

## مقایسه اثر واکسیناسیون BCG بر القای تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c آلوده به لیشمانیا ماژور در دو روش رکتال و زیرجلدی

سارا صعودی\* M.Sc.، احمد زواران حسینی<sup>۱</sup>\* Ph.D.، سیما رافتی\*\* Ph.D.،  
رضا هاشمی فشارکی\*\*\* Ph.D.، کسری اسماعیل نیا\*\*\* Ph.D.،  
سید محمود هاشمی\* M.Sc.

### چکیده

**هدف:** مقایسه اثر واکسیناسیون BCG بر القای تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c آلوده به لیشمانیا ماژور در دو روش رکتال و زیرجلدی.

**روش بررسی:** گروههای ۲۰ تایی از موشهای نر حساس BALB/c را با واکسن BCG در دزهای مناسب از مسیر رکتال و زیرجلدی واکسینه کردیم. یک ماه بعد به گروههای آزمایش واکسن Autoclaved Leishmania major+ alum (ALM+alum) را به شکل زیر جلدی تزریق کردیم. پس از تزریق یادآور (۲۱ روز بعد) موشها را با تزریق  $10^5$  انگل لیشمانیا ماژور در ناحیه کف پا آلوده و روند پیشروی زخم را به طور هفتگی بررسی کردیم. میزان تولید نیتریک اکساید را در هفته های ۳، ۶ و ۹ پس از آلوده سازی، در مایع رویی کشت ماکروفاژهای صفاقی گروههای آزمایش سنجیدیم و بیان آنزیم القاکننده نیتریک اکساید را به روش ایمونوبلات نشان دادیم.

**یافته ها:** تحریک سیستم ایمنی پس از واکسن BCG در هر دو گروه به شکل افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری مشخص شد. سه هفته پس از آلوده سازی با لیشمانیا در هر دو گروه واکسن BCG تحریک تولید نیتریک اکساید صورت گرفت. اما پس از آن گروههای واکسن BCG نوسان زیادی را در تولید نیتریک اکساید پشت سر گذاشتند که منجر به غلبه بیماری در گروه BCG زیر جلدی شد، که مشخصه آن کاهش تولید نیتریک اکساید همراه با افزایش انگل ( $P \leq 0.05$ ) در بدن بود. گروه رکتال در روشی متفاوت توانست با حفظ و افزایش پاسخهای ضد لیشمانیایی مقاومت بالایی نشان دهد.

**نتیجه گیری:** واکسیناسیون BCG از راه رکتال می تواند نسبت به مسیر زیرجلدی میزان نیتریک اکساید بیشتر و پایداری ایجاد کند و با فعال کردن مکانیسم کشندگی لیشمانیا توسط ماکروفاژ سبب حفاظت علیه بیماری گردد.

### واژه های کلیدی: لیشمانیا، نیتریک اکساید، iNOS، واکسن BCG

دریافت مقاله: ۸۵/۸/۲۵، اصلاح مقاله: ۸۵/۱۲/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۲/۲۵

? استاد گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

\* گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

\*\* آزمایشگاه ایمنی شناسی مولکولی و تحقیقات واکسن، انستیتو پاستور ایران

\*\*\* گروه تک باخته شناسی، موسسه واکسن و سرم سازی رازی

آدرس پست الکترونیکی: zavarani@modares.ac.ir

## مقدمه

سلولهای لیشمانیا پس از ورود به میزبان از طریق فاگوسیتوز جذب ماکروفاژهای محل می‌شوند. متابولیت‌های توکسیک اکسیژن و ترکیبات نیتریک اکساید (NO) که در ماکروفاژ تولید می‌شوند، عامل اثر کشندگی ماکروفاژها بر تک یاخته لیشمانیا هستند. متابولیت‌های توکسیک اکسیژن شامل سوپراکسید ( $O_2^-$ )، اکسیژن منفرد ( $O_2$ )، رادیکال هیدروکسیل (OH) و به ویژه پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) هستند (۱). شواهد نشان می‌دهد که اشکال آماستیگوت یا پروماستیگوت‌های متاسایکلکلیک L. Major سیستم تنفسی ماکروفاژ را کمتر فعال کرده، به همین دلیل بیش از اشکال پروماستیگوتی فاز لگاریتمی در سیستم زنده دیده می‌شوند و باقی می‌مانند. آماستیگوت‌ها مقادیر بیشتری از آنزیم‌های گلوتامین پراکسیداز، سوپراکسیداز و کاتالاز داشته، می‌توانند فعالیت ضد میکروبی وابسته به اکسیژن ماکروفاژها را کاهش دهند. برانگیختن مکانیسم کشندگی تک یاخته با نیتریک اکساید، مهمترین عامل حذف تک یاخته در میزبان است. چنانچه میزبان مقاوم را با مهار کننده‌های iNOS تیمار کنیم یا ژن رمزگذار iNOS را از میزبان حذف کنیم، دیگر مقاومتی نسبت به L. Major نخواهیم داشت (۱).

نقش متابولیت‌های نیتریک اکساید زمانی مشخص شد که محققان دریافتند که تک یاخته‌هایی چون L. Mexicana و L. Major در حالی که به رادیکالهای اکسیژنی مقاومت دارند، حتی در ماکروفاژهای واجد نقص در تولید متابولیت‌های اکسیژن کشته می‌شوند. بررسیهای بیشتر، این کشندگی را مربوط به تولید نیتریک اکساید NO از L. Mexicana توسط ماکروفاژ در حضور اثر تحریکی  $TNF-\alpha$  و  $IFN-\gamma$  دانست. گرچه مکانیسم اثر NO به خوبی مشخص نیست ولی به نظر می‌رسد که NO به صورت کووالان با آهن درون سلولی واکنش داده، از عمل آنزیمهای دارای گروه پروستتیک Fe-S جلوگیری می‌کند. این آنزیمها در فرآیند سنتز DNA یا در سیستم انتقال الکترون (اکسیدوردوکتازهای میتوکندریایی) شرکت دارند (۲).

BCG می‌تواند تا حد زیادی فعالیت سلولهای NK را برانگیزد،

می‌توان گفت این سلولها بیش از لنفوسیت‌های T منبع تولید  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  در یک واکسیناسیون موفق هستند. از این رو پس از واکسیناسیون BCG مقادیر زیاد نیتریک اکساید در اثر ترشح بالای سایتوکاین‌های  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  به ویژه از سلولهای طحالی و ماکروفاژهای صفاقی موشی تولید می‌شود و مکانیسم‌های کشندگی ماکروفاژ به شدت برانگیخته می‌گردد (۳). مایکوباکتریوم و لیشمانیا که هر دو در شبکه اندوزومی ماکروفاژها مخفی می‌شوند، می‌توانند پاسخهای ایمنی برانگیخته شده را چه مثبت و چه منفی به اشتراک بگذارند. بنابراین BCG می‌تواند پس از واکسیناسیون موفق مسیر سیستم ایمنی را به نفع الگوی سایتوکاینی نوع یک (Type I) تغییر دهد و بستره‌ای از برهم کنش‌های سایتوکاینی و مولکولهای دفاعی حاصل از این برهم کنش‌ها (NO) را به وجود آورد که منجر به حذف پاتوژن‌های درون سلولی شامل انواع مایکوباکتریها و حتی گونه‌های دیگر میکروبی می‌شود (۴).

مدتهاست که استفاده از واکسن BCG به اشکال مختلف در درمان و پیشگیری لیشمانیوزیس به کار می‌رود. یکی از این موارد استفاده از واکسن لیشمانیای اتوکلاو شده (ALM) به همراه BCG است که در موسسه رازی توسط دکتر فشارکی و همکاران بهینه شده است. استفاده از این واکسن در بررسیهای تجربی و کارآزمایی‌های بالینی متفاوت، توانسته است از خود اثر حفاظتی نشان دهد. اما از آن جایی که این اثر حفاظتی از کارایی لازم برخوردار نبوده است، محققان بر آن شده‌اند تا با ایجاد تغییراتی بر کارایی آن بیافزایند. استفاده از ادجوانتهای مختلف و تغییر دفعات و مسیر واکسیناسیون می‌تواند از متغیرهایی باشد که ما را به کارایی لازم برساند (۵-۹).

در یک بررسی توسط ابوالحسنی و همکارانش مشخص شد که استفاده از واکسیناسیون رکتال BCG می‌تواند پاسخهای مناسب را همچون مسیرهای زیرجلدی برانگیزاند. تکثیر بالای لنفوسیت‌ها و سلولهای طحالی در پاسخ به آنتی ژنهای مایکوباکتریومی، ترشح بالای سایتوکاین  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  و فعالیت مناسب سلولهای T سایتوتوکسیک نشان داد که مسیر

فقط با انگل لیشمانیاماژور آلوده شدند. مقدار انگل  $10^5$  انگل L. Major فاز ایستا و محل تزریق آن کف پای چپ موشها می باشد. گروه پنجم، موشهایی که تنها PBS را به صورت زیرجلدی یا رکتال متناسب با زمان و روش واکسیناسیون و آلوده سازی سایر گروهها دریافت کردند.

**انجام تست واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری به PPD.**  
به منظور بررسی پاسخ DTH در موشهایی که با BCG واکسینه شده بودند، ۲۸ روز پس از واکسیناسیون ۵ میکروگرم PPD (Purified Protein Derivatives) به کف پای راست ۱۰ موش از هر گروه (در حجم ۰/۱ میلی لیتر PBS) و هم حجم آن PBS به کف پای چپ هر موش تزریق گردید. قطر کف پا با استفاده از کولیس پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه گیری شد و درصد افزایش ضخامت آن طبق روشهایی که دیگران انجام داده بودند، گزارش گردید (۱۱).

**آلوده سازی موشها و اندازه گیری کف پا.** به این منظور میزان  $10^5$  انگل لیشمانیاماژور فاز ایستا را به کف پای چپ موشهای گروه آزمایش تزریق کردیم و ایجاد و پیشروی زخم حاصل از تکثیر انگل را هر هفته با استفاده از کولیس بررسی کردیم.

برای تهیه انگل در فاز ایستا، بعد از رسیدن انگلها به تعداد لازم، محیط تازه دیگر 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 می شوند و تعداد آنها در محیط کشت ثابت می ماند یا کاهش می یابد. هنگامی که انگلها وارد فاز ایستا می شوند باید هرچه سریعتر مورد استفاده قرار گیرند زیرا در غیر این صورت از بین می روند.

**استخراج ماکروفاژهای صفاقی موش.** در فواصل زمانی ۳ و ۶ و ۹ هفته پس از آلوده سازی موشها با L. Major، دو موش از هر گروه کشته شد و پس از تزریق RPMI به صفاق، سلولها با سرنگ خارج شد و در  $1700 \text{ rpm}$ ،  $4^\circ \text{C}$  به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلولها در حجم یک میلی لیتر شمارش شد و viability سلول تعیین گردید. سپس تعداد  $5 \times 10^5$  سلول در هر چاهک کشت و در انکوباتور  $37^\circ \text{C}$  واجد ۵ درصد  $\text{CO}_2$  قرار داده شد.

رکتال می تواند مسیر جایگزین مناسبی برای تزریق زیرجلدی یا داخل جلدی بوده، با توجه به شیوع بیشتر عفونت های وپروسی (HIV) خطر انتقال پاتوژنها را نیز کاهش دهد (۱۰). در این تحقیق به مقایسه اثر واکسیناسیون BCG از مسیر زیرجلدی و رکتال بر القای تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژ صفاقی موشهای آلوده به L. Major و روند تشکیل زخم پرداخته شده است.

## روش بررسی

**برنامه واکسیناسیون.** به منظور بررسی اثر تجویز واکسن BCG از مسیرهای مختلف بر واکسن لیشمانیا، برنامه واکسیناسیون به شرح زیر طراحی شد. واکسیناسیون BCG در روز صفر، واکسیناسیون ALM+alum در روزهای ۲۸ و ۴۹ و آلوده سازی با انگل در روز ۶۰ انجام شد. واکسن لیشمانیای اتوکلاو شده به همراه ادجوانت آلوم (ALM+alum) از انستیتو رازی تهیه شد. مقدار تزریقی به هر موش ۰/۱ میلی لیتر برابر ۴۵۶ میکروگرم پروتئین و ۳۷۶ میکروگرم ادجوانت می باشد و محل تزریق آن کف پا است. واکسن (pasture strain 1173-P2) BCG، در غلظت ۶۰ میلی گرم در میلی لیتر محیط کشت sauton که حاوی  $20 \times 10^6 \text{ cfu}$  (colony forming unit) در هر میلی گرم می باشد، از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

**گروههای آزمایش.** موشهای نر BALB/c، ۸-۶ هفته به ۵ گروه ۲۰ تایی به شرح زیر تقسیم شد. ۱۰ موش از هر گروه به منظور بررسی اندازه زخم تا پایان آزمایش و ده موش دیگر از همان گروه به منظور سنجش ایمونولوژیک در فواصل زمانی مختلف در نظر گرفته شدند. گروه اول، موشهایی که واکسن BCG و واکسن ALM+alum را به صورت زیرجلدی 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 می شد و روز بعد با استفاده از سرنگ گاوآژ میزان  $10^6 \text{ cfu}$  باکتری به آرامی از راه رکتوم وارد بدن موش گردید. گروه سوم، موشهایی که فقط واکسن ALM+alum به صورت زیرجلدی دریافت کردند (کنترل واکسن لیشمانیا). گروه چهارم، موشهایی که

HRP میزان بیان iNOS در ماکروفاژهای گروههای واکسن بررسی گردید.

**آنالیز آماری.** آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 11.0 انجام شد. برای رسم نمودار نیز از نرم افزارهای SPSS و Excel استفاده شد. از آزمون Kruskal-Wallis در آزمونهای ناپارامتری و در سایر موارد از student t-test استفاده شد. سطح معنی داری در همه موارد  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

**پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به PPD.** پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به PPD در گروههای 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 گروههای آزمایش با یکدیگر و با کنترل در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق داخل جلدی PPD اختلاف معنی دار وجود دارد. همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود. در این فاصله زمانی با افزایش پاسخ نسبت به موش‌های کنترل در گروههای واکسینه مواجه هستیم.

**جدول ۱. پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری به PPD در موشهایی که با BCG واکسینه شده‌اند. درصد افزایش قطر کف پا\* گزارش شده است (n=۱۰).**

گروههای واکسن ↓ زمان ←	گروههای واکسن ↓ زمان ←		
	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت
PBS	۴/۳ ± ۱/۸	۲/۸ ± ۰/۸۶	۳/۲ ± ۰
rectal	۲۰/۶ ± ۴/۶	۲۰/۵ ± ۲/۶	۱۹/۷ ± ۲/۸
S.C.	۶/۷ ± ۱/۹	۱۳/۹ ± ۲/۹	۲۴/۴ ± ۴/۹

\* درصد افزایش قطر کف پا از تقسیم قطر کف پای تیمار شده با PPD بر قطر کف پای تیمار نشده و ضرب عدد حاصل در ۱۰۰ به دست آمده است.

**مقایسه روند ایجاد زخم و پیشروی آن.** با استفاده از

پس از ۴ ساعت مایع روی سلولها جمع‌آوری و سطح سلولها شسته شد تا سلولهای چسبیده که همان ماکروفاژها هستند، باقی بمانند.

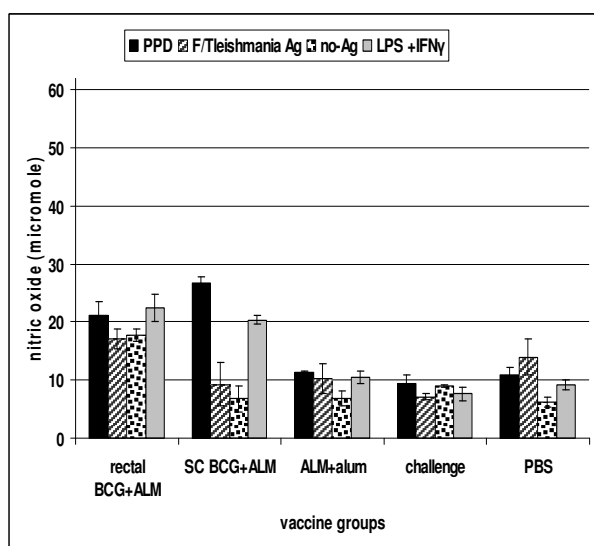
**اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید با روش گریس.** اندازه‌گیری مولکول NO، به علت طبیعت رادیکالی آن و نیمه‌عمر بسیار کوتاهش مشکل است. بنابراین، تعیین محصولات انتهایی پایدار رادیکال NO، یعنی نیتريت و نترات، اغلب به عنوان اندازه‌گیری تولید رادیکال NO به کار می‌رود (۱۲). متداولترین روش اندازه‌گیری نیتريت، روشهای رنگ سنجی است که بر مبنای واکنش گریس (Griess) است. نیتريت با سولفانیل آمید و ان (یک-نفتیل) اتیلن دی آمین واکنش می‌دهد تا رنگ آزو تولید کند. حساسیت این آزمایش، حدود ۱ میکرومول است (۱۳).

در این آزمایش ضمن آن که مقایسه‌ای در تولید NO توسط ماکروفاژهای صفاقی در گروههای مختلف واکسیناسیون به عمل آمد، از آنتی ژن Purified Protein Derivatives (PPD) میکوباکتریوم و آنتی ژن (F/T) Freeze/Thaw لیشمانیامازور به میزان  $10 \mu\text{g/ml}$  به عنوان محرک ثانوی و از  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS (Lipo PolySaccharid) به همراه اینترفرون گاما ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) به عنوان محرک مثبت استفاده شد. به این منظور محرک‌های مورد نظر به کشت ماکروفاژ اضافه گردید و پس از ۴۸ ساعت محلول رویی سلولها جمع‌آوری شد، هم حجم محلول رویی، معرف گریس اضافه و تولید نیتریک اکساید با ایجاد رنگ توسط این معرف اندازه‌گیری گردید. جذب O.D. حاصل از اثر معرف گریس در  $540 \text{ nm}$  نانومتر اندازه‌گیری و بر اساس منحنی استاندارد میزان نیتریک اکساید به میکرومول محاسبه شد. در مورد هر موش و هر آنتی ژن ماکروفاژهای صفاقی به صورت سه تایی به چاهکها اضافه شدند. همچنین این آزمایش به صورت دو تکرار جداگانه انجام شد.

**ایمونوبلاتینگ iNOS در ماکروفاژهای صفاقی.** در هفته ۹ پس از آلوده‌سازی، سلولهای ماکروفاژ لیز شده (گروهی که تیمار ثانوی F/T دریافت کرده بود) الکتروفورز شد و پس از انتقال به غشا PVDF با استفاده از آنتی‌بادی Rat Anti- mouse- iNOS (R&D) و آنتی‌بادی ثانویه کنتره با (goat anti rat IgG)

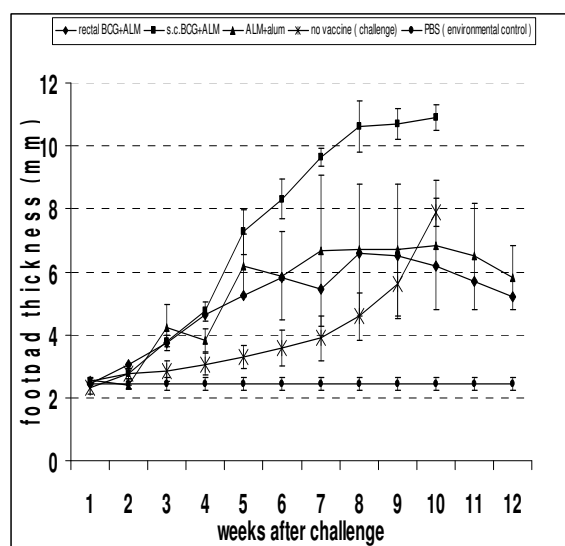
غلظت‌های مختلف تهیه گردید و سنجش نیتريت به عنوان شاخصی از نیتريك اكساید در استانداردها انجام شد. با نرم افزار Excel نمودار، خط رگرسیون و معادله خط محاسبه شد. سپس با قرار دادن جذب (OD) هر یک از نمونه‌های آزمایش شده در این معادله غلظت نیتريت نمونه‌ها محاسبه گردید و به عنوان شاخص میزان نیتريك اكساید در کارهای آماری مورد استفاده قرار گرفت. سنجش میزان تولید نیتريك اكساید در گروههای آزمایش متفاوت در حضور محرک‌های ثانوی شامل PPD, F/T و IFN- $\gamma$  + LPS صورت گرفت. به کمک آزمون آماری ناپارامتری Kruskal-Wallis مقایسه آماری بین تیمارهای مختلف در هر گروه، گروههای مختلف در هر هفته و هفته‌های متفاوت انجام شد. سطح معنی‌داری در همه موارد  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. بر این اساس در همه گروهها بین اکثر تیمارها به ویژه IFN- $\gamma$  + LPS و کنترل (بدون آنتی ژن) اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در مقایسه بین هفته‌ها، در تمام گروه‌ها به استثنای گروه کنترل بین هفته سوم و ششم پس از آلوده‌سازی، بین هفته

روش آماری Repeated measure (برای هفته ۱ تا ۷) و Friedman (برای هفته ۷ تا ۱۲) و مقایسه چندگانه (multiple comparison)، میانگین اندازه زخم موش‌ها (ده موش در هر گروه) در گروههای مختلف واكسیناسیون طی ۱۲ هفته پس از آلوده‌سازی با یکدیگر مقایسه گردید و سطح معنی‌داری برابر  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. افزایش تورم بدون زخم در کف پا در گروههای واكسینه با BCG از هفته اول پس از آلوده‌سازی آغاز شد (نمودار ۱). این تورم در گروه BCG زیر جلدی به زخم ناگهانی و شدید در سه هفته آخر تبدیل شد و در هفته نهم موشها کاملاً از بین رفتند. در حالی که در گروه rectal افزایش تورم در برخی از موشهای آن گروه به زخم کوچکی در هفته‌های ۶ و ۷ تبدیل شد و در برخی موشها زخمی ایجاد نکرد و اکثر موشهای این گروه با کاهش تورم و از بین رفتن زخم، بهبود یافتند. در گروههای کنترل (challenge) و واكسن لیشمانیا (ALM + alum) شروع تورم با شروع زخم همراه بود که در نهایت منجر به مرگ موش‌ها شد. مقایسه اندازه زخم گروه‌های challenge و PBS با سایر گروهها اختلاف معنی‌دار نشان داد.



نمودار ۲. میانگین  $\pm$  SD میزان نیتريك اكساید در ماکروفاژهای صفاقی گروههای واكسینه در حضور تیمارهای ثانوی متفاوت در هفته سوم پس از آلوده‌سازی. (این آزمایش به صورت دو تکرار جداگانه انجام شد  $(n=4)$ ).

سوم و نهم پس از آلوده‌سازی و بین هفته نهم و ششم پس از



نمودار ۱. نمودار خطی افزایش ضخامت پای (میانگین  $\pm$  SD) موش تا ۱۲ هفته پس از آلوده‌سازی در گروههای مختلف  $(n=10)$ .

تولید نیتريك اكساید. منحنی استاندارد  $\text{NaNO}_2$  در

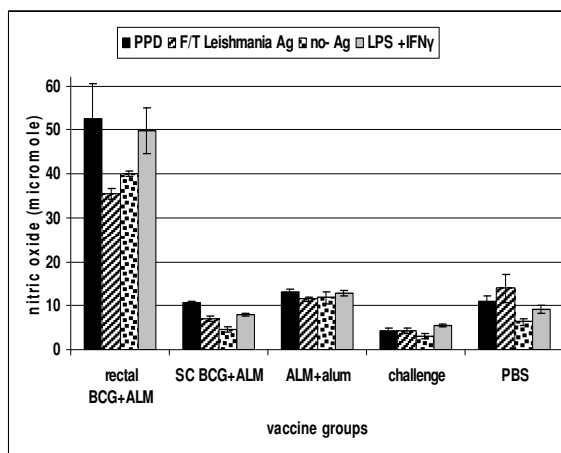
اکساید سنتتاز القایی در ماکروفاژهای صفاقی موشها در گروههایی که BCG دریافت کرده بودند، از تکنیک ایمونوبلات استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ مشخص است، میزان القای آنزیم iNOS در گروه رکتال به شدت بیشتر از سایر گروههای واکسینه است. این نتیجه تولید بالای نیتریک اکساید را در کشت ماکروفاژهای صفاقی گروه رکتال تایید می‌کند.

## بحث

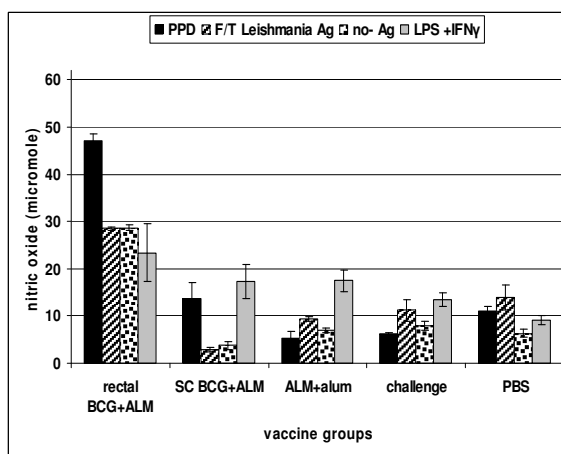
نیتریک اکساید (NO) یک مولکول بیولوژیک مهم است که اثر سایتوتوکسیک و سایتواستاتیک بر پاتوژنهای درون سلولی از جمله لیشمانیا دارد. منبع اصلی و مهم تولید نیتریک اکساید ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا هستند که اگر موفق شوند می‌توانند سبب حذف و از بین بردن انگل گردند. NO با مکانیسم S-نیتروزیل دار کردن پروتئین‌های واجد اسید آمینه سیستئین، باعث ایجاد پل دی سولفیدی شده، فعالیت این پروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مورد لیشمانیا با اثر بر سیستئین پروتئین‌ها، ریبونوکلئوتید ردوکتاز، آکونیتاز، آلدولاز، سیتوکروم C-اکسیداز و آنزیمهای مشابه سبب توقف فعالیت و مرگ انگل می‌شود (۱۴).

بنابراین بدیهی است واکسینی که بتواند تولید نیتریک اکساید را القا سازد، واکسن موفقی خواهد بود. از این رو یکی از پارامترهای ایمونولوژیک که با هدف کشتن لیشمانیا در ماکروفاژ در ارزیابی واکسیناسیون به کار می‌رود، سنجش تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژهای صفاقی خواهد بود. براساس نتایج به دست آمده که در نمودارهای ۲-۴ ارائه شده است، تولید نیتریک اکساید در زمانهای ۳، ۶ و ۹ هفته پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا نسبت به آنتی ژنهای PPD و لیشمانیا F/T با یکدیگر مقایسه شده است. گروهی که BCG زیرجلدی دریافت کرده‌اند بیشترین نیتریک اکساید را در هفته سوم پس از آلوده‌سازی نسبت به آنتی ژنهای میکوباکتریوم تولید کرده و در هفته‌های بعد با روند کاهش-افزایش در تولید نیتریک اکساید روبرو شده است. گروه رکتال تحریک بسیار بالایی نسبت به سایر گروهها نشان داده و در اوج خود یعنی هفته ششم پس از آلوده‌سازی مقدار ۵۲ میکرومول

آلوده‌سازی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در مقایسه بین گروه‌ها در هر هفته به جز گروه کنترل بین سایر گروهها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. روند تغییر میزان تولید نیتریک اکساید نشان می‌دهد که در هفته ششم پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا میزان تولید NO نسبت به هفته سوم افزایش می‌یابد و در هفته نهم روند افزایشی آن رو به کاهش می‌گذارد (نمودارهای ۲-۴).

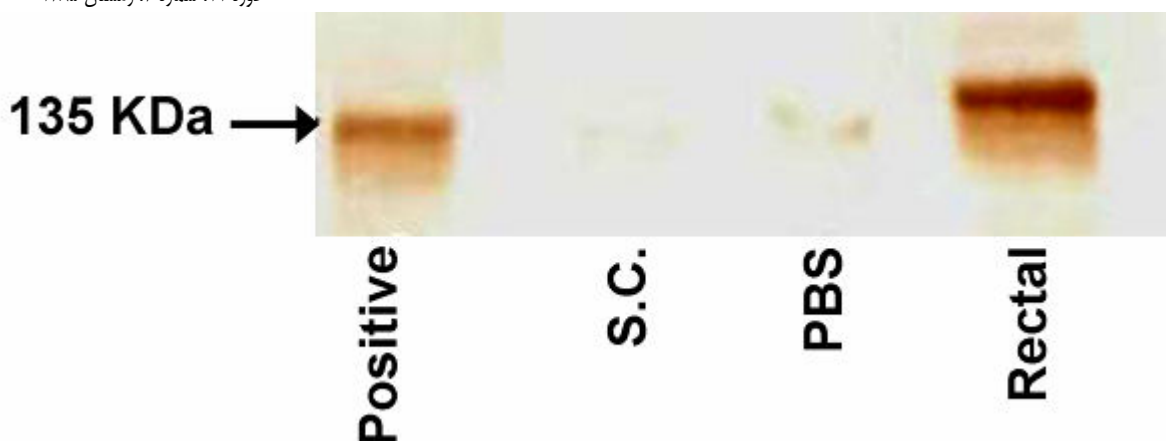


نمودار ۳. میانگین  $\pm$  SD میزان نیتریک اکساید در ماکروفاژهای صفاقی گروههای واکسینه در حضور تیمارهای ثانوی متفاوت در هفته ششم پس از آلوده‌سازی. (این آزمایش به صورت دو تکرار جداگانه انجام شد ( $n=4$ )).



نمودار ۴. میانگین  $\pm$  SD میزان نیتریک اکساید در ماکروفاژهای صفاقی گروههای واکسینه در حضور تیمارهای ثانوی متفاوت در هفته نهم پس از آلوده‌سازی. (این آزمایش به صورت دو تکرار جداگانه انجام شد ( $n=4$ )).

ایمونوبلات iNOS. به منظور مقایسه بیان آنزیم نیتریک



شکل ۱. نتیجه ایمونوبلات آنزیم iNOS در گروه‌های واکسن، ۹ هفته پس از آلوده‌سازی با لیشمانیا.

نیتریک اکساید به منظور مقابله با BCG القا می‌شود (مستقل از واکنش‌های محیطی) (۱۴).

۲. میکوباکتریوم بویس با فعال کردن سیستم ایمنی نوع I و به ویژه ایجاد بستر سایتوکاینی غنی از  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  امکان تحریک ماکروفاژها را برای تولید NO چندین برابر می‌کند (۱۶، ۱۷).

۳. میکوباکتریوم بویس با فعال کردن اولیه سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی به ویژه سلول‌های NK به طور پیوسته، تولید  $IFN-\gamma$  را به راه می‌اندازد که سبب فعال شدن پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و تولید بیشتر  $IFN-\gamma$  و ترشح بیشتر NO می‌شود (۱۸).

۴. به دلیل حضور مقادیر بالای پروتئین‌های شوک حرارتی در میکوباکتریوم بویس، به ویژه hsp90 که تشدیدگر الوستریک آنزیم iNOS است، سنتز NO افزایش می‌یابد (۱۹، ۲۰).

به این ترتیب چنانچه میکوباکتریوم بویس در زمان عفونت لیشمانیا ایفای نقش کند، می‌تواند با تحریک سیستم ایمنی سبب تولید سایتوکاین‌های لازم برای تحریک تولید NO شود، یا به طور مستقیم مکانیسم تولید نیتریک اکساید میزبان ماکروفاژی را روشن نگه دارد. اما هنوز مشخص نیست که BCG چگونه از مسیر رکتال می‌تواند بهتر عمل کند. به نظر می‌رسد که در مسیر رکتال، تولید  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  به میزان کافی و در زمان مناسب صورت

نیتریک اکساید در تحریک با PPD و ۳۵ میکرومول در تحریک با F/T ترشح کرده است. در گروه ALM و challenge نیز با روند کاهش تولید نیتریک اکساید در هفته نهم نسبت به ششم و مقادیر کم تولید نیتریک اکساید (۱۳ میکرومول نسبت به PPD در هفته ششم در گروه ALM) مواجه هستیم.

دو عامل نقش مهمی در ایفای اثر کشندگی نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها دارند که به شرط آن می‌توان بر عفونت لیشمانیا غلبه کرد: اول، میزان تولید نیتریک اکساید و دوم، زمان حضور نیتریک اکساید در محیط داخل سلولی ماکروفاژ و پایداری آن در طول دوره عفونت. به این ترتیب به نظر می‌رسد که گرچه تحریک تولید نیتریک اکساید در گروه‌های مختلف واکسیناسیون BCG و ALM صورت گرفته است، اما مقادیر این تحریک هیچ یک به اندازه گروه رکتال بالا نبوده و با گذشت زمان کاهش یافته است. انگل لیشمانیا خود مجهز به مکانیسم‌های فرار از نیتریک اکساید بوده، مانع از القای آنزیم iNOS می‌شود (۱۵)، به نظر می‌رسد که استفاده از واکسیناسیون BCG از راه رکتال حتی با این سیستم دفاعی لیشمانیا به مقابله پرداخته است.

### BCG به چند طریق بر تولید و دوام NO اثر خواهد داشت:

۱. پس از ورود BCG به میزبان، ماکروفاژهای ترشح و تولید

دریافت مقاله: ۸۵/۸/۲۵، اصلاح مقاله: ۸۵/۱۲/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۲/۲۵

? استاد گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران-ایران

\* گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس

\*\* آزمایشگاه ایمنی‌شناسی مولکولی و تحقیقات واکسن، انستیتوپاستور ایران

\*\*\* گروه تک‌باخته‌شناسی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی

آدرس پست الکترونیکی: zavarani@modares.ac.ir

safety and immunogenicity trial of two killed *Leishmania major* vaccines with or without BCG in human volunteers. *Clin Dermatol* 1996;14(5): 489-95.

6. Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Hashemi Fesharki R, et al. Responses and reactions to *L. major* vaccination. WHO special program for research and training in tropical disease. 10-11 September 1990; 20-1.

7. Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, et al. Randomized vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 1998; 351(9115):1540-3.

8. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2): 229-43.

9. Mahmoodi M, Khamesipour A, Dowlati Y, et al. Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with low dose of BCG. *Clin Exp Immunol* 2003; 134(2): 303-8.

10. Abolhassani M, Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. *Mycobacterium bovis* BCG induces similar immune responses and protection by rectal and parenteral immunization routes. *Infect Immun* 2000; 68(10): 5657-62.

11. Abou-Zeid C, Gares M-P, Inwald J et al. Induction of type I immune response to a recombinant antigen from *Mycobacterium tuberculosis* expressed in *Mycobacterium vaccae*. *Infect Immun* 1997; 65(5): 1856-62.

12. Falero-Diaz G, Challacombe S, Banerjee D,

گرفته است و یا آن که در واکسیناسیون رکتال، تعداد BCG‌هایی که در میانکنش با ماکروفاژها شرکت کرده‌اند، بیشتر بوده است. تحقیق اخیر انجام شده نشان می‌دهد که BCG در مسیر رکتال از اپیتلیوم عبور کرده، به غدد لنفی مزانتریک می‌رسد و در حدود یک تا دو هفته پس از ورود سبب تجمع تعداد زیادی از سلولهای دندریتیک میلوییدی (B220<sup>+</sup>) در لامینا پروپریا می‌شود که تولید IFN- $\gamma$  را به شدت در سلولهای TCD4<sup>+</sup> تحریک می‌کنند (۲۱).  
به هر حال در بین این دو گروه، گروه رکتال توانسته است ریزمحیط خوبی را برای ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا و کلاً ماکروفاژهای صفاقی فراهم آورد و تولید نیتریک اکساید را القاء کند. ایجاد یک ریزمحیط ثابت از نظر میزان سایتوکاین‌های موثر و در نتیجه نیتریک اکساید نشان دهنده میانکنش فعال باکتری BCG و سیستم ایمنی میزبان است.

## References

1. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375(6530): 408-11.
2. Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol* 1992; 31:175-254.
3. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Kazembe PN, Chatt JA, Norton E, et al. Clinical and immune impact of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination scarring. *Infect Immun* 2002; 70(11): 6188-95.
4. Young S, O'Donnell M, Lockhart E, Buddle B, Slobbe L, Luo Y, et al. 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): 209-15.
5. Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, et al. Comparative



13. Farrell JP, Kirkpatrick CE. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J Immunol* 1987; 138(3): 902-7.
14. Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, Venturini G et al. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *Int J Mol Med* 2002; 9(2):131-134.
15. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology* 1998; 121-134.
16. Jagannath C, Actor JK, Hunter RL, Jr. Induction of nitric oxide in human monocytes and monocyte cell lines by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nitric Oxide* 1998; 2(3):174-186.
17. Lasco TM, Yamamoto T, Yoshimura T, Allen SS, Cassone L, McMurray DN. Effect of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination on *Mycobacterium*-specific cellular proliferation and tumor necrosis factor alpha production from distinct guinea pig leukocyte populations. *Infect Immun* 2003; 71(12): 7035-7042.
- Douce G, Boyd A, Ivanyi J. Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2000; 18(28): 3223-9.
18. Yang J, Kawamura I, Zhu H, Mitsuyama M. Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG. Study of the mechanism of the different abilities of viable and killed BCG. *J Immunol* 1995; 155(12): 5728-5735.
19. Yoshida M, Xia Y. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278(38): 36953-36958.
20. Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* 1997; 65(9): 3644-3647.
21. bolhassani M, Lagranderie M, Caminshi I, Romain F, Balazuc AM, Wagner MC et al. Similar functional activity of dendritic cells recruited to the mesenteric lymph nodes of newborn and adult mice after the rectal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbes Infect* 2006; 8(9-10): 2341-2351.