مقایسه تأثیر دو ادجوانت نانوپارتیکل PMMA وآلوم همراه با DNA واکسن حاوی ژن کامل SAG3 توکسوپلاسما گوندی سویه RH برایمنی زایی و میزان بقا در مقابل عفونت توکسوپلاسمایی در مدل حیوانی

حسین ثباتی[۱]، عبدالحسین دلیمی اصل[۲]*، بهرام کاظمی[۳]، فاطمه غفاری فر[۲]

۱ استادیارگروه انگل شناسی وقارچ شناسی دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله(عج)، تهران، ایران
۲ استاد گروه انگل شناسی و حشره شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳ استاد گروه انگل شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*نشانی برای مکاتبه: dalimi_a@modares.ac.ir

دریافت مقاله : مرداد نود و شش پذیرش برای چاپ: مهر نود و شش

چکیده

سابقه وهدف: *توکسوپلاسما گوندی یک انگل داخل سلولی اجباری با انتشارجهانی و عامل توکسوپلاسموزیس درانسان وحیوانات است. آنتی ژن سطحی بزرگ SAG3 درمراحل مختلف سیکل زندگی انگل بیان شده و در اتصال وحمله به سلولهای میزبان نقش مهمی را ایفاء می نماید. درسالهای اخیرپیشرفتهای چشمگیری درزمینه شناخت کاندیدهای مناسب واکسن صورت گرفته است.هدف این مطالعه ساخت DNA واکسن از ژن کامل سطحی۳(SAG3) توکسوپلاسما گوندی و ارزیابی پاسخ های ایمنی ناشی از آن در موشهای BALB/c با استفاده از دوادجوانت نانوپارتیکلPMMA (Poly(Methyl Methacrylate)Nanoparticles) و آلوم و مقایسه آنها با گروههای کنترل بوده است.*

روش کار: *جهت بررسی ایمنی زایی این واکسن ، ایمونیزه نمودن موشهایBALB/c سه بار به فواصل سه هفته ای به صورت داخل عضلانی توسط pcSAG3 و pcSAG3+ Alum ، pcSAG3+PMMA به عنوان گروههای تست و PBS, pcDNA3 , pcDNA3+Alum,pcDNA3+PMMA به عنوان گروههای شاهد انجام شد.پاسخهای ایمنی ناشی ازایمونیزاسیون با اندازه گیری سطح آنتی بادیها وسیتوکینها و میزان بقای موشها بعدازچالش مورد ارزیابی قرارگرفت.*

یافته ها: *پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی در گروههای واکسینه شده با pcSAG3 ، pcSAG3+ Alum و pcSAG3+PMMA افزایش معنی داری را در درمقایسه با گروههای کنترل با ($P<0.05$) نشان داد که این نتیجه با تستMTT تایید شد. میزان متوسط بقای موشها درگروههای کنترل ۹ روز و ۲۰ ٪ گروههای تست تا بیش از ۱۲۰ روز زنده بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که میتوان با استفاده از pcSAG3 به عنوان DNA واکسن موجب تحریک پاسخ های ایمنی هومورال وسلولی و درنتیجه افزایش طول عمر موش ها دربرابرتوکسوپلاسموزیس شده و یک حمایت نسبی وموثرایجاد نمود.یافته ها نشان داد این ژن می تواند کاندید مناسبی برای واکسیناسیون برعلیه توکسوپلاسموزیس باشد.*

واژگان کلیدی:توکسوپلاسما گوندی، DNA واکسن،ایمنی زایی،آنتی ژن SAG3 ، ادجوانت نانوپارتیکل PMMA وآلوم

مقدمه

توکسوپلاسماگوندی انگل تک یاخته ای داخل سلول اجباری است که موجب توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات می‌شود(۱). توکسوپلاسما گوندی عامل بیشترین عفونت انگلی دردنیا است وسطح گسترده ای ازمیزبانان شامل انسانها،حیوانات اهلی وپرندگان را آلوده می‌کند.این انگل دشمن بالقوه انسان ویکی ازچهار فاکتورمنجربه تولد جنین غیرعادی درزنهای حامله می باشد(۲).عوارض شدید و کشنده توکسوپلاسموزیس در انسان ها و حیوانات، محققین را بر آن داشته که مطالعات و تحقیقات گسترده ای برای ساخت و توسعه واکسن های مؤثر علیه این بیماری انجام دهند.یک واکسن مؤثر علیه توکسوپلاسما گوندی واکسنی است که بتواند از عوارض شدید و کشنده این انگل در جنین و افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی جلوگیری کرده و همچنین باعث کاهش ضررهای اقتصادی شود(۳).تحقیقات زیادی روی آنتی ژنهای مختلف توکسوپلاسما انجام شده ولی اخیرا توجهات اصلی بیشتر بر روی

توکسوپلاسماگوندی انگل تک یاخته ای داخل سلول اجباری است که موجب توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات می‌شود(۱). توکسوپلاسما گوندی عامل بیشترین عفونت انگلی دردنیا است وسطح گسترده ای ازمیزبانان شامل انسانها،حیوانات اهلی وپرندگان را آلوده می‌کند.این انگل دشمن بالقوه انسان ویکی ازچهار فاکتورمنجربه تولد جنین غیرعادی درزنهای حامله می باشد(۲).عوارض شدید و کشنده توکسوپلاسموزیس در انسان ها و حیوانات، محققین را بر آن داشته که مطالعات و تحقیقات گسترده ای برای ساخت و توسعه واکسن های مؤثر علیه این بیماری انجام دهند.یک واکسن مؤثر علیه توکسوپلاسما گوندی واکسنی است که بتواند از عوارض شدید و کشنده این انگل در جنین و افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی جلوگیری کرده و همچنین باعث کاهش ضررهای اقتصادی شود(۳).

تحقیقات زیادی روی آنتی ژنهای مختلف توکسوپلاسما انجام شده ولی اخیرا توجهات اصلی بیشتر بر روی آنتی‌ژن‌های سطحی انگل متمرکز شده‌است.سطح تاکی زوئیت ها وبرادی زوئیت ها با آنتی ژنهای سطحی اختصاصی متعددی به نام SAG پوشیده شده که به GPI متصل شده است(۶-۴). مهمترین آنتی ژنهای سطحی بزرگ تاکی زوئیت ها SAG1(30kDa)، SAG2(22kDa)، SAG3(43kDa) می باشند(۷).

SAG3خیلی شبیهSAG1 درساختمان ووظایف بوده(۷) وبه غشاءازطریق گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول متصل می شود(۸). این دو پروتئین در تهاجم واتصال به سلول نقش مهمی دارند.SAG3 درسطح تاکی زوئیت وبرادی زوئیت واسپوروزوئیت وجود دارد و از پروتئینهای مهم سطحی توکسوپلاسما است(۱۰،۹).SAG3 از اعضای سیستم redundant رسپتوری توکسوپلاسما است که بعنوان واسطه لیگاند درشناخت واتصال به سلول میزبان ودر پیشرفت عفونت نقش مهمی دارد(۱۲،۱۱). SAG3 اولین پروتئین باند شونده به مولکولهای هپارین آمینوگلیکانهای سلول میزبان با افینیتی بالا بوده که به طور اختصاصی باآنها واکنش داده ولی SAG1 دارای چنین نقشی نمی باشد(۱۱).

DNA واکسن یک موضوع جدیدی است که مطالعات گسترده ای روی آن انجام شده و یا در حال انجام است.DNA واکسن در مقایسه با واکسن های پروتئینی توانایی بیشتری برای القا و تحریک همه مسیرهای ایمنی به ویژه ایمنی سلولی(Cytotoxic T-cell) دارد و ایمنی زایی با آن باعث القای پاسخ های ایمنی ازجمله پاسخهای ایمنی هومورال وسلولی شده وموجب حفاظت برعلیه عفونت انگلی می شود (۱۴،۱۳). تزریق آنتی ژن همراه با یک ادجوانت امکان استفاده‌از مقادیر بسیار کمتر از آنتی ژن و بدست آوردن تیتر بیشتر آنتی بادی را فراهم می کند.

ترکیبات آلومینیومی می توانند با تحریک مستقیم و غیر مستقیم سلولهای دندریتیک، فعال کردن کمپلمان و تحریک ترشح سایتوکاین ها باعث افزایش بیشتر پاسخهای ایمنی می شوند(۱۶، ۱۵).ادجوانت آلومینیومی مانند آلوم از طریق جذب الکترواستاتیک آنتی ژن را جذب می کند. نانو پارتیکلها ادجوانتهایی هستند که از ذراتی به اندازه ۱ تا۱۰۰نانومترتشکیل شده وازآنها جهت تاثیربهتر داروها و واکسنها استفاده می شود.یکی ازاین نانوپارتیکلهاPMMA (Poly(Methyl Methacrylate)Nanoparticles) است که مطابق بررسی ها موجب افزایش پاسخهای ایمنی به انواع متنوعی ازآنتی ژنها می شود(۱۸،۱۷).

باتوجه به ویژگی های گفته شده در باره SAG3 و عدم وجود مطالعه ای درخصوص ایمنی زایی DNA واکسن آن همراه با دو ادجوانت نانوپارتیکل PMMA (Poly(Methyl Methacrylate)Nanoparticles) وآلوم درایران و دنیا مارا برآن داشت که کارآیی آن را درالقای پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال و اثر حفاظتی آن در موش ها بعد از چالش با سویه کشنده RH توکسوپلاسما گوندی موردبررسی وارزیابی قراردهیم.

روش کار

این تحقیق در گروه انگل شناسی وحشره شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس وبا تایید معاونت پژوهشی آن دانشکده انجام شده است. موشهای ماده BALB/c حدود۸-۶ هفته سن ازموسسه واکسن وسرم سازی رازی خریداری و تحت شرایط عاری از آلودگی نگهداری شد. کاربا آنها مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت و مجوز کلی کمیته اخلاق دانشگاه به مسئول حیوانخانه حیوانات آزمایشگاهی ومطابق با راهنمای نحوه کارباحیوانات آزمایشگاهی انجام شده است. .برای تهیه آنتی ژن مورد نیاز جهت تست الیزا وچالش موشهای ایمونیزه شده ازتاکی زوئیتهای سوشRH توکسوپلاسما گوندی استفاده شد. انگلها باتزریق داخل صفاقی به موشهایBALB/c درگروه انگل شناسی دانشکده پزشکی تربیت مدرس و دانشگاه تهران تهیه گردید. تاکی زوئیتهای جمع آوری شده ازمایع صفاقی با PBS سوسپانسیون وچندین بار جهت شستشو سانتریفوژ شد (۱۹).بعدازشستشو چندین بارباروش انجمادوذوب آنتی ژن های انگل آزاد و پس ازسانتریفوژ مایع رویی توسط فیلتر۰/۲میکرومترفیلتر وغلظت پروتئین حاصل با روش لوری مشخص شد(۲۰).تهیه پلاسمید و تأیید بیان ژنSAG3 درسلول یوکاریوتیک مطابق روشهای گفته شده انجام شد(۲۲،۲۱).

موشهای ماده BALB/c به هفت گروه ۱۱تایی جهت ایمن سازی تقسیم شدند.چهارگروه به عنوان کنترل وسه گروه به عنوان تست انتخاب شدند.تزریق مقدار۱۰۰ میکروگرم از پلاسمید تهیه شده در۱۰۰میکرولیتر ازماده تزریقی با سرنگ درران راست وچپ پای موش (هرعضله۵۰ میکرولیتر) در۳نوبت به فاصله ۳هفته درروزهای ۱،۲۱و۴۲ انجام شد.

از۷ گروه دارای ۱۱سرموش تعداد ۵ سر ازهرگروه به طورتصادفی انتخاب شده و ازگوشه چشم آنها درروزهای۴۲ و۶۳بعدازتزریق دوم وسوم خون گیری به عمل آمد.بررسی ایمنی هومورال با اندازه گیری مقدارIgG تام سرم و ساب تایپهای IgG1,IgG2a و با استفاده از تکنیکELISA انجام شد(۲۳) .به منظور بررسی سطح آنتی بادی در موشهای آلوده (کنترل مثبت) و فاقد آلودگی به انگل (کنترل منفی) مقادیر بهینهٔ آنتی ژن، رقت سرم و رقت آنتی بادی کونژوگه با تکنیک Checker board titration ELISA تعیین گردید. مقدارIgG تام و ساب تایپ IgG1 با روش الایزای غیرمستقیم و ساب تایپIgG2a با روشCapture ELISA و با استفاده از کیت Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents مطابق با دستورالعمل شرکت Sigma انجام شد.جهت بررسی آنتی بادیهای اختصاصی تولیدشده برضدآنتی ژن درموشها، کف چاهکهای پلیتهای ۹۶ خانه ایی را با آنتی ژن توکسوپلاسمای رقیق شده درفسفات بافر۰/۰۵مول با PH ۸ = به مقدار۵۰ میکرولیتربا غلظت ۱۰μg/ml کوت نموده و پلیتها شبانه در۴درجه سانتی گراد انکوبه شد.شستشوی پلیت با بافر TBST، ۴ بارهربار ۵-۱دقیقه انجام وسپس آنها را روی کاغذ خشک نموده و بعد ۲۰۰ میکرولیتر محلول بلوکر(بافرTBSTبه همراه۱٪آلبومین سرم گاوی) به همه چاهکها اضافه و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. پس ازاین مدت شستشوی پلیت مانند مرحله دوم انجام و سپس مقدار۱۰۰ میکرولیتر ازسرم موش رقیق شده با بلوکر که در ۴ رقت ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۲۰ و ۱:۴۰ تهیه شده بود به هرچاهک پلیت ازهررقت اضافه شد. لازم به توضیح است که ازهر رقت بصورت duplicate در چاهک ها تکرار شده بود. پلیت مذکور ۲ ساعت در ۳۷ °C انکوبه و بعد مانند مرحله دوم آن را شستشو داده وسپس به هرچاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی موس کونژوگه شده با پراکسیداز (تهیه شده‌از شرکت فراطب رازی) با رقت ۱:۱۰۰۰۰اضافه شد.مجددا پلیت در انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۲ ساعت انکوبه و بعد با بافر TBST ، ۵ بار شستشو شد. سپس به هرچاهک در تاریکی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB آماده شده اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه درجای تاریک(در این مرحله باید پلیت در فویل پیچیده شود و از نور دور باشد) انکوبه شد. پس ازاین مدت به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول اسید سولفوریک ۲ مولار جهت توقف وجلوگیری از ادامه واکنش اضافه و سپس میزان جذب نوری آنها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید(۲۴) . برای تعیین میزان سیتوکین های تولید شده دربدن موشها، ۴ هفته پس از تزریق سوم(روز۷۰)، طحال ۵ سر ازموشهای ایمونیزه شده درهرگروه درشرایط استریل خارج ودرپلیت استریل زیرهود له گردید(۲۴). لنفوسیتهای زنده موجود درطحال هرموش شمارش وبعد به میزان مساوی درپلیتهای شش خانه ایی حاوی محیط RPMI1640(Gibco) و%FCS20(Gibco) ریخته شد. به تعدادی از چاهک ها ۴۰μg/ ml آنتی ژن لیزشده توکسوپلاسما (TLA) و یا ۱۰μg/ ml فیتوهماگلوتینین به عنوان میتوژن اضافه و به تعدادی از چاهک های محیط کشت به عنوان کنترل هیچ آنتی ژنی افزوده نشد. جهت تکثیرلنفوسیتها پلیت کشت درانکوباتورCO2دار ۳۷ درجه به مدت ۴۸ تا۷۲ ساعت انکوبه شد.. آزمایش MTT جهت بررسی حداکثرتحریک لنفوسیت ها درگروههای تست (با تحریک آنتی ژن) وکنترل (بدون تحریک آنتی ژن) انجام شد و نسبت SI یعنی نسبت بین جذب نوری سلولهای تحریک شده و سلولهای تحریک نشده محاسبه گردید. برای بررسی میزان سیتوکینهای IL4 وIFNγ تولیدشده توسط لنفوسیتهای تحریک شده، مایع رویی محیط کشت بعداز۴۸و۷۲ساعت جمع آوری و موردارزیابی قرارگرفت.غلظت سیتوکینها باکیت الیزای U-cytek,Holand برطبق دستورالعمل آن انجام ومقدارجذب نوری (OD)نمونه ها با الیزا ریدردر طول موج۴۵۰ نانومتر قرائت شد(۲۴،۲۵). جهت بررسی آنتی بادیها وسیتوکینها در همه نمونه های تهیه شده سه بار آزمایش تکرار شد.عمل چالش بعداز۷۰روز روی ۶ سر موش باقی مانده ازهرگروه توسط10^4 ×۱/۴تاکی زوئیت سویه RH انگل توکسوپلاسما گوندی به صورت داخل صفاقی انجام ومتعاقب آن میزان بقای موشهای هرگروه(برحسب روز) تا ۱۲۰روزبعداز چالش ثبت شد.برای ارزیابی ایمنی زایی و سنجش آنتی بادیها و سیتوکینهای تولیدشده در گروههای تست و کنترل و زمان بقای موشها چالش شده با سوش RH توکسوپلاسما گوندی از روشهای آماری Kaplen-Meier ، من ویتنی و کروسکال-والیس استفاده شد. نتایج حاصل با استفاده ازنرم افزار SPSS نسخه ۱۶ با هم مقایسه و نمودار آنها به کمک نرم افزارExcel رسم و مورد تجزیه وتحلیل قرارگرفت

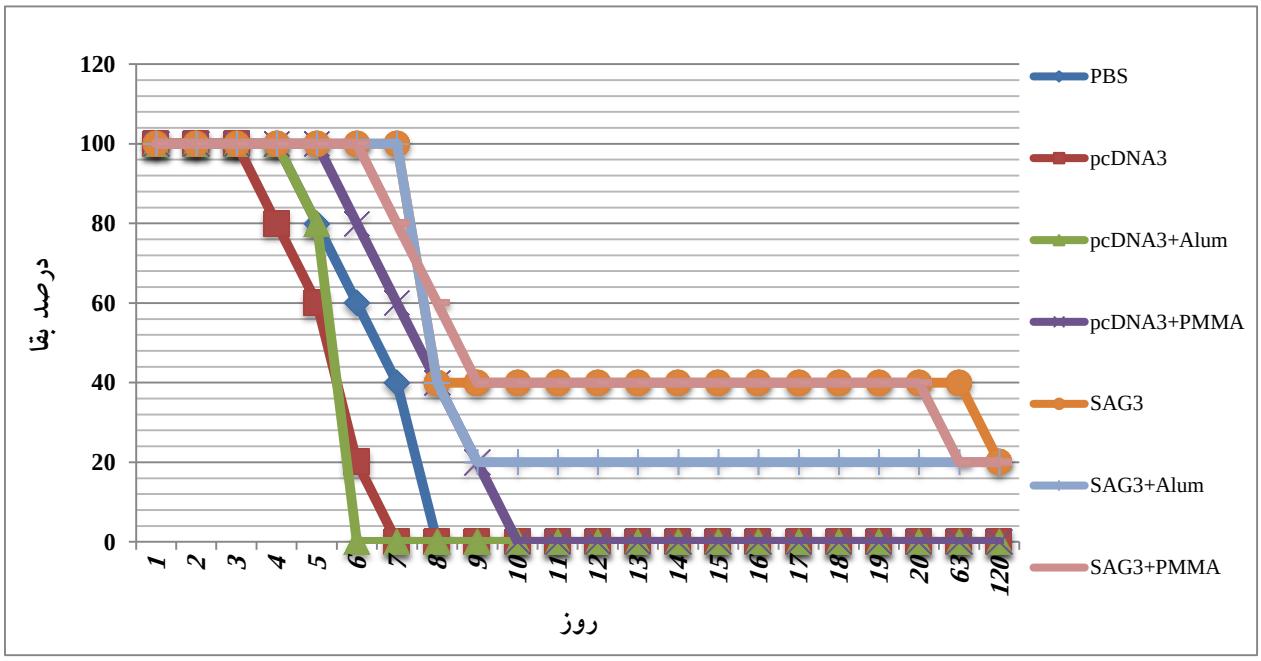
.

یافته ها

نتایج طرزتهیه پلاسمید pcSAG3 وبیان ژن SAG3 قبلا گزارش شده است(۲۱،۲۲). ثبت ژن کلون شده توسط ما دربانک جهانی ژن درتاریخ 23Feb.2011 به شماره JF312642 ثبت شده است.جهت ارزیابی تاثیر این روش واکسیناسیون و محافظت ایجاد شده برعلیه توکسوپلاسماگوندی ،موشهای ایمونیزه شده با تاکی زوئیتهای سوش RH این انگل چالش شدند.زمان زنده بودن گروههای تست وشاهد بایکدیگراختلاف داشت.اختلاف آماری معنی دار بیشتری درموشهای واکسینه شده با pcSAG3+PMMA، SAG3 ، pcSAG3+ Alum درمقایسه با گروههای کنترل دیده شد. موشهای ایمونیزه شده با PBS، pcDNA3+Alum، pcDNA3، pcDNA3+PMMA درمدت ۹-۷ روز مردند.مرگ ومیرگروههای تست ازروز۸ شروع شد.حدود۴۰٪گروهpcSAG3 تا قبل ازروز۱۲۰ زنده و ازآن به بعد به ۲۰٪رسید.درصدزنده ماندن گروه pcSAG3+Alum درروز۸ به۴۰٪وازروز۹ تا۱۲۰و بعدازآن۲۰٪ بود.درصدزنده ماندن گروه pcSAG3+PMMA درروز۸ به ۶۰٪ و درروز۹ و۱۰به ۴۰٪ وسپس تاروز۱۲۰ و بعدازآن هنوزحدود۲۰٪ موشها زنده بودند. نتایج آنالیز آماری نیز نشان دهندهاختلاف معنی دار با (P<۰/۰۵)بین بقاء موشها در همه گروههای اصلی با گروههای کنترل بود. مهمترین نتیجه بدست آمده درمطالعه حاضرافزایش بقاء موشهای ایمونیزه شده با واکسن pcSAG3 دراثر چالش باسوشRH توکسوپلاسما گوندی وزنده ماندن ۲۰٪ ازآنها حتی بعداز۴ماه بوده است(جدول ۱ و نمودار ۱).

جدول۱. تعدادروزهای زنده ماندن ودرصد بقاء موشهای چالش شده با$1/4\times10^4$تاکی زوئیت زنده سویه RH توکسوپلاسما گوندی درگروههای تست وکنترل

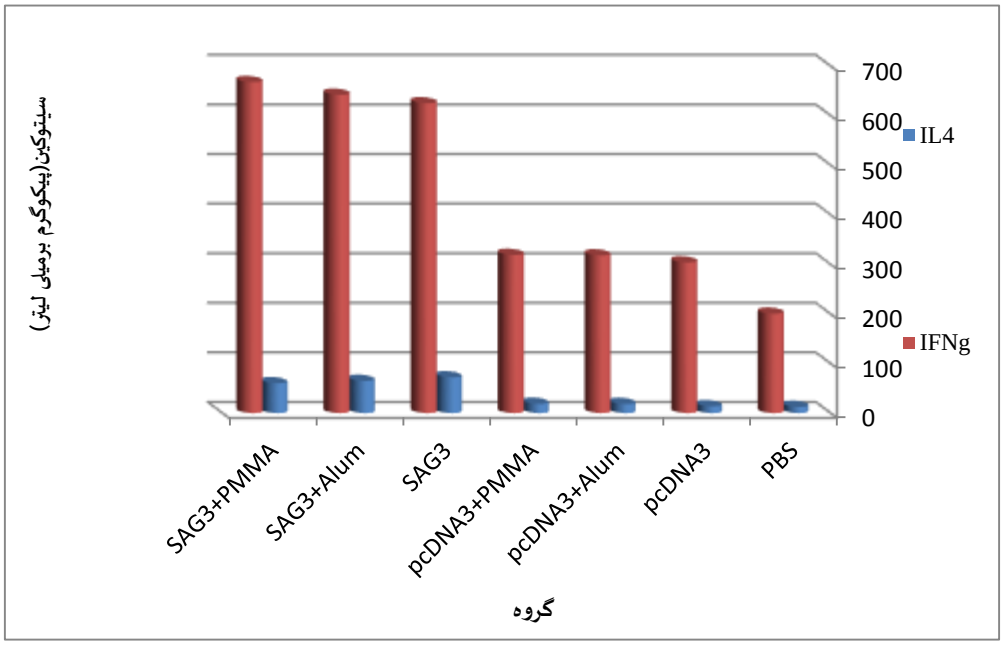
گروه / روز	PBS	pcDNA3	pcDNA3 + Alum	pcDNA3 + PMMA	pcSAG3	pcSAG3 + Alum	pcSAG3 + PMMA
۰	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۱	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۲	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۳	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۴	۱۰۰٪	۸۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۵	۸۰٪	۶۰٪	۸۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۶	۶۰٪	۲۰٪	۰	۸۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۷	۴۰٪	۰	۰	۶۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
۸	۰	۰	۰	۴۰٪	۴۰٪	۴۰٪	۶۰٪
۹	۰	۰	۰	۲۰٪	٪ ۴۰	۲۰٪	۴۰٪
۱۰	۰	۰	۰	۰	۴۰٪	۲۰٪	٪ ۴۰
۱۱-۶۳	۰	۰	۰	۰	۴۰٪	۲۰٪	۲۰٪
۱۲۰- ۶۴	۰	۰	۰	۰	۲۰٪	۲۰٪	۲۰٪



نمودار ۱.در صد بقاء موشهای چالش شده با $۱/۴\times۱۰^{۴}$ تاکی زوئیت زنده سویه RH توکسوپلاسما گوندی درگروه‌های تست وکنترل

جهت بررسی تولید INFγ و IL-4 درموشهای واکسینه شده با پلاسمید فاقد آنتی ژن و دارای آنتی ژنSAG3 ، طحال آنها چهارهفته بعداز ایمونیزه کردن مرحله سوم و نهایی از بدن خارج شد. درشرایط استریل سوسپانسیون سلولی از طحال آنها تهیه و درپلیتهای دارای محیط کشت با آنتی ژن لیزشده توکسوپلاسما گوندی جهت تحریک آنها مخلوط شد. این آنتی ژن درموشهای ایمونیزه شده با pcSAG3 ، pcSAG3+PMMA و pcSAG3+ Alum میزان زیادتری INFγ نسبت به گروههای شاهد تولید نمود و اختلاف آماری معنی داری($P <$ ۰/۰۵). بین آنها وجوددارد(نمودار۲)

.



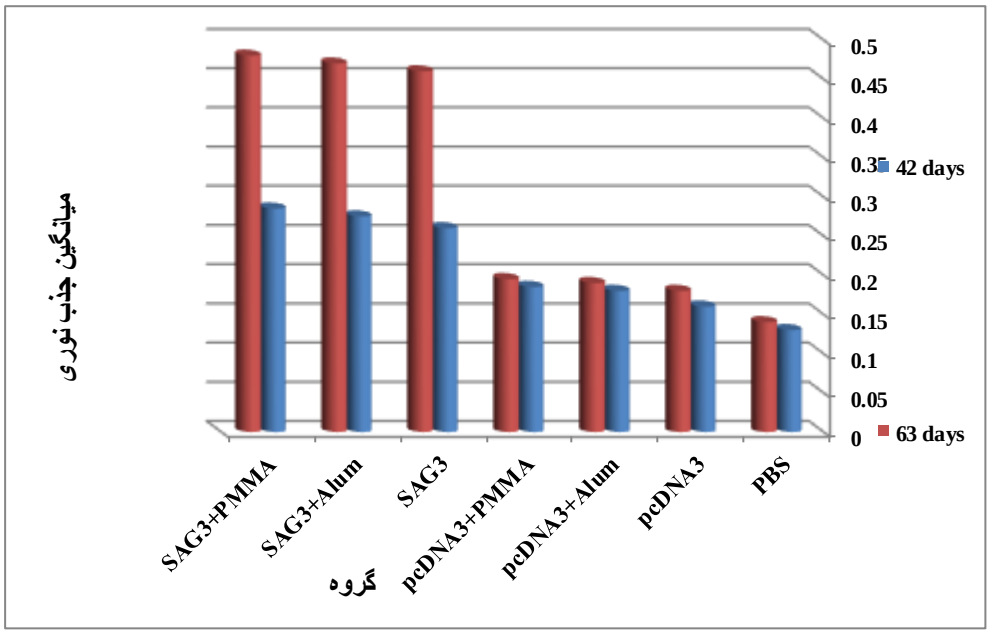
نمودار۲.مقایسه میانگین سیتوکین های IL4 وIFNγ تولید شده ازکشت لنفوسیتهای طحال موشها درمدت ۷۲ساعت در گروههای تست وکنترل

درجدول۲ نتایج سنجشMTT درگروههای تست وکنترل بایکدیگرمقایسه شده است.همانطورکه ملاحظه می شود نسبت SIدرگروههای تست بالاترازگروههای کنترل بوده است

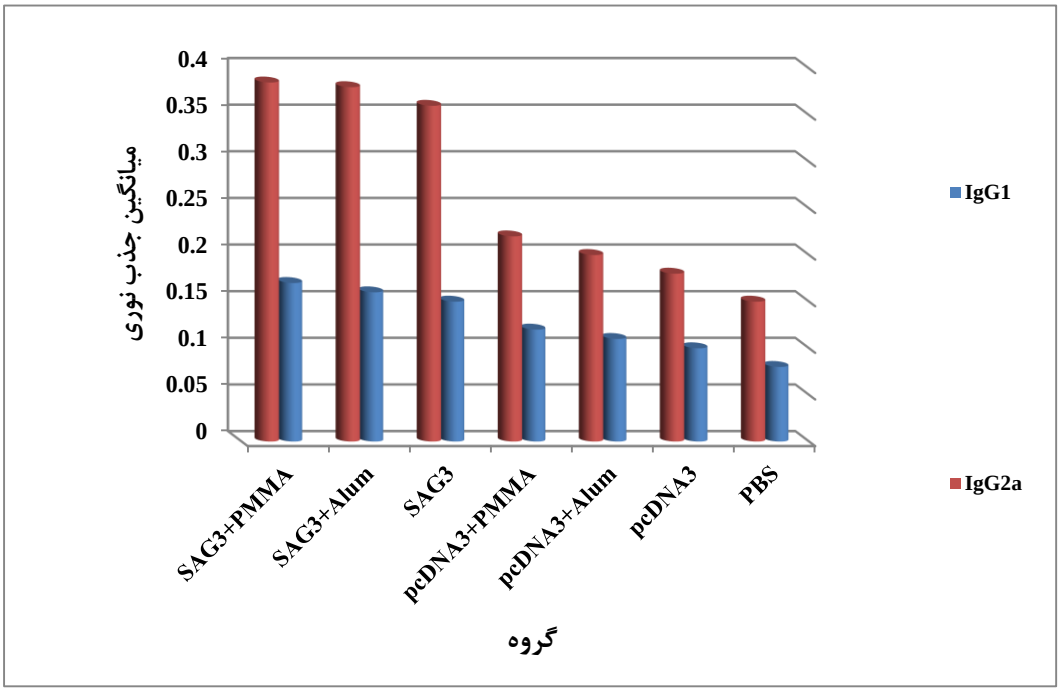
جدول۲. نتایج MTT در گروههای تست وکنترل براساس سنجش SI (نسبت بین جذب نوری سلولهای تحریک شده و سلولهای تحریک نشده)

گروه	ماده تزریقی	SI
۱	PBS	۱/۰۸۰
۲	pcDNA3	۱/۱۰۰
۳	pcDNA3+Alum	۱/۱۳۰
۴	pcDNA3+PMMA	۱/۱۳۵
۵	pcSAG3	۱/۷۵۰
۶	pcSAG3+ Alum	۱/۷۵۵
۷	pcSAG3+PMMA	۱/۷۶۰

ارزیابی ایمنی هومورالبا روش الیزا نشان داد که میزانIgG توتال درروز۶۳ نسبت به روز۴۲ و ساب تایپIgG2a نسبت بهIgG1 در سرم خون موشهایایمونیزه شده با آنتی ژنSAG3 به تنهایی ویا همراه با ادجوانت آلوم یا PMMA نسبت به گروههای کنترل افزایش قابل توجهی داشته است(نمودار۳و۴).آنالیز داده ها نشان دادکه اختلاف آماری معنی داری بین گروههای تست و کنترل وجوددارد($P < ۰/۰۵$).



نمودار ۳. مقایسه میانگین توتال سرم IgG تولیدشده در دو نوبت خونگیری درسرم موشها درگروههای تست وکنترل



نمودار۴.مقایسه میانگین IgG1 وIgG2a تولیدشده درسرم موشها درگروههای تست وکنترل

بحث

DNA واکسنها قادربه حفاظت ازانسان وحیوانات درمقابل عوامل عفونی وبیماریزا به ویژه انگلهای داخل سلولی است ومی توان ازآنها به منظور تولیدپاسخهای قوی ایمنی نوعTh1وTh2درمیزبان استفاده نمود(۲۶).انتخاب نوع ادجوانت درطراحی واکسن ازدوجنبه ایمنوادجوانتی ماده و امکان استفاده درحیوان وانسان دارای اهمیت است(۲۷). نمکهای آلومینیومی ویا نانوپارتیکلها رایج ترین ادجوانتهای مورد استفاده در واکسنهای حیوانی وانسانی است(۱۵،۱۷).درمطالعه حاضرقدرت ایمنی زایی وتوانایی حفاظتی پلاسمید نوترکیبpcSAG3 به عنوان DNA واکسن ساخته شده همراه با هیدروکسید آلومینیم(آلوم) و نانوادجوانتPMMA بررسی وآزمایش شد. نتایج تحقیق نشان داد که ایمنی زایی موشهایBALB/c با۱۰۰میکروگرم از pcSAG3 قادربه القای یک پاسخ حفاظتی نسبی برعلیه سویه کشنده RH توکسوپلاسما گوندی است.

ایمونیزاسیون موشهایBALB/c توسط ،اسلامی باآنتی ژن ROP1(۲۴) ،سیدطبایی باآنتی ژنهایSAG1 و HSP70 (۲۸)،خسروشاهی باROP2 و SAG1 (۲۹)،صلح جو با SAG1(۳۰) ،غفاری فربا GRA5 و MIC3 (۳۱) انجام شد. نتایج چالش موشها سه هفته بعدازآخرین تزریق با سوشRH توکسوپلاسما نشان دادکه مرگ ومیرهمه موشهادرمدت بین ۹تا۱۱روزاتفاق افتاده است.

Lee وهمکاران موشهای BALB/c ایمونیزه شده با پروتئین نوترکیب حاصل ازSAG3 را با کیستهای سوشMe49 چالش نمودند.نتایج نشان داد۲۰٪موشهای ایمونیزه شده با SAG3زنده مانده واختلا ف آماری معنی داری با P<۰/۰۵ بین آنها وگروه کنترل وجودداشت (۷).

Caetanoوهمکاران با ایمونیزه کردن موشهای BALB/c با آدنوویروسهای کد کننده SAG1,SAG2,SAG3 نشان دادند که پاسخهای ایمنی سلولی ازنوع Th1 برعلیه این سه آنتی ژن در بدن آنها تولید می شود(۳۲).

Mishima وهمکاران موشهای BALB/c را با آنتی ژنهای SAG1،SAG2 ،SAG3، SRS1 وP45 تهیه شده ازسوش RHتوکسوپلاسما گوندی ایمونیزه کرده ودو هفته بعدازایمونیزاسیون دوم آنها را با سوشBeverley توکسوپلاسما بطورداخل صفاقی چالش نمودند. نتایج چالش نشان داد که بالای ۲۵٪موشهای ایمونیزه شده با SAG2, SRS1وP45 به تنهایی ویا مخلوطی از این پنج آنتی ژن تا۱۲۰روز زنده ماندند. ولی همه موشهای ایمونیزه شده با SAG1 یا SAG3 به ترتیب تاروزدهم ویازدهم مردند(۳۳).

Cong و همکاران موشهای BALB/c را با پلاسمیدهای حاوی آنتی ژن مانند pcSAG1 ، pSAG1/ SAG3- CTXA2/B و pSAG1/SAG3 ایمونیزه نموده و با 10^3 تاکی زوئیت سویه RH توکسوپلاسما گوندی چالش نمودند.موشهای گروه کنترل به مدت۶روز و گروه pcSAG1 به مدت ۸ روز زنده بودند. ولی درصدی ازموشهای دوگروه تست یعنی pSAG1/SAG3 و

pSAG1/SAG3- CTXA2/B به ترتیب به میزان ۲۰٪ و ۴۰٪ زنده ماندند(۳۴). دربررسی حاضر همه موشهای گروههای کنترل تاروزدهم مردند ولی میزان ۲۰٪ موشهای گروههای تست ایمونیزه شده با SAG3 به تنهایی و یا با ادجوانت آلوم یا PMMA در مدت ۱۲۰روز پیگری هنوززنده بودند.این نتایج نشان دهنده ایمن زا بودن بیشتر پروتئینSAG3 می باشد. تحقیق حاضر نشان داد تیتر سرمی IgG توتال وIgG2a به دست آمده در دو نوبت خونگیری تقریبا در گروههای تست نسبت به گروههای کنترل بیشتربوده ودارای اختلاف معنی داری بوده است ($P\leq0.05$). به نظرمی رسد نتایج حاصل ازمطالعه حاضر علیرغم تفاوت درماده تزریقی وسوش مورداستفاده درچالش، بانتایجLee و Cong تاحدود زیادی مطابقت دارد.

در بررسی Lee (۷)، Caetano (۳۲) وCong (۳۴) گزارش شده که تولیدIgG ،IFNγ و سلولهای +CD8 افزایش داشته واختلاف معنی داربین گروه واکسینه وکنترل وجودداشته است که با نتایج مطالعه حاضر نیزمطابقت دارد.Caetano (۳۲) باواکسینه کردن موشهای BALB/c با آدنوویروسهای نوترکیب کد کننده آنتی ژنهای سطحیAdSAG1، AdSAG3,AdSAG2 نشان داد که میزان IgG2a نسبت به IgG1 بیشتر تولیدشده است که این نشان دهنده تولید بیشترپاسخ های ایمنی ایجادشده توسط سلولهایTh1 می باشد.

Lee وهمکاران موشهایBALB/c را با پروتئین نوترکیبrSAG3 به تنهایی ویا با ادجوانت QuilA ایمونیزه کردند. آنها نشان دادند که میزان تولیدIgG1 وIgG2a در گروههای تست نسبت به گروه کنترل بیشتربوده و اختلاف آماری آنها معنی داری بوده است(۷). Caetano وLee هردو گزارش کرده اند که میزانIgG1 تولیدشده درگروه تست مشابه گروه کنترل بوده است(۷،۳۲). نتایج مطالعه حاضرنشان دادکه میزان IgG1 تولیدشده درگروه های تست نیز تقریبا نزدیک به مقدارگروههای کنترل بوده است.

نتایج حاصل ازبررسی ما نشان داد که میانگین میزان سیتوکین IFNγ تولید شده درگروه pcSAG3+ PMMA بیشتراز سیتوکینهای تولیدشده درگروههای دیگرتست بوده است. این نتایج به خوبی نشان دهنده فعالیت زیادترسیستم ایمنی سلولی ازنوع Th1و درنتیجه تولیدبیشتر IFNγ واز طرفی افزایش بیشتر آنتی بادی IgG2a بوده است. سیستم ایمنی با تولید وافزایش این مواد به خوبی می تواند از گسترش زخم و بیماری جلوگیری کرده و آن را کنترل نماید.Caetano وهمکاران نشان دادند که موشهای واکسینه شده با آدنوویروسهای کدکننده AdSAG1 , AdSAG2وAdSAG3 به تنهایی ویا مخلوطی ازآنها موجب تولید بیشتر IFNγ درمایع رویی کشت سلولی شده است (۳۲). آنها با مقایسه نسبت بین IFNγ و IL4 تولید شده درمایع رویی کشت بیان داشتند که میزان IL4 کمتر بوده واختلاف بین این دودارای معنی داربود($P<0/05$).Lee (۷) نشان دادکه تولیدسلولهای$CD8^+$ وIFNγ در موشهایBALB/c واکسینه شده به تنهایی باپروتئین نوترکیبrSAG3 ویا ترکیب با ادجوانتQuilA افزایش داشته و درمقایسه باگروه های کنترل یعنی QuilA و GST- QuilA اختلاف آماری معنی دار با $P<0/05$ دارند. بطورکلی پاسخهای ایمنی ایجادشده برعلیه عفونت با توکسوپلاسما گوندی به خصوص پاسخهای تولیدشده توسط سلولهایTh1 ،نقش کلیدی درایمنی محافظتی به موقع بازی کرده که اساس آن تولیدIFNγ مشتق شده از پاسخ سلولهای CTL است(۳۴).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاصل نشان دادکه سیستم ایمنی موشهای واکسینه شده بااین پلاسمید نوترکیب به تنهایی ویاهمراه با ادجوانت آلوم و نانوادجوانت PMMA به سمت پاسخ ایمنیTh1 گسترش یافته است. باتوجه به نقش ژن کامل SAG3 توکسوپلاسما گوندی درتهاجم واتصال به سلول میزبان ووجودآن درهمه مراحل تکاملی انگل می توان ازآن به تنهایی ویا به صورت کوکتل ویافیوژ به همراه دیگرآنتی ژنهایی که ایمنوژن قوی بوده ودرهمه مراحل تکاملی انگل وجوددارند پلاسمیدی نوترکیب تهیه واز آن جهت تشخیص ،کنترل وپیشگیری ازعفونت به توکسوپلاسموزیس استفاده نمود. لذا به نظر می رسد می توان از ژنSAG3 بعنوان یک عامل بالقوه آنتی ژنی و محرک سیستم ایمنی و به عنوان کاندیدی مناسب برای تهیه واکسن های مولکولی به منظور ارتقای پاسخهای ایمنی هومورال وسلولی برعلیه توکسوپلاسموزیس استفاده نمود.

تقدیر وتشکر

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است.نویسندگان از آقای دکترجاوید صدرایی عضوهیئت علمی گروه انگل شناسی تربیت مدرس و خانم قاسمی نیکو کارشناس گروه وآقای دکترسیدمحمدسیدطبایی عضوهیئت علمی گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی وخانم دکترمژگان بنده پورعضوهیئت علمی مرکزبیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی به خاطرهمکاریهای همه جانبه تشکرمینمایند. هیچ تضادی از منافع وجودندارد.

REFERENCES

1.Herda S ,Votypaka J ,Kodym P , Flegr J . Transient nature of *Toxoplassma gondii* induced behavioral changes in mice . *J Parasitol* .2000; 86(4):657-63.
2.Frankel JK,Dubey JP,Miller NL.*Toxoplasma gondii* incats:Fecal stages identified as coccidian oocyst.Science 1970;167:893-896.
3.Haumont M, Delhaye L, Garcia L, Jurado M, Mazzu P, Daminet V, Verlant V, Bollen A, Biemans R, Jacquet A. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. *Infect Immun* 2000; 68(9): 4948–53.
4. Nagel SD, Boothroyd JC. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J Biol Chem*. 1989; 264(10):5569-5574.
5.Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol*. 1998; 28(1): 3-9.
6. Lekutis C,Ferguson DJ,Boothroyd JC.*Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*.2000;96(2): 89-96.
7.lee YH , shin DW, lee JH ,Nam HW , Ahn MH.Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with QuilA. *Yonsei med J* 2007; 48(3):396-404.
8.Cesbron-Delauw M F,Tomavo S,Beauchamps P,fourmaux MP, Camus D,Capron A, Dubremets JF. Similarities between the primary structurers of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J Biolo chemis* 1994;269(23):16217-222.
9.Radke JR, Gubbels M.J, Jerome ME,Radke JB, Striepenand B, White MW. Identification of a sporozoite-specifice member of the Toxoplasma sag superfamily via genetic complementation. *Mole microbial* 2004;52(1):93-105.
10.Lekutis C, Ferguson DJP,Grigg ME., Camps M,Boothroyd JC. Surface antigen of *Toxoplasma gondii* : variation on a theme.*Int.J Parasitol* 2001;31:1285-92.
11.Jacquet A, Coulon L, Neve JD, Daminet V,Haumont M, Garcia L, Bollen A, Margarita J, Biemans R. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. *Mol &Biocam parasitol* .2001;116:35-44.
12.Tomavo S, Schwartz RT, Dubermetz JF.The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996; 219: 45-54.
13.Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: a potential weapon against infection and cancer. *Vox Sang* 2001; 80(1): 12-8.
14. Zhou J, Wang L, Lu G, Zhou A, Zhu M, Li Q, Wang Z,ArkeM, Wang A, He S. Epitope analysis and protection by a ROP19 DNA vaccine against Toxoplasma gondii 2016; 23(17):1-8.
15.Gupta RK, Rost B E .Aluminum Compounds as vaccine adjuvants. In: O Hagan D.T., Ed. Methods in molecular medicine, Vaccine adjuvant: preparation methods and research protocols. *Humana Press Inc* 2000; 42: 65-89.
16. Pitaksuteepong T. Nanoparticles: A Vaccine Adjuvant for Subcutaneous Administration. *Naresuan University Journal* 2005; 13(2): 53-62.
17. Kreuter J.Vaccine Adjuvant.Preparation methods and Research protocols.Ed.Derek T.O′Hagan. Totowa ,Newjersey. *Human press Inc*.2000,P.105-120.
18.Sasaki S, Takeshita F, Xin KQ, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 2003; 31(3): 234-54.
19.Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual, third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor New york . 2001.

20.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 93(1): 265-75.
21.Sobati H, Dalimi AB, Kazemi B, Ghafarifar F. Production SAG3 antigen surface clone of *Toxoplasma gondii* in eukaryotic expression vector. *Iranian Journal of Infectious Diseases & Tropical Medicine*2011; 16 (52): 7 -13.
22. Sobati H, Dalimi AB, Kazemi B, Ghafarifar F. Expression SAG3 antigen surface of *Toxoplasma gondii* in eukaryotic cell. *Iranian Journal of Infectious Diseases & Tropical Medicine* 2012; 17 (56): 21 -26.
23. Xue M, He S, Cui Y, Yao Y, Wang H. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against Toxoplasma gondii. *Parasitol Int* 2008; 57(4): 424-9.
24.Eslamirad Z, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sharifi Z , Zavaran Hosseini A. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by immunization with a plasmid encoding *Toxoplama gondii* ROP1 gene.*African Journal of Biotechnology*2012;11(35):8735-8741.
25.Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, De Roodt AR, Guarnera EA,Angel SO. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(4): 704-10.
26.Crampton A, Vanniasinkam T. Parasite vaccines: the new generation. *Infec Genet Evol* 2007; 7(5): 664-73.
27.Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, De Roodt AR, Guarnera EA,Angel SO. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(4): 704-710
28.Syed tabaei SJ. Preparation of DNA vaccine antigen molecule SAG1 with Chaperony molecules*Toxoplasma gondii* HSP70 and study the protective effect of vaccination with it by measuring IgG and IFNγ in small laboratory mice.PhD dissertation received guidance doctor dalimi, Tarbiat Modarres University, 2008.
29.Hoseinian Khosroshahi K, Ghaffarifar F, D'Souza S, Sharifi Z ,Dalimi A . Evaluation of the immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete SAG1 and ROP2 genes against toxoplasmosis. *Vaccine*2011; 29: 778–783.
30. Solhjoo K, Ghaffari Far F,Dalimi-Asl A ,Sharifi Z. Enhancement of Antibody Immune Response to a *Toxoplasma gondii* SAG1-Encoded DNA Vaccine by Formulation with Aluminum Phosphate.*Journal of Medical Sciences*2007; 7: 361-367.
31. Ghaffarifar F, Naserifar R , Jafari Madrak M. Eukaryotic Plasmids with Toxoplasma gondii Dense Granule Antigen (GRA5) and Microneme 3 (MIC3) Genes as a Cocktail DNA Vaccine and Evaluation of Immune Responses in BALB/C Mice. *J Clin Med Genom* 2014; 3(1):1-5
32.Caetano BC, Romero OB, Fux B, Mendes EA, Penido MLO, Gazzinelli RT.Vaccination with replication deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum gene Ther* 2006;17: 415–426.
33.Mishima M, Xuan X,Shioda A, Omata Y, Fujisaki K,Nagasawa H,Mikami T . Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1. *J.Vet.Med.Sci* 2001;63(4):433-438.
34. Cong H, Zhang M, Xin Q, WangZ, Li Y, Zhao Q, Zhou H and He S. Compound DNA vaccine encoding SAG1/ SAG3with A2/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii. Parasites & Vectors* 2013, 6:63.