواع مشابه، همگی استفاده از واکسن ALM+BCG را مفید می‌دانند، اما کارایی آن را در ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی تایید نمی‌کنند (۱۰). جستجوی راهی که بتواند کارایی واکسن را افزایش دهد پیشنهاد همه محققان است. به این ترتیب هم اکنون در جستجوی ادجوانت‌ها یا مسیرهای تلقیح مختلف هستند تا پاسخ ایمنی قوی‌تری ایجاد کنند (۱۱).

بررسی‌های اخیر که به مقایسه روش‌های مخاطی تلقیح BCG (از راه بینی، داخل معده‌ای، رکتال) با روش زیرجلدی پرداخته‌اند نشان می‌دهند که BCG در مسیر مخاطی پاسخ ایمنی را به گونه‌ای متفاوت فعال می‌کند و واکنش‌های سیستمیک و موضعی که به راه می‌اندازد می‌تواند در مقابله با عفونت درون سلولی مایکوباکتریومی موفق‌تر عمل کند (۱۸-۱۲).

در بررسی ابوالحسینی و همکارانش مشخص شد که استفاده از واکسیناسیون رکتال BCG می‌تواند پاسخ‌های مناسب را همچون مسیرهای زیرجلدی برانگیزد (۱۹). تکثیر بالای لنفوسیت‌ها و سلول‌های

زیرجلدی دریافت کردند.

گروه پنجم، موش‌هایی که فقط با انگل لیشمانیا ماژور آلوده شدند. مقدار انگل، 10^5 انگل L.major فاز ایستا و محل تزریق آن کف پای چپ موش‌ها بود. گروه ششم، موش‌هایی که تنها PBS دریافت کردند.

انجام تست واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری به PPD

به منظور بررسی پاسخ DTH در موش‌هایی که با BCG واکسینه شده بودند، ۲۸ روز پس از واکسیناسیون، ۵ میکروگرم PPD به کف پای راست ۱۰ موش از هر گروه (در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر PBS) و هم حجم آن PBS به کف پای چپ هر موش تزریق شد. قطر کف پا با استفاده از کولیس پس از ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد و درصد افزایش ضخامت پای موش‌ها گزارش گردید (۲۰).

آلوده‌سازی موش‌ها و اندازه‌گیری کف پا

به این منظور میزان 10^5 انگل لیشمانیا ماژور فاز ایستا به کف پای چپ موش‌های گروه آزمایش تزریق و ایجاد و پیش‌روی زخم حاصل از تکثیر انگل هر هفته با استفاده از کولیس بررسی شد. برای تهیه انگل در فاز ایستا، با رسیدن انگل‌ها به تعداد لازم، محیط تازه دیگری اضافه نشد. ورود به فاز ایستا با شمارش متوالی و روزانه انگل‌ها تشخیص داده شد. معمولاً ۴ تا ۶ روز پس از اضافه نکردن محیط تازه انگل‌ها وارد فاز ایستا می‌شود و تعداد آنها در محیط کشت ثابت می‌ماند یا کاهش می‌یابد. هنگامی که انگل‌ها وارد فاز ایستا می‌شوند باید هرچه سریع‌تر استفاده شوند. در غیر این صورت از بین می‌روند.

سنجش پاسخ تکثیری سلول‌های طحال به روش MTT

پاسخ‌دهی سلول‌های طحال نسبت به آنتی‌ژن‌های PPD و BCG، و پس از آلوده‌سازی موش‌ها با انگل L.major سنجیده شد. به این منظور هفته سوم، ششم و نهم پس از آلوده‌سازی، از هر گروه دو موش BALB/c بررسی شد. طحال موش‌ها جدا و هموژن شد. پس از لیز RBC، رسوب باقی‌مانده سلول‌های طحال دو موش در میلی‌لیتر مربع محیط کامل RPMI حاوی ۵ درصد FBS مخلوط شد. سپس سلول‌ها به صورت پنج بار تکرار به میزان 5×10^5 cell/well در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به آنتی‌ژن‌ها اضافه شد. قبل از کشت سلول، آنتی‌ژن‌ها به شرح زیر به چاهک‌ها اضافه شد: کانکاناوالین A (conA) به عنوان کنترل مثبت (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، PPD (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و F/T انگل لیشمانیا ماژور (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). از ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در ردیف کنترل منفی یا بدون آنتی‌ژن استفاده شد.

پس از اتمام دوره انکوباسیون مناسب ۷۲ ساعت برای con A، و ۷ روز برای آنتی‌ژن‌های PPD و لیشمانیای F/T، میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT (۳-۴) و ۵ دی‌متیل‌تترازولیل (۲-۳)

۲- و ۵- دی‌فنیل‌تترازولیم بروماید) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴-۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی این زمان و به دنبال بررسی و تشکیل بلورهای بنفش رنگ زیر میکروسکوپ محلول رویی سلول‌ها به آرامی جمع‌آوری شده و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO، کریستال‌ها حل شد. پس از ۲۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الایزاریدر خوانده و عدد اندیکس تحریکی گزارش شد. برای محاسبه عدد اندیکس تحریکی جذب سلول‌های حاوی آنتی‌ژن‌های محرک یا حاوی میتوژن conA (به عنوان کنترل مثبت) بر جذب سلول‌های بدون آنتی‌ژن (کنترل منفی) تقسیم شد (۲۱). بر این اساس عدد اندیکس تحریکی کنترل منفی یک در نظر گرفته شد.

سنجش نهفتگی انگل

به منظور سنجش میزان تکثیر و پیشروی انگل در موش‌های گروه واکسینه و کنترل، در فواصل زمانی سه، شش و نه هفته پس از آلوده‌سازی موش‌ها با انگل لیشمانیا ماژور، از هر گروه دو موش کشته، طحال، کبد و غدد لنفاوی آن در شرایط استریل خارج شد. قسمتی از این اعضا با وزن مشخص توسط هموزنایزر در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت اشنایدر واجد ۱۰ درصد FCS هموزن شد. سپس به شرح زیر از سوسپانسیون اولیه سریال رقت تهیه گردید.

۰/۹ میلی‌لیتر	۰/۱ →	۰/۱ →	۰/۱ →	۰/۱ →	۰/۱ →	۰/۱ میلی‌لیتر
۱۰ ^{-۴}	۱۰ ^{-۳}	۱۰ ^{-۲}	۱۰ ^{-۱}	۲ میلی‌لیتر	سوسپانسیون اولیه	۲ میلی‌لیتر

از هر رقت میزان ۲۰۰ میکرولیتر به هر چاهک ۹۶ تایی به صورت دو بار تکرار اضافه شد. سپس دور پلیت‌ها با چسب یا پارافیلیم مسدود شد تا از تبخیر در مدت انکوباسیون جلوگیری شود. آنگاه پلیت‌ها به مدت ۷-۱۵ روز در دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مدت پلیت‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند تا در هر گروه و هر عضو بیشترین رقت واجد انگل لیشمانیا به دست آید. آن گاه میزان نهفتگی انگل با فرمول زیر محاسبه شد (۲۲).

وزن عضو/رقت = بار انگل -log

بررسی تولید اینترلوکین پننج (IL5) و اینترفرون گاما (IFNγ) توسط سلول‌های طحالی (با استفاده از کیت R&D)

پس از تهیه محلول‌ها و آماده‌سازی نمونه، با استفاده از کیت R&D اینترفرون گاما و اینترلوکین ۵ محلول رویی کشت سلول‌های طحال به صورت سه بار تکرار اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 11 انجام شد.

این تورم در گروه BCG زیرجلدی به زخم ناگهانی و شدید در سه هفته آخر تبدیل شد و در هفته نهم موش ها کاملاً از بین رفتند. در حالی که در گروه رکتال افزایش تورم در برخی از موش های آن گروه به زخم کوچکی در هفته های شش و هفت تبدیل شد و در برخی موش ها زخمی ایجاد نکرد و اکثر موش های این گروه با کاهش تورم و از بین رفتن زخم، بهبود یافتند. در گروه های کنترل (challenge) ادجوانت (alum) و واکسن لیسمانیا (ALM) شروع تورم با شروع زخم همراه بود که در نهایت منجر به مرگ موش ها شد. مقایسه اندازه زخم گروه های challenge و PBS با سایر گروه ها اختلاف معنی داری نشان داد.

جدول ۱: پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری به PPD در موش هایی که با BCG واکسینه نشده اند. درصد افزایش قطر کف پا (میانگین \pm SD) گزارش شده است (n=10).

گروه های واکسن	زمان	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
PBS		۳/۲ \pm ۰	۲/۸ \pm ۰/۸۶	۴/۳ \pm ۱/۸
rectal		۱۹/۷ \pm ۲/۸	۲۰/۵ \pm ۲/۶	۲۰/۶ \pm ۴/۶
S.C.		۲۴/۴ \pm ۴/۹	۱۳/۹ \pm ۲/۹	۶/۷ \pm ۱/۹

نتایج بررسی تکثیر سلول های طحال

سنجش میزان تکثیر سلول های طحال در گروه های آزمایش متفاوت در حضور محرک های ثانوی شامل F/T، PPD و در حضور میتوزن conA به عنوان کنترل مثبت انجام شد و به شکل عدد اندیکس تحریکی همان طور که در بخش مواد و روش ها آمده است گزارش شد. همان طور که در جدول دو مشاهده می شود، روند تغییر اندیکس تحریکی در گروه های مختلف متفاوت است.

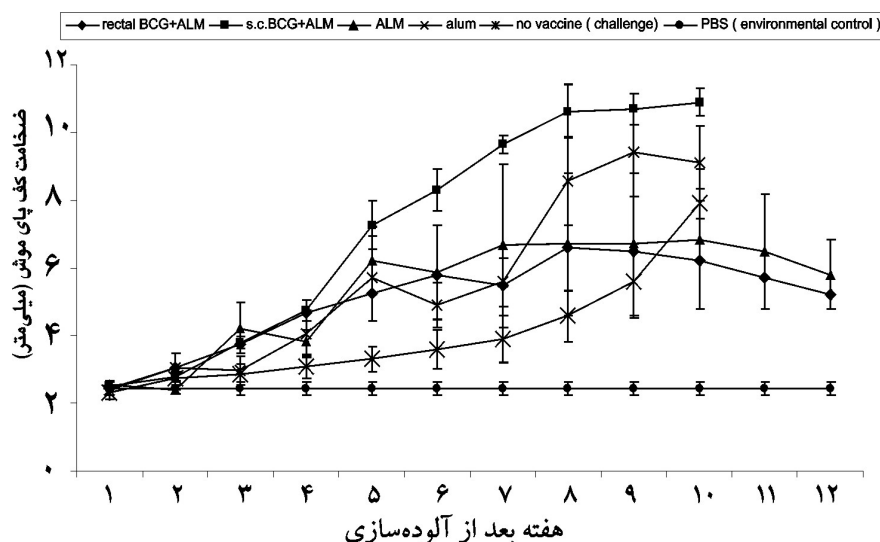
برای رسم نمودار نیز از نرم افزارهای SPSS و Excel استفاده شد. از روند آماری repeated measure در مقایسه اندازه گیری زخم، از آزمون kruskal walis در آزمون های ناپارامتری و در سایر موارد از student t-test استفاده شد. سطح معنی داری در همه موارد $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتیجه بررسی پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به PPD پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به PPD در گروه های واکسینه شده با BCG پس از ۲۸ روز انجام شد تا میزان تحریک حاصل از واکسیناسیون BCG از مسیرهای مختلف مقایسه گردد. بر اساس آزمون General Linear Model و با در نظر گرفتن سطح معنی داری $p < 0.05$ ، بین همه گروه های آزمایش با یکدیگر و با کنترل در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق داخل جلدی PPD اختلاف معنی دار وجود دارد. همان طور که در جدول یک دیده می شود در این فاصله زمانی افزایش پاسخ نسبت به موش های کنترل در گروه های واکسینه مواجه هستیم.

نتایج مقایسه اندازه زخم

با استفاده از روش آماری Repeated measure (برای هفته یک تا هفت) و Friedman (برای هفته هفت تا دوازده) و مقایسه چندگانه (multiple comparison)، میانگین اندازه زخم موش ها (ده موش در هر گروه) در گروه های مختلف واکسیناسیون طی ۱۲ هفته پس از آلوده سازی با یکدیگر مقایسه و سطح معنی داری برابر $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. افزایش تورم بدون زخم در کف پا در گروه های واکسینه با BCG از هفته اول پس از آلوده سازی آغاز شد (نمودار یک).



نمودار ۱: نمودار خطی افزایش ضخامت پای موش (میانگین \pm SD) را تا ۱۲ هفته پس از آلوده سازی در گروه های مختلف نشان می دهد (n=10).

اکثر آنها می‌شود. در حالی که در گروه رکتال در طحال و غده لنفی حضور تعداد کمتری تک یاخته مشاهده می‌شود. شکل یک، تفاوت حضور تک یاخته را در نمونه های مقطع طحال گروه BCG رکتال، گروه BCG زیر جلدی و گروه challenge نشان می‌دهد که به صورت touch smear تهیه شده و با کیت DifQuick رنگ آمیزی شده است.

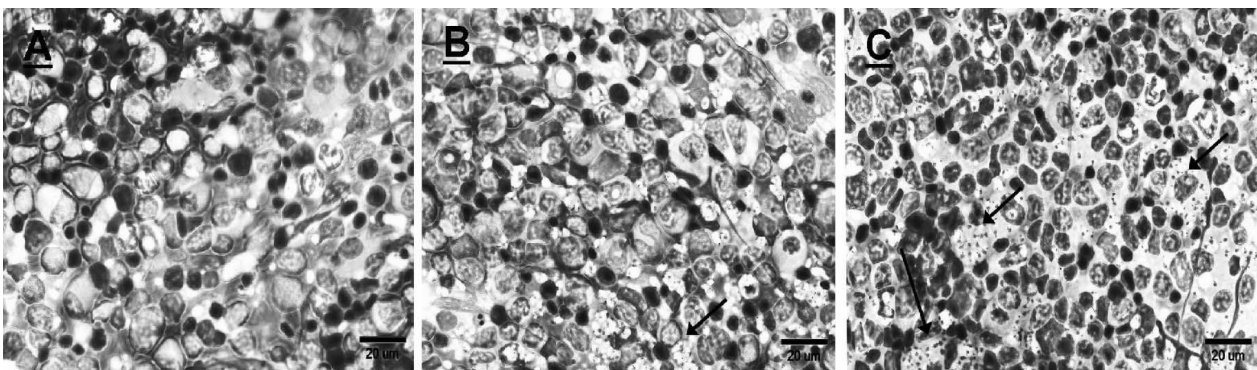
نتیجه تولید سایتوکاین اینترفرون گاما و اینترلوکین ۵

بر اساس نتایج به دست آمده میزان اینترفرون گاما قبل از آلوده‌سازی در گروه‌های واکسن BCG زیر جلدی و رکتال به ترتیب برابر با ۱۱۱/۵ و ۵۱۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر است. پس از آلوده‌سازی این میزان گروه اول به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش می‌یابد در حالی که در گروه رکتال به ۷۳۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر افزایش می‌یابد. میزان اینترلوکین ۵ قبل از آلوده‌سازی در گروه‌های واکسن sc+ALM و ALM+Rکتال به ترتیب برابر با ۸ و ۸/۳ است که پس از آلوده‌سازی تغییر معنی‌داری ندارد. در گروه‌های کنترل ALM و alum کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) اینترفرون گاما و افزایش اینترلوکین ۵ پس از آلوده‌سازی نشان می‌دهند (نمودار سه و چهار).

هفته سوم پس از آلوده‌سازی در گروه رکتال واکسن BCG بیشترین اندیکس تحریکی مشاهده شد. در این گروه و گروهی که از طریق زیر جلدی واکسن BCG دریافت کرده‌اند در هفته ششم کمترین اندیکس تحریکی مشاهده شد. در گروه‌های ALM, alum و challenge از هفته سوم تا نهم اندیکس تحریکی کاهش داشت. به هر حال در طول آزمایش تنها گروه واکسیناسیون رکتال BCG بود که توانست بالاترین اندیکس تحریکی را سه هفته پس از آلوده‌سازی نشان دهد (جدول دو).

نتایج سنجش میزان نهفتگی تک یاخته

میزان نهفتگی تک یاخته در هفته‌های شش و نه در گروه‌های آزمایش انجام شد. از آنجایی که این بررسی‌ها به صورت دوتایی در پلیت‌های ۹۶ تایی انجام شده بود و نتایج در تکرارها برابر بود، خطای استاندارد میانگین یا انحراف معیار در همه موارد صفر خواهد بود. نمودار دو، میانگین نهفتگی تک یاخته را در اعضای لنفی کبد، طحال و گره لنفی نشان می‌دهد. بر این اساس تک یاخته لیشمانیا ماژور از هفته ششم پس از آلوده‌سازی در همه گروه‌ها به جز گروه رکتال، در هر سه عضو لنفی مورد بررسی دیده می‌شود. در هفته نهم تعداد تک یاخته در اعضای لنفی گروه‌های آزمایش افزایش یافته و در نهایت منجر به مرگ



شکل ۱: اسمیرهایی که از مقطع طحال گرفته شده. عدم حضور انگل در گروه رکتال (A)، حضور نسبی انگل در گروه BCG زیر جلدی (B) و حضور فراوان در گروه Challenge (C) در هفته ششم پس از آلوده‌سازی (مشاهده نمونه رنگی تصویر در پایان مقالات)

جدول ۲: میانگین ضریب تکثیر لئفوسیتی در گروه‌های واکسیناسیون در هفته ۶، ۳ و ۹ پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا (بر حسب SI) (طبق فرمول SI کنترل منفی ۱ در نظر گرفته شد). آزمایش‌ها به صورت ۵ بار تکرار انجام شد.

تیمار	۳ هفته بعد از آلوده‌سازی			۶ هفته بعد از آلوده‌سازی			۹ هفته بعد از آلوده‌سازی		
	PPD	F/T	Con-A (کنترل+)	PPD	F/T	Con-A (کنترل+)	PPD	F/T	Con-A (کنترل+)
Rectal+ALM	۶/۶	۱/۴	۵/۴	۱/۳	۱/۲	۲/۳	۲/۹	۲/۵	۴/۸
S.C.+ALM	۱/۸	۱/۵	۱/۲	۱/۲	۱/۳	۱/۷	۲/۶	۲/۵	۴/۸
ALM	۳/۲	۲/۷	۳/۸	۱/۳	۱/۷	۱/۲	۱/۸	۰/۱	۲/۹
Alum	۲/۰	۲/۳	۲/۸	۰/۹	۱/۲	۱/۸	۱/۲	۰/۹	۱/۲
Challenge	۱/۷	۱/۲	۱/۶	۰/۹	۱/۱	۱/۳	۱/۱	۰/۹	۱/۲
PBS	۱/۵	۰/۹	۴/۳	۱/۷	۱/۲	۴/۳	۱/۵	۰/۱	۴/۳

بحث

BCG و لیثمانیا، هر دو از پاتوژن‌های درون سلولی هستند که ویژگی‌های زیر استفاده از BCG را در تحریک سیستم ایمنی به منظور مقابله با لیثمانیا موثر ساخته است. BCG هم می‌تواند همراه با واکسن لیثمانیا به صورت ادجوانت مورد استفاده قرار گیرد و هم به عنوان واکسن آغازگر یا دارو همراه واکسن‌های لیثمانیا مورد استفاده قرار گیرد.

۱. میزبان هر دو آنها ماکروفاژ است. گرچه این دو ارگانسیم در مسیر شبکه اندوزومی پس از فاگوسیتوز توسط ماکروفاژ با هم تفاوت دارند، اما هر یک در سیستم اندوزومی مکانیسم‌های فرار خاص خود را به اجرا در می‌آورند که به هر حال به بروز سیگنال‌های خطر در ماکروفاژ و تحریک ماکروفاژ منجر می‌شود.

۲. بهترین روش حذف و مقابله با این دو ارگانسیم فعال شدن ماکروفاژ به ویژه از راه تولید متابولیت‌های فعال اکسیژن و نیتروژن است. در این میان اثر کشندگی نیتریک اکساید در هر دو غالب است.

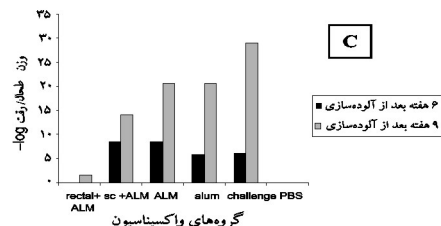
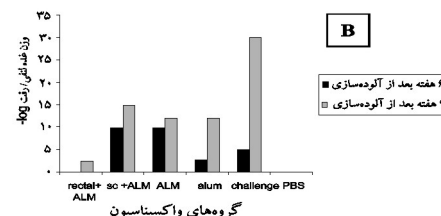
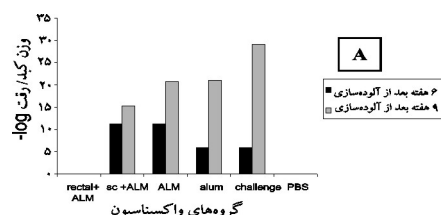
۳. اگر بتوانیم از سویه غیر بیماری‌زا BCG در جهت تحریک ماکروفاژ و سیستم ایمنی استفاده کنیم، توانسته‌ایم سطح فعالیت سیستم ایمنی را نسبت به لیثمانیا هم افزایش دهیم.

۴. علاوه بر موارد فوق، BCG می‌تواند در میزبان درون‌زاد BALB/c پاسخ ایمنی نوع یک ایجاد کند، که همان پاسخ مطلوب در حذف عفونت لیثمانیا است (۲۳).

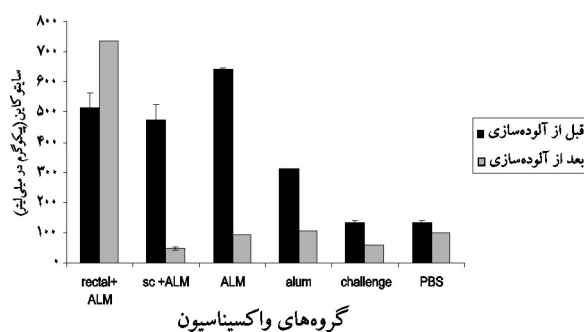
از سوی دیگر با توجه به مطالعات انجام شده معلوم شد که باید واکسن‌های BCG+ALM در فرمولاسیون دیگری مورد استفاده قرار گیرد تا کارایی بیشتری داشته باشد (۲۴). از این رو استفاده از واکسن‌های BCG مخاطی پیشنهاد گردید. غشاهای مخاطی تمام سطح دستگاه تنفسی، گوارشی، ادراری-تناسلی، گوش داخلی و مجاری تمام غدد برون ریز را پوشانده‌اند. این غشاهای حاوی سیستم‌های قدرتمند فیزیکی و شیمیایی برای محافظت از ورود عوامل خارجی به بدن هستند. به علاوه یک سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی وسیع این سطوح را در بر می‌گیرد. ۸۰ درصد سلول‌های ایمنی در سیستم ایمنی مخاطی قرار دارند و پیوسته در حال گردشند (۲۵، ۲۶). به این ترتیب استفاده از واکسن BCG مخاطی چه علیه بیماری توپرکلوزیس باشد چه علیه لیثمانیا یا هر پاتوژن درون سلولی دیگر، به دلایل زیر به روش زیر جلدی برتری دارد:

۱. به کمک ایمن‌سازی مخاطی می‌توانیم سایر اعضای لنفی و سطوح مخاطی دورتر از محل ورود آنتی‌ژن را ایمن‌سازی کنیم. یعنی با وارد ساختن آنتی‌ژن به مسیر گوارش می‌توانیم مسیر تنفسی، طحال و سایر قسمت‌ها را نیز در زمان کمتری نسبت به آن آنتی‌ژن ایمن‌سازی کنیم. چرا که سلول‌های ایمنی و فرآورده‌های آنها در سیستم مخاطی در حال گردشند و پیام خود را در بدن منتشر می‌کنند.

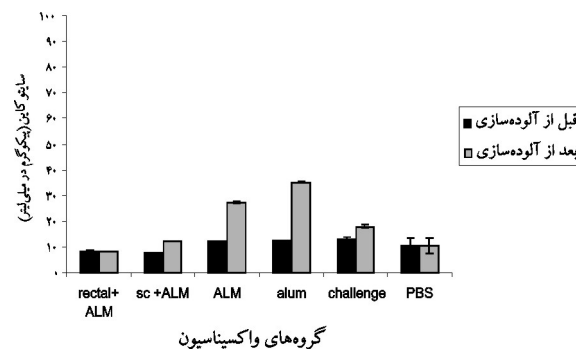
۲. مسیرهای مخاطی به دلیل آن که محل ورود پاتوژن‌ها هستند، پیوسته از یک سیستم دفاعی فعال برخوردارند. یعنی طیف وسیعی از سلول‌های ایمنی در این محل آماده به فعالیت هستند. از این رو BCG از مسیر



نمودار ۲: میانگین میزان نهفتگی انگل را در کبد (A)، کره لنگی (B) و طحال (C) گروه‌های واکسینه در هفته ششم و نهم پس از آلوده‌سازی نشان می‌دهد. از هر گروه دو موش انتخاب و آزمایش‌ها به صورت دو بار تکرار انجام شد.



نمودار ۳: میانگین سابتوکاین $IFN-\gamma$ در مایع رویی کشت سلول‌های طحال گروه‌های واکسینه قبل و بعد از آلوده‌سازی با لیثمانیا. از هر گروه ۲ موش انتخاب و آزمایش‌ها به صورت ۳ بار تکرار انجام شد.



نمودار ۴: میانگین سابتوکاین $IL-5$ انحراف معیار در مایع رویی کشت سلول‌های طحال گروه‌های واکسینه قبل و بعد از آلوده‌سازی با لیثمانیا. از هر گروه ۲ موش انتخاب و آزمایش‌ها به صورت ۳ بار تکرار انجام شد.

شود، در حالی که هنوز کبد دور از دسترس انگل قرار دارد. این یافته‌ها با تشکیل نشدن زخم و کاهش پیشروی آن در ارتباط است. ضریب تکثیر لنفوسیتی روند افزایش-کاهش-افزایش را در سه زمان مورد بررسی نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که گرچه BCG از مسیر رکتال، تولید اینترفرون گاما را قبل از آلوده‌سازی تا حد زیادی تحریک نکرده است اما پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا توانسته تا حد زیادی پاسخ ایمنی ایجاد شده را حفظ کند و مانع سیستمیک شدن وسیع انگل شود. استفاده از دوزهای متفاوت واکسن BCG، تغییر فاصله زمانی بین دو واکسیناسیون و انجام واکسیناسیون در گروه‌های سنی مختلف و بررسی پاسخ‌های ایمنولوژیک می‌تواند زمینه بررسی‌های بعدی باشد.

نتیجه‌گیری

واکسن BCG مخاطی می‌تواند پاسخ موثر در حذف عفونت لیشمانیا ماژور را بهتر از روش زیرجلدی تحریک کند. به علاوه از یک مزیت همیشگی نسبت به روش تزریق زیرجلدی BCG برخوردار است و سبب کاهش شیوع عفونت‌های تزریقی و عوارض لنفادنیت می‌شود.

تقدیر و تشکر

از گروه تک یاخته‌شناسی و گروه توپروکلین موسسه واکسن و سرم سازی رازی و گروه ایمنی‌شناسی انستیتو پاستور تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Young S, O'Donnell M, Lockhart E, Buddle B, Slobbe L, Luo Y, De Lisle G, Buchan G. Manipulation of immune responses to Mycobacterium bovis by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin. *Immunol Cell Biol* 2002; 80(3): 209-215
2. 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): 1707-1714
3. Convit J, Castellanos PL, Rondon A, Pinardi ME, Ulrich M, Castes M, Bloom B, Garcia L. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1987; 1(8530): 401-405
4. Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Borges R, Aranzazu N, Valera M, Villarreal H, Zapata Z, Tomedes I. Immunotherapy of american cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97(4): 469-472
5. Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical

مخاطی سریع‌تر در دسترس سلول‌های ایمنی (ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌ها) قرار می‌گیرد.

۳. از آنجایی که ورود BCG از مسیر مخاطی می‌تواند بخش‌های مختلف و سلول‌های مختلف را درگیر کند، با تنوع پاسخ روبرو هستیم. پس در درگیری سیستم ایمنی با BCG و لیشمانیا شانس انتخاب پاسخ بهتر افزایش خواهد یافت.

۴. همچنین بررسی‌هایی که تا کنون انجام شده نشان می‌دهد که استفاده از BCG مخاطی می‌تواند با هدایت پایدارتر پاسخ‌های ایمنی به طرف نوع یک، علیه توپروکلوزیس مفید باشد (ایمن سازی oral با باکتری‌های درون سلولی مثل BCG و سالمونلا هم پاسخ نوع یک و هم پاسخ نوع دو را فعال می‌کند. اما پاسخ نوع دو توام با تولید IL-4, IL-5 نیست بلکه بیشتر نوعی تعدیل ایمنی با ترشح IL-10 است) شواهد دیگر نیز عدم تفاوت پاسخ ایمنی پس از واکسیناسیون از دو مسیر مخاطی و زیرجلدی را نشان می‌دهند (۱۸-۱۵، ۲۱).

در این تحقیق مشخص شد در گروه رکتال که از انتهای رکتوم با BCG واکسینه شده‌اند BCG‌هایی که در انتهای مسیر گوارشی کلون شده‌اند عامل تحریک سیستم ایمنی هستند. تحریک سیستم ایمنی قبل از آلوده‌سازی با لیشمانیا سبب افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری برابر ۱۹/۷ درصد و تولید اینترفرون گاما و اینترفرون لوکین ۵ به ترتیب برابر ۵۱۵ و ۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر می‌شود. بعد از آلوده‌سازی با لیشمانیا میزان تولید اینترفرون گاما به ۷۳۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر افزایش می‌یابد. تا هفته نهم پس از آلوده‌سازی هیچ‌انگلی در طحال، کبد و غدد لنفی دیده نمی‌شود. در هفته نهم و دوازدهم انگل توانسته وارد طحال و غدد لنفی

aspect. *Clin Dermatol* 1996; 14(5): 425-431

6. Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, Castes M, Rondon A, Pinardi ME, Rodriguez N, Bloom BR, Formica S, Valecillos L. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1989; 160(1): 104-115

7. Steigerwald M, Moll H. Leishmania major modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect Immun* 2005; 73(4): 2564-2567

8. Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Alimohammadian MH, Khamesipour A, Ehsasi S, Hashemi-Fesharki R, Ale-Agha S, Modabber F. Comparative safety and immunogenicity trial of two killed Leishmania major vaccines with or without BCG in human volunteers. *Clin Dermatol* 1996; 14(5): 489-495

9. Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, Modabber F. Randomised vaccine trial of single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic

- cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 1998; 351(9115): 1540-1543
10. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2): 229-243
 11. Mahmoodi M, Khamesipour A, Dowlati Y, Rafati S, Momeni AZ, Emamjomeh M, Hejazi H, and Modabber F. Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with low dose of BCG. *Clin Exp Immunol* 2003; 134(2) 303-308
 12. 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): 1186-1195
 13. 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): 223-226
 14. Aldwell FE, Baird MA, Fitzpatrick CE, McLellan AD, Cross ML, Lambeth MR, Buchan GS. Oral vaccination of mice with lipid-encapsulated *Mycobacterium bovis* BCG: anatomical sites of bacterial replication and immune activity. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(5): 549-553
 15. Aldwell FE, Keen DL, Parlane NA, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Oral vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in brushtail possums. *Vaccine* 2003; 22(1): 70-76
 16. 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): 3223-3229
 17. 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): 274-279
 18. 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): 238-246
 19. 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): 5657-5662
 20. Abou-Zeid C, Gares M-P, Inwald J. Induction of type 1 immune response to a recombinant antigen from *Mycobacterium tuberculosis* expressed in *Mycobacterium vaccae*. *Infect Immun* 1997; 65: 1856-1862
 21. Loosdreched A.A., Beelen R.H. A tetrazolium based colorimetric MTT assay. *Jornal of immunological methods* 1994; 174: 311-320
 22. 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): 545-555
 23. Russell DG. *Mycobacterium* and *Leishmania*: stowaways in the endosomal network. *Trends Cell Biol* 1995; 5(3): 125-128
 24. Modabber F. Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89 Suppl 1: 83-88
 25. Lehner T, Bergmeier L, Brooks R, Hussain L, Klavinski L, Mitchell E, Tao L. Genital and rectal mucosal immunity against transmission of SIV/HIV. Kagnoff M. and Kiyono H. *Essentials of Mucosal Immunology*. London: Academic Press 1996; 437-447
 26. Marinaro M, Kiyono H, Vancot J, Okahashi N. Vaccines for selective induction of Th1- and Th2-cell responses and their roles in mucosal immunology. Kagnoff M. and Kiyono H. *Essentials of Mucosal Immunology*. London: Academic Press 1996; 461-475