تخلیص آلژینات Pseudomonas aeruginosa و بررسی ترکیب آن با پروتئین ایمونو مدولاتور سیر برایمنی هومورال در موش BALB/c

احیا عبدی عالی [*1] ، مروارید شفیعی [2]، طوبی غضنفری [3]، شادآفرین هنرمندیان [2] ، خسرو خواجه [4]

۱. دکترای میکروب شناسی پزشکی ، استاد یار دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا(س)
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی از دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا(س)
۳. دکترای ایمونولوژی پزشکی ، دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۴. دکترای بیوشیمی ، استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس

* نشانی برای مکاتبه: : تهران ، میدان ونک ، ده ونک ، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا(س)، تلفن ۸۸۰۵۸۹۱۲ ،
abdialya@alzahra.ac.ir
دریافت مقاله: آبان هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: بهمن هشتاد و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *عفونتهای مزمن ریوی در بیماران فیبروز سیستیک غالبا ناشی از سویه های مو کوئیدی P. aeruginosa می باشد. آلژینات فاکتور کلیدی در بیماریزایی Pseudomonas aeruginosa محسوب می شود . با اینکه بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک ، پاسخ های آنتی بادی علیه آلژینات تولید می کنند اما چنین آنتی بادی هایی در پاکسازی ریه ها از باکتری Pseudomonas aeruginosa بی تاثیرند و و از آنجاییکه عصاره سیر و فراکشن ایمونومدولاتور آن ، قادر به تحریک پاسخ ایمنی در مدل موشی هستند، لذا،در این مطالعه ، تاثیر آلژینات و فراکشن ایمونومدولاتور سیر بر ایمنی هومورال موش های Balb/c بررسی شد.*

روش کار: *آلژینات از سویه موکوئیدی ATCC ، 8821M تخلیص شد . پس از کشت باکتریها در محیط تغییر یافته Mian`s، آلژینات با افزودن اتانول سرد رسوب داده شد ، سپس انزیمهای DNase I و Proteinase K و RNase A اضافه شد .در نهایت ، آلژینات به کمک ستون کروماتوگرافی با ژل سفاکریل S400 تخلیص شد.فراکشنهای بدست امده ، برای بررسی میزان یورونیک اسید با روش کاربازول ، در پلیتهای میکروتیتر ۹۶ خانه ای سنجش شد. موشهای ماده Balb/c ۶تا ۸ هفته تحت تزریق با عصاره سیر ، آلژینات ، مخلوط عصاره سیر – آلژینات و در عین حال ، فراکشن ایمونومدولاتور سیر(R10) ، مخلوط آلژینات – R10 قرار گرفتند .در نهایت تولید آنتی بادی IgG در موش های ایمن شده ، توسط روش enzyme-linked immunosorbent assay. (ELISA) مورد سنجش قرار گرفت .*

یافته ها: *آلژینات تخلیص شده از P.aeruginosa حاوی ۳۸µg/ml یورونیک اسید و ۱/۴۵ µg/ml پروتئین ، ۰/۵ µg/ml DNA و ۰/۰۸ µg/ml LPS بود. بر طبق نتایج بدست آمده، اگرچه مخلو ط عصاره سیر و آلژینات ایمونوژن ضعیفی در موش های Balb/c بود ،اما غلظت کمتر فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10)- آلژینات توانست میزان آنتی بادی IgG را به طور قابل ملاحظه ای افزایش دهد .*

نتیجه گیری: *نتایج به دست آمده ، نشان می دهد که فراکشن ایمونومدولاتور سیر همراه با آلژینات ،با افزایش آنتی بادی های اپسونیزان موجب ایمنی زایی به P.aeruginosa شده است. لذا، به نظر می رسد بتوان ، از فراکشن ایمونومدولاتور سیر به عنوان حامل برای آلژینات تخلیص شده جهت تهیه و تولید واکسن کونژوگه علیه P.aeruginosa استفاده کرد ، البته لازم است مطالعات بیشتری در مورد زیر کلاس های ایمونوگلوبین صورت گیرد.*

واژگان کلیدی: ***P.aeruginosa ، آلژینات، عصاره سیر***

مقدمه

استقرار سویه های موکوئیدی *P.aeruginosa* عامل مهم عفونت و مرگ و میر در بیماران فیبروز سیستیک (CF) است(۱و۲). مشخصات بارز این سویه ها ترشح میزان زیادی از پلی ساکارید موکوئیدی (MEP) یا همان آلژینات است .MEP یا آلژینات ، پلیمری متشکل از واحدهای تکرار شونده D.mannuronic acid و L.Guluoronic acid است ، که با پیوندهای 1-4 *B*به یکدیگر اتصال می یا بند (۵-۳). آلژینات یک فاکتور کلیدی در عفونتهای ریوی مزمن ناشی از *P. aeruginosa* در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک محسوب می شود، اما در انسان ایمونوژن ضعیفی است و آنتی بادی علیه آن قادر به حذف باکتری نیست(۶). هنگامیکه این باکتری در ریه های افراد مستقر می گردد ، بندرت امکان ریشه کنی ان حتی با درمان آنتی بیوتیکی وجود دارد وآلژینات با داشتن خاصیت آنتی فاگوسیتیک و چسباندن ارگانیسم ها بهم ، باعث مسدود شدن راههای هوایی دستگاه تنفسی افراد مبتلا به فیبروز سیستیک شده و در نهایت به پیشرفت بیماری دامن می زند(۷و۸).

کاربرد سیر در درمان برای قرنها شناخته شده است وخواص آنتی بیوتیکی ، ضد سرطانی و فعالیتهای ضد موتانی ان نیز به اثبات رسیده و اخیرا نقش آن و فراکشن ایمونومدولاتور آن در تحریک سیستم ایمنی نیز ثابت شده است (۹و۱۰).

با توجه به ویژگی های سیر در این مطالعه ایمنی زایی آلژینات - عصاره سیر و نیزایمنی زایی آلژینات - R10 با سنجش میزان آنتی بادی IgG مقایسه شده است.

روش کار

آلژینات از سویه موکوئیدی *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8821M تخلیص شد . پس از کشت سویه موکوئیدی درمحیط تغییر یافته mian`s که در ان بجای گلوتامات ، ۱۰٪ گلیسرول بکار برده شده بود ، باکتریها توسط سانتریفوژ با دور بالا،(۱۷۰۰۰ ، بمدت ۳۰ دقیقه) از مایع رویی جدا شدند .و آلژینات توسط اتانول سرد (۸۰٪) رسوب و پس از دیالیز لایوفیلیزه گردید ، آلژینات جداسازی شده ،در PBS حاوی $CaCl_2$ و $MgCl_2$ به میزان ۲ میلی گرم در میلی لیتر حل شدو به آن آنزیمهای RNase A و DNase I اضافه شد (۱۰۰ µg/ml) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$ آنزیم Proteinase K (100µg/ml) به آن اضافه و در دمای $56^{\circ}C$ بمدت ۴ ساعت انکوبه شد سپس.با فنل 96° به نسبت ۱:۱ تیمار گردید و مجددا با اب دیونیزه دیالیز و سپس لایوفیلیزه گردید . در نهایت بعد از حل کردن در کلرورآمونیوم (۰/۰۳ گرم در میلی لیتر) بر روی ستون کروماتوگرافی با ژل سفاکریل **S 400** (۱ تا ۷۰ سانتی متر) قرار داده شد . فراکشنهای بدست آمده برای بررسی میزان یورونیک اسید سنجش شدند و فراکشنهای مثبت که زودتر از ستون خارج شده بودند(void volume) جمع آوری و یکی شدند . در نهایت مجددا میزان یورونیک اسید محلول آلژینات بدست امده با روش کاربازول در مقابل آلژینیک اسید جدا شده از جلبک *Laminaria hyperborea*بعنوان استاندارد، درپلیت میکروتیتر ۹۶ خانه ای سنجش شد . سپس میزان پروتئین آن توسط روش Bradford با BSA بعنوان استاندارد ، میزان DNA با جذب در طول موج ۲۶۰, نانومتر و میزان LPS آن با روش LAL(*Limulus* amebocyte lysate assay) که در ان نیز آندو توکسین O113 : H10 Ecoli بعنوان استاندارد در نظر گرفته شده بود ، سنجش شد.

سیر تازه قطعه همدان ، پس از جدا کردن پوست خرد شده و پس از مخلوط کردن با آب مقطر ، تفا له های آن جدا گردید و میزان پروتئین آن با استفاده از دستگاه اسپکترو فتومتر UV طبق فرمول (جذب در ۲۶۰نانومتر) ۰/۷۷+ (جذب در ۲۸۰نانومتر) ۱/۵۵= (mg/ml) غلظت پروتئین اندازه گیری شد .

فراکشن ایمونومدولاتور سیر(R10) از عصاره سیربا استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی با سفادکس G75 طبق روشی که قبلا توضیح داده شد جداسازی و تخلیص شد(۱).

موشهای ماده Balb /c ، ۸-۶ هفته ، که از موسسه پاستور خرید اری شده بودند ،بطور زیر پوستی تحت ۳ بارتزریق با دوزهای مختلفی از آلژینات ،عصاره سیر ، مخلوط آلژینات – سیر و نیز R10 ،آلژینات - R10 در روزهای ۷،۰و۱۴ با مقادیر نشان داده شده در جدول ۱ و ۲ قرار گرفتند.

جدول ۱. دوزهای تزریق شده سیر ، آلژینات و مخلوط سیر – آلژینات

گروهها	میزان آلژینات بر حسب(µg/ml)	میزان عصاره سیر بر حسب(µg/ml)
کنترل(PBS)	-	-
آلژینات	۲/۵	-
سیر		۱۰
آلژینات- سیر	۲/۵	۱۰
سیر	-	۵۰
آلژینات-سیر	۲/۵	۵۰

جدول۲.دوزهای تزریق شده R10،آلژینات و مخلوط R10 – آلژینات

گروهها	میزان آلژینات بر حسب(µg/ml)	میزان R_{10}بر حسب(µg/ml)
کنترل(PBS)	-	-
آلژینات	۳	-
R_{10}	-	۴
آلژینات – R_{10}	۳	۴
R_{10}	-	۴۰
آلژینات – R_{10}	۳	۴۰

پس از بدست آوردن خون موشها از ناحیه قلب روز بعد از آخرین تزریق ، سرم موشها طی سانتریفوژ با دور rpm ۲۵۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه جدا شده و جهت انجام تستهای الایزا بکارگرفته شد.

ابتدا ، پلیتهای میکروتیتر ۹۶ خانه ای با آنتی بادی ضد IgG موشی (غیر کونژوگه) در محدوده غلظت ۵-۱۰µ g در PBS برای یک شبانه روز در دمای ۴درجه سانتیگراد Coat شدند. پس از Blocking با PBS حاوی BSA ۲ ٪ به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد ،سرم موشها ، با رقت (۱:۱۰) اضافه شده و مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس آنتی بادی ضد IgG موشی کونژوگه با HRP- با رقت ۱:۵۰۰۰اضافه و مجددا به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس ازافزودن سوبسترا (TMB) و جلوگیری از ادامه واکنش با افزودن اسید سولفوریک ۲ نرمال نتایج توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد .

روش الایزای غیر مستقیم جهت سنجش IgG سرم موش Balb/c برای سرم گروههایی که تحت تزریق غلظت های مختلف R10 ،آلژینات ومخلوطR10- آلژینات قرار گرفته بودند ،جهت اثبات اینکه افزایش تیتر آنتی بادی اختصاصی ضد آلژینات *P.aeruginosa* در گروهی که تحت تزریق مخلوطR10- آلژینات قرار گرفته بود علیه آلژینات *P.aeruginosa* بوده است بکار گرفته شد. ابتدا ، پلیت های میکروتیتر ۹۶ خانه ای با آلژینات محلول درPBS (۲/ ۵ µg/ml) برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷درجه سانتیگراد Coat , شدند. پس از Blocking با PBS حاوی BSA ۲ ٪ برای مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد ،سرم موشها ، با رقت (۱:۸) اضافه شده و برای مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس آنتی بادی ضد IgG موشی کونژوگه با HRP- با رقت ۱:۳۰۰۰اضافه و مجددا ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس ازافزودن سوبسترا (TMB) و جلوگیری از ادامه واکنش با افزودن اسید سولفوریک ۲ نرمال نتایج توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد .

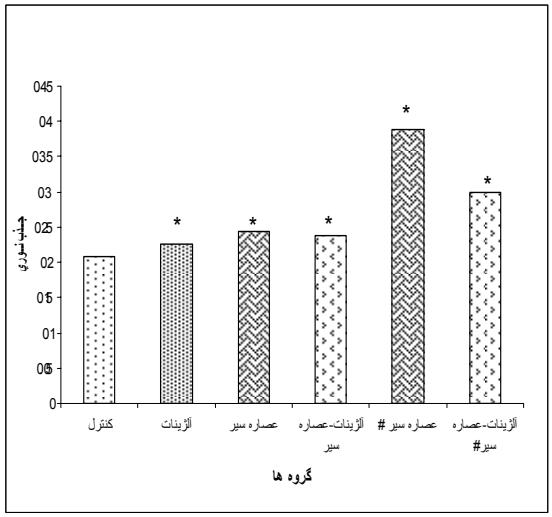
یافته ها

آلژینات تخلیص شده از *P.aeruginosa*حاوی ۳۸µg/ml یورونیک اسید ۱/۴۵µg/mlپروتئین ، ۰/۵ µg/ml DNA و۰/۰۸ µg/ml LPS و عصاره سیر حاوی ۷۰ mg/ml پروتئین بود.

بر اساس یافته های بدست آمده از آنالیز آماری t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪، ، با اینکه تیتر آنتی بادی IgG در گروهی که تحت تزریق مخلوط عصاره سیر و آلژینات قرارگرفته بود نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان می داد اما هنوز تیتر آنتی بادی در گروهی که تحت تزریق عصاره سیر قرار گرفته بود بیش از سایر گروههای ذکر شده بود (نمودار۱).

بر اساس یافته های بدست آمده از آنالیز آماری t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪، ، تیتر آنتی بادی IgG در گروهیکه تحت تزریق مخلوط آلژینات و غلظت کمتر فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) قرار گرفته بود افزایش چشمگیری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروهها نشان می داد(نمودار ۲).

بر اساس یافته های بدست آمده از آنالیز آماری t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪، طی این روش هم ،تیتر آنتی بادی IgG در گروهیکه تحت تزریق مخلوط آلژینات و غلظت کمتر فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) قرار گرفته بود افزایش قابل ملاحظه ای را نسبت به گروه کنترل و سایر گروهها نشان می داد (نمودار ۳).



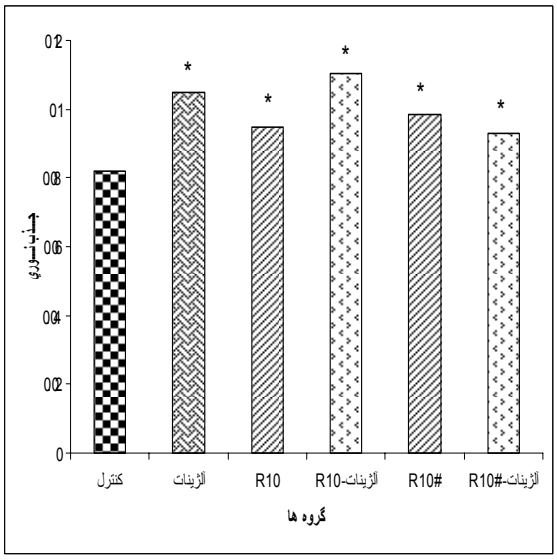
نمودار(۱) . تاثیر دوزهای مختلف سیر ، آلژینات و سیر-آلژینات بر تیتر آنتی بادی IgG در جذب نوری ۴۵۰ نانومتر

* : P< ۰/۰۰۱

آلژینلت- عصاره سیر: مخلوط آلژینات و عصاره سیر با غلظت کمتر

عصاره سیر# : عصاره سیر با غلظت بیشتر

آلژینلت- عصاره سیر#: مخلوط آلژینات و عصاره سیر با غلظت بیشتر

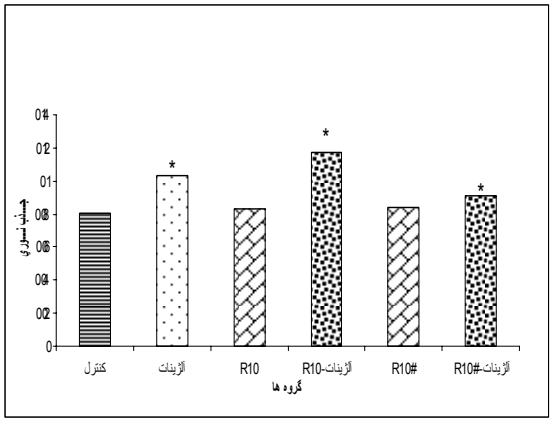


نمودار ۲ . تاثیر دوزهای مختلف R10، آلژینات و R10-آلژینات بر بر تیتر آنتی بادی IgG پس از سنجش به روش ساندویچ الایزا در جذب نوری ۴۵۰ نانومتر

* : P< ۰/۰۰۱

#R10 : فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) با غلظت بیشتر

آلژینات – #R10: مخلوط آلژینات و فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) با غلظت بیشتر



نمودار ۳ . تاثیر دوزهای مختلف R10، آلژینات و R10- آلژینات بر بر تیتر آنتی بادی IgG پس از سنجش به روش الایزای غیر مستقیم
در جذب نوری ۴۵۰ نانومتر
* : P< ۰/۰۰۱
R10# : فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10)با غلظت بیشتر
آلژینات – R10#: مخلوط آلژینات و فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) با غلظت بیشتر

بحث

شایع ترین پاتوژن مسئول مرگ و میر در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک *P.aeruginosa* است(۱۱و۱۲) . از مشخصات بارز این باکتری تمایل آن برای تبدیل به فنوتیپ موکوئیدی است که منجر به تولید مقادیر زیاد اگزوپلی ساکارید موکوئیدی یا آلژینات (MEP) می شود . آلژینات نقش مهمی در بیماریزایی دارد و موجب توقف فاگوسیتوز و خنثی کردن رادیکالهای اکسیژن می شود و از طرفی به علت ماهیت تولید بیوفیلم در چسبندگی باکتری نقش دارد (۱۲و۱۳) . آلژینات بر اعمال لوکوسیتی از جمله انفجار تنفسی موثر بوده و از اپسونیزاسیون جلوگیری می کند . ماده مزبور قادر به ایفای نقش ایمونومدولاتوری از طریق القای سایتوکاین های التهابی نیز می باشد(۳).
ایمنی زایی با آنتی ژن آلژیناتی موجب تولید آنتی با دیهایی با فعالیت اپسونیک می شود که قادر به پاکسازی *P.aeruginosa* موکوئید از دستگاه تنفسی موشی می باشد. اما این ماده در انسان ایمونوژن ضعیفی بوده و به علت ماهیت پلی ساکاریدی پاسخ ایمنی مناسبی خصوصا در کودکان علیه آن ایجاد نمی شود و از آنجایی که یک آنتی ژن غیر وابسته به T.cell است (T cell independent) است خاطره ایمنی بر جا نمی گذارد(۴و۱۱) . لذا ، همراه بودن این پلی ساکارید با یک ماده پروتئینی می تواند این آنتی ژن را به آنتی ژن وابسته به T.cell تبدیل کرده و پاسخ ایمنی را بالا تر برده و خاطره ایمنی ایجاد نماید .
مطالعات قبلی نشان دادند که فراکشن گلیکوپروتئین R10 باعث افزایش ازدیاد حساسیت تاخیری ، تکثیر لمفوسیت های T و فعالیت سلول های کشنده طبیعی (NK) می گردد که بیانگروجود مواد ایمونومدولاتوردرسیراست(۹و۱۰) . در مطالعات قبلی توسط دکتر غضنفری و همکاران ، نشان داده شد که عصاره سیر و فراکشن گلیکوپروتئین آن پاسخ ایمنی سلولی را افزایش می دهند و از آنجاییکه پاسخ ایمنی هومورال مناسب ، نیازمند همکاری سلول های T می باشد بنظر می رسد ، همراه کردن ماده ایمونومدولاتور سیر با آلژینات تخلیص شده از *P.aeruginosa* از طریق تحریک ایمنی سلولی زمینه القا یک پاسخ ایمنی هومورال مناسب را فراهم آورد (۹و۱۰) .
در مطالعه حاضر ، این فراکشن موجب افزایش ایمنی هومورال و بالا بردن میزان IgG علیه آلژینات شده است و تزریق آلژینات همراه با فراکشن پروتئینی ایمونومدولاتور سیر توانسته است ایمنی زایی نسبت به این پلی ساکارید را در موش افزایش دهد. لذا ، با توجه به خواص مفید سیر در تحریک پاسخ های ایمنی و نداشتن اثرات جانبی ، به نظر می رسد بتوان ، از فراکشن ایمونومدولاتور سیر به عنوان حامل برای آلژینات تخلیص شده جهت تهیه و تولید واکسن کونژوگه علیه *P.aeruginosa* استفاده کرد ، البته لازم است مطالعات بیشتری در مورد زیر کلاس ایمونوگلوبین و سایر مکانیزم های ایمنی مداخله کننده در این بیماری انجام گیرد .

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر کاشف وسرکار خانم دکتر یارایی و پرسنل بخش بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس وبخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی شاهد در اجرای این تحقیق تشکر می شود.

REFERENCES

1. Gilleland H. E., Parker J. M, Berg D. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice.. Infect. Immun. 1984 44:49–54.

2. Gilleland L. B and Gilleland Jr. Synthetic peptides representing two protective, linear B-cell epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* elicit whole-cell-reactive antibodies that are functionally pseudomonad specific. Infect. Immun. 1995. 63:2347–2351.

3.Pedersen SS. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. APMIS Suppl.1992. 28:1-79

4.Mond JJ, Lees A,Snapper CM. T cell-independent antigens type 2.Annu Rev Immunol.1995.13:655-92.

5.Pier GB. Safety and immunogenicity of high molecular weight polysaccharide vaccine from immunotype 1 Pseudomonas aeruginosa. J Clin Invest. 1982 Feb;69(2):303–308.

6. Pier GB, Desjardins D, Aguilar T, Barnard M, Speert DP. Polysaccharide surface antigens expressed by nonmucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 1986 Aug;24(2):189–196.

7. Gilleland HE, Gilleland LB, Greer JM. Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infect. Immun.* 1988. 56(5): 1017–1022.

8. Goldberg JB, Rao J. Oral Vaccination of BALB/c Mice with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Expressing *Pseudomonas aeruginosa* O Antigen Promotes Increased Survival in an Acute Fatal .Pneumonia Model.Infect& Immun. 2004. 7012–7021

9.Ghazanfari.T,Hassan.ZM,Ebrahimi.Immmunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity . Int Immunopharmacol. 2002 .;2(11):1541-9.

10. Ghazanfari T,Hassan ZM,Khamesipour.Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (Allium sativum) treatment . J Ethnopharmacol. 2006 20;103(3):333-7.

11. Guttormsen H.K,Sharpe A.H,et al.Cognate stimulatory B-Cell–T-Cell interactions are Critical for T-Cell Help recruited by Glycoconjugate Vaccines.Infect and Immun.1999.67: 6375-6384.

12.Kashef N, Behzadian-Nejad Q, et al. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Alginate-Tetanus Toxoid Conjugate. Annals of Microbiology,.2006.

13. Kashef N, Behzadian-Nejad Q, et al. Preliminary investigation on the isolation of alginate produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Annals of Microbiology, (2005) .55 (4) :279-282