

اثر حفاظتی ویتامین D3 و کنزوگه GP63 و توکسویدکراز بر ایجاد زخم‌های جلدی لیشمانيایی در موش BALB/c

آرزو کرمانی جلیلوند^۱، دکتر احمد زواران حسینی^{۲*}، دکتر علی فتاحی بافقی^۳، سارا صعودی^۴

چکیده

مقدمه: GP63 پروتئاز اصلی سطح پروماستیگوتها لیشمانيایی آن نقش مهمی دارد. از آنجا که به تنها بیان قابل برای ایجاد محافظت مؤثر علیه لیشمانيوز نمی‌باشد، هدف این تحقیق بررسی اثر حفاظتی کنزوگه GP63 و توکسویدکراز به همراه ویتامین D3 در موش‌های حساس BALB/c در مقابل لیشمانيوز پوستی می‌باشد.

روش بررسی: این پژوهش مطالعه‌ای بنیادی - کاربردی و به روش تجربی است که از مهر ماه ۱۳۸۱ تا خرداد ۱۳۸۳ در دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. ما $10^9 \times 5$ لپتومناد Leishmania (L.) Major سویه [MRHO/IR/75/ER] را کشت دادیم. ملکول GP63 با روش افینتی کروماتوگرافی تخلیص گردید و با توکسویدکراز کنزوگه شد و برای ایمن‌سازی در ۸ گروه از موش‌های ماده BALB/c استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد موش‌هایی که کنزوگه و ویتامین D3 دریافت کردند از لحاظ افزایش اندازه قطر زخم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P \leq 0.05$). در کشت طحال نیز نشان داده شد که در این گروه بیماری سیستمیک نگردیده است.

نتیجه گیری: بنابراین کنزوگاسیون GP63 با توکسویدکراز که باعث تقویت ایمنی سلولی است و به کار بردن آن همراه با ویتامین D3 که محرك فعالیت ماکروفازهای است می‌تواند نوید بخش تولید یک فراورده مناسب علیه لیشمانيوز باشد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانيایی، مازور، GP63، ویتامین D3، توکسویدکراز، اثر حفاظتی، موش BALB/c

مقدمه

تک یاخته‌ای از گروه تاژکداران ایجاد می‌گردد و با گزش پشه خاکی آلوده منتقل می‌گردد. حداقل ۴۰۰ میلیون نفر در دنیا در خطر ابتلا به این بیماری هستند و حدود ۱۲ میلیون فرد مبتلا وجود دارد. این بیماری طیفی از لیشمانيوز پوستی خود بهبود یابنده تا لیشمانيوز احشایی کشنه دارد. لیشمانيوز پوستی یا سالک به صورتی که در دنیای قدیم مشاهده می‌شود توسط لیشمانياهای متعلق به کمپلکس تروپیکا ایجاد می‌شود. عامل لیشمانيوز جلدی در دنیای جدید گونه‌هایی از لیشمانيای مکریکانا هستند. هر سال

لیشمانيوز یک بیماری آندمیک در چندین بخش جهان شامل آمریکای مرکزی، آسیا و آفریقا است که توسط

* - نویسنده مسئول: - استاد گروه ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی، ص پ ۳۳۱-۱۴۱۱۵
تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۰۷۸۳۰، ۰۲۱-۸۸۰۰۷۸۳۰، نمبر: ۳۰۹۰

E-mail: zavarana@modares.ac.ir
۱- کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- استادیار علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
۳- استادیار علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت: ۸۴/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۳

(D3) تمايز منوسيت ها به ماکروفاز را القا می کند و فعالیت فاگوسیتوز آنها را افزایش می دهد^(۱۴) و فعالیت سایتوکسی سیتی ماکروفازها را می افزاید^(۱۵). از آنجا که ماکروفازها هنگامیکه توسط سایتوکائینها فعال می شوند، NO تولید می کنند، در کنترل عفونت نقش دارند.^(۱۶)

هدف ما در این تحقیق خالص سازی آنتی ژن GP63 و کثروگه کردن آن با توکسوید کراز به عنوان حامل ملکول و استفاده از آن به همراه ویتامین D3 برای تهیه فراوردهای با کارایی مناسب، ارزیابی اثر حفاظتی فراورده تهیه شده در موش حساس آزمایشگاهی BALB/c و بررسی اینکه آیا این کثروگه به همراه ویتامین D3 قادر به فعال کردن سیستم ایمنی موشهای BALB/c و مقاوم کردن آنها نسبت به عفونت بوده است.

روش بردی

این پژوهش مطالعه‌ای بنیادی - کاربردی به روش تجربی است که از مهر ۱۳۸۱ تا خرداد ۱۳۸۱ توسط گروه ایمنی شناسی دانشگاه تربیت مدرس طی ۷ مرحله انجام پذیرفت:

۱- کشت و جمع آوری انگل Leishmania (L.) Major

سویه خاص ایران:

Leishmania (L.) Major سویه ایران در محیط کشت (Sigma) FCS (Gibco, USA) RPMI-1640 میزان انبوه کشت داده شد. پرماستیگوتهای جمع آوری شده بعد از سه بار شستشو با ۰/۱۵ PBS (pH=۷/۲) در ۲۰۰۰ × به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد و به انگلها مقدار ۳ml RPMI-1640 اضافه گردید و پس از گذراندن زنجیره سرد در ۷۰°C - تا زمان استفاده نگهداری شد. در این مطالعه با این روش ۵ میلیارد لپتومناد فرم لگاریتمی جمع آوری گردید.

۲- تخلیص GP63 با افینیتی کروماتوگرافی

انگلهای جمع آوری شده را پس از رسیدن به دمای محیط در دو لوله ریخته و ۲ بار با ۰/۱۵ PBS (pH=۷/۲) در ۲۰۰۰ × به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در بافر Tris-HCl (Sigma) یک میلی مولار (pH=۷/۲) حاوی مهار کننده پروتئاز PMSF (Sigma) ۹ مرتبه منجمد و ذوب شد

حدود ۱/۵ میلیون مورد لیشمانيوز جلدی ایجاد می شود که بیش از ۹۰ درصد آن در افغانستان، ایران، عراق، عربستان سعودی و سوریه در دنیای قدیم و پر در دنیای جدید است^(۱۷,۱۸).

درمان دارویی، حشره کش و واکسن مناسبي عليه این بیماری وجود ندارد. با وجود اين افرادی که از لیشمانيوز باليني بهبود می یابند مصنونیت مؤثری عليه عفونت مجدد در آنها ایجاد می شود و این موضوع نشان می دهد که تهیه واکسن امکان پذیر است^(۱۹).

گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی (GP63)، پروتئین اصلی سطحي پرماستیگوتهای لیشمانيا است و به علت فراوانی آن و خصوصیت متالوپروتئینازی آن نشان داده شده که در بیماریزابی لیشمانيا نقش دارد. GP63 در تمام گونه های لیشمانيا بسیار محافظت شده است^(۲۰). ملکول GP63 نقش مهمی در چسبیدن پرماستیگوتها به ماکروفاز اینها می کند و چسبیدن از طریق این لیگاند باعث بیگانه خواری و ورود انگل به ماکروفاز می شود. GP63 باعث تسریع تبدیل C3b به C3b در سطح انگل می شود که به عنوان اپسونین برای لیشمانيا عمل می کند و اتصال آن را به رسپتور نوع ۳ کمپلمان (CR3) که رسپتور غالب برای بلعیدن متابایکلیک ها است تسهیل می کند^(۲۱,۲۲).

اثر حفاظتی این ملکول در چندین آزمایش با استفاده از سویه های مختلف موش آزمایش شده و در بین واکسن های زیر واحد آنتی ژن بیشتر از همه مورد آزمایش قرار گرفته است^(۲۳,۲۴). اما GP63 به تنهایی قادر به ایجاد محافظت کامل عليه لیشمانيوز نمی باشد^(۲۵,۲۶). از طرف دیگر واکسن های کثروگه امروزه بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته اند زیرا یک ترکیب منفرد قادر به ایجاد یک پاسخ کاملاً مؤثر نمی باشد زیرا بیش از یک نوع سلول باید تحریک شود که یک پاسخ ایمنی آغاز شود. به طور مثال پلی ساکارید های کپسولی بسیاری از باکتریها اگر به یک پروتئین حامل مثل توکسوید کراز (TT) کثروگه شوند. پیتید های لازم برای شناسایی توسط سلول های T مخصوص آنتی ژن فراهم می شود و پاسخ غیروابسته به سلول T به یک پاسخ وابسته سلول T تبدیل می شود^(۲۷).

از طرف دیگر ویتامین D3 (۱) و ۲۵ - دی هیدرو کسی ویتامین

رازی) و GP63 در برابر تریس M/۰ دیالیز شدند. با روش گلوتارآلدید با کمی تغییرات به صورت زیر کنزوگاسیون صورت گرفت:

ابتدا ۲ ml (GP63 ۳۰ µg/ml) و ۱ ml (توکسیکی کراز ۲۵ µg/ml) (Sigma) در بستر (۱۲۰) به علاوه ۱ ml گلوتارآلدید (۲۵٪) (Sigma) (Pars Azma Co) به مدت ۲ ساعت در ۴۰°C قرار داده شد سپس ۱۰۰ µl گلایسین (MERCK) (۵ mg/ml) به آن افزوده شد و ۲۰ دقیقه دیگر روی همزن مغناطیسی داخل یخچال گذاشته شد^(۲۱). برای جداسازی کنزوگه از سایر ترکیبات از روش ژل فیلتراسیون با استفاده از ژل سفاکریل (Pharmacia) S-300 و باfer تریس mM/۰ با جریان عبوری ۴ ml/h استفاده گردید و با دستگاه جمع آوری نمونه (Pharmacia) فرآکشن‌ها جمع آوری گردید.

۴- ایمن‌سازی موشها

موشها ماده BALB/c ۶ تا ۸ هفتاه ای به وزن ۲۵-۳۰ گرم (تهیه شده از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) در ۸ گروه ۵ تایی تقسیم شدند و مواد زیر را در دو ناحیه زیر بغل به طور زیر جلدی دریافت کردند:

گروه ۱: باfer HCl - mM Tris - ۰/۱ M، گروه ۲: TT، گروه ۳: گروه ۴: ادجوانست کامل فرونند (CFA) (Sunteb Co)، گروه ۵: ویتامین D3 (داروپخشن) (۸۰۰ µg) داخل صفاقی، گروه ۶: GP63 (۵ µg) در ۵۰ µl باfer تریس M/۰۱ mM + ۵۰ µl + ۰/۱ M، گروه ۷: گروه ۸: کنزوگه (۵ µg) در ۵۰ µl باfer تریس M/۰۱ mM + ۵۰ µl + ۰/۱ M، گروه ۹: CFA ۵۰ µg + ۸۰۰ µg ویتامین D3، گروه ۱۰: CFA ۵۰ µl + ۰/۱ M، گروه ۱۱: ۵۰ µl باfer تریس M/۰۱ mM + ۵۰ µl + ۰/۱ M ویتامین D3 (۵ µg) در ۸۰۰ µg (۵ µg) داخل صفاقی + ۵۰ µl باfer تریس M/۰۱ mM + ۵۰ µl + ۰/۱ M CFA ۵۰ µl + ۰/۱ M.

۲ هفته بعد به موشها همین مقادیر تزریق شد فقط ادجوانست ناقص فرونند (Sunteb Co) به جای ادجوانست کامل فرونند جایگزین شد.

۵- آلووده کردن موشها

۴ هفته بعد از تزریق دوم، تعداد ۱۰^۹ پروماستیگوت فرم در قاعده دم موشها تزریق شد و از زمان ظهور ندول

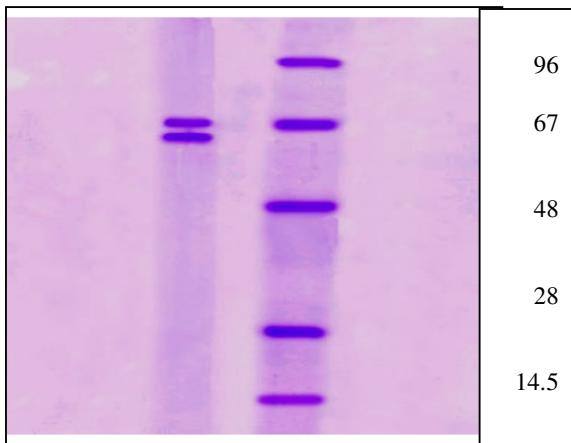
سپس پروماستیگوتنهای لیز شده ۳۰ دقیقه در دور g × ۴۵۰۰ در درمای ۴۰°C با اولتراسانتریفوژ (Sorval combi plus) سانتریفوژ ۱ mM (pH=۷/۲) حاوی سدیم آزاد (MERCK) (۰/۰۲) درصد و فسفولیپاز C (Sigma) افزوده شد و به مدت یک شبانه روز در درمای ۳۷°C داخل انکوباتور (GALLENKAMP) قرار داده شد. سپس این محصول با دور g × ۴۵۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب آن جدا و مایع رویی برای کروماتوگرافی افینیتی نگهداری شد.

ستونی (Pharmacia) به ابعاد (۱۰ × ۱/۴ cm)، ژل mM Tris Sepharose (Sigma) در آن ریخته شد و با - pH=۷/۲ (HCl) شستشو یافتد سپس با ریختن آهسته و تدریجی مایع رویی حاصل از تغليظ و آزادسازی پروتئین‌های انگل بر روی ستون کار تخلیص ملکول GP63 در دو مرحله mM (Sigma) Washing (تریس) ۰/۱ درصد ۲۰ با pH=۷/۲، کلرید کلسیم (MERCK) و کلرید منیزیم (MERCK) CHAPS ۱ mM (MERCK) به عنوان ۲ برابر حجم ستون با جریان عبوری ۴ ml/h از ستون عبور داده شد در مرحله اول باfer Eluting (تریس) ۰/۰۵ M با pH=۷/۲، کلرید کلسیم و کلرید منگنز (MERCK) ۰/۱ M مولار و کلرید سدیم (MERCK) ۰/۰۱ M به میزان ۳ برابر حجم ستون با جریان عبوری ۴ ml/h از ستون عبور داده شد^{(۵)، (۱۰)، (۱۷)}. با روش برادرفورد غلاظت پروتئین تعیین شد^(۱۸). مشخص گردید ۱۰۰ µg GP63 تخلیص گردید. برای اثبات خلوص از روشن PAGE برای مشخص کردن تعداد اجزای پروتئینی، SDS-PAGE برای تعیین وزن ملکولی پروتئین و رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (MERCK)^(۱۹) و DOT-ELISA برای نشان دادن GP63 خالص با آنتی‌بادی منوکلونال ضد GP63 (تھیه شده از انسٹیتو پاستور) و anti-mouse IgG (SUNTEB Co. AP7170) HRP بتنزیدین (Biogen) استفاده گردید^(۲۰).

۳- کنزوگاسیون GP63 و توکسیکی کراز

ابتدا توکسیکی کراز (تهیه شده از موسسه واکسن و سرم‌سازی

شکل ۱ : CBBR-250 Stained PAGA gel . سمت راست نمونه استاندارد، سمت چپ GP63 قبل از احیا برای تعیین وزن ملکولی پروتئین مورد نظر از روش SDS-PAGE با رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو استفاده شد که بعد از ظهور باندها و برآورده وزن ملکولی دو ایزوفرم ۶۷ و ۶۳ کیلودالتونی مشاهده گردید که حاصل احیای پروتئین بودند که در شکل ۲ تصویر آن آمده است.



شکل ۲ : CBBR-250 Stained SDS-PAGE . سمت راست نمونه استاندارد، سمت چپ GP63 بعد از احیا برای نشان دادن خلوص GP63 روش DOT-ELISA به کار رفت که یک روش نیمه کمی است و رنگ تولید شده را می توان با چشم دید و در اینجا فاز جامد به جای پلیت پلی استیرن، کاغذ نیتروسلولوز است. در این روش برای نشان دادن anti-GP63 خالص از آنتی بادی مونوکلونال ضد GP63 و mouse IgG کثروگه با HRP و سویستراپ دی آمینو بنزیدین استفاده گردید و پس از ظهور رنگ مشاهده گردید که هر چه غلظت GP63 بیشتر بود رنگ بیشتری ظاهر شد که تصویر آن در شکل ۳ آمده است.

پس از مشخص شدن خلوص GP63 با توکسوید کزاز کثروگه شد و کثروگه با روش ژل فیلتراسیون در ستون حاوی سفاکریل S-300 از سایر مواد جدا گردید که میزان جذب فراکشن های جمع آوری شده توسط دستگاه جمع آوری فراکشن از ستون سفاکریل S-300 ، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری گردید.

و زخم، وزن و قطر زخم موشها به طور هفتگی تا سیز کامل بیماری ثبت گردید.

۶- بررسی سیستمیک شدن بیماری

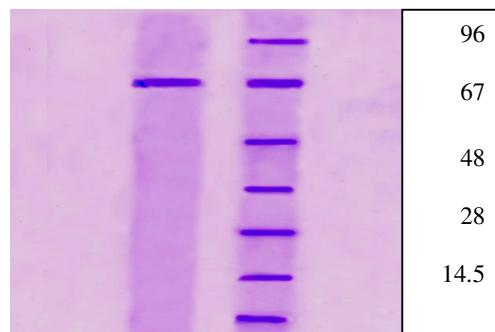
برای این منظور در هفته ۱۴ و ۱۵ از شروع زخم موشها بطور تصادفی از همه گروهها انتخاب شدند و طحال آنها داخل محیط NNN در شرایط استریل انداخته شد و در انکوباتور ۲۵°C نگهداری گردید و بعد از ۷۲ ساعت از نظر حضور انگل مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از روش های آماری مقایسه چندگانه مثل آزمون Tukey HSD و روش Hotelling's Trace Repeat Measure نتایج به دست آمده در محیط in vivo استفاده شد و $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

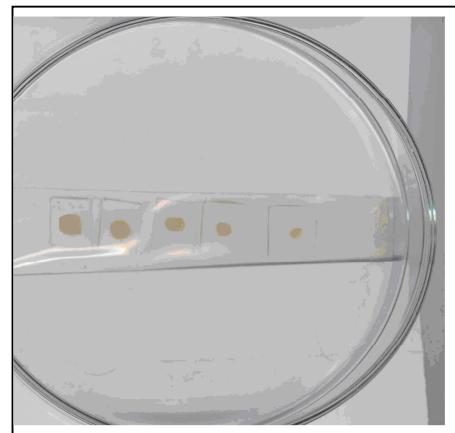
در این مطالعه $10^9 \times 5$ انگل فرم لگاریتمی جمع آوری گردید و از این تعداد انگل، میزان $100 \mu\text{g}$ GP63 ابتدا برای تخلیص گردید. پس از تخلیص و تغليظ GP63 با روش PAGE (بدون احیای نمونه) از روش با رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل و ظهور باندها تک باند مشاهده گردید و این نشان دهنده خلوص پروتئین بود که در شکل ۱ تصویر آن پس از رنگ آمیزی آمده است.



شکل ۱ : CBBR-250 Stained PAGA gel . سمت راست نمونه استاندارد، سمت چپ GP63 قبل از احیا

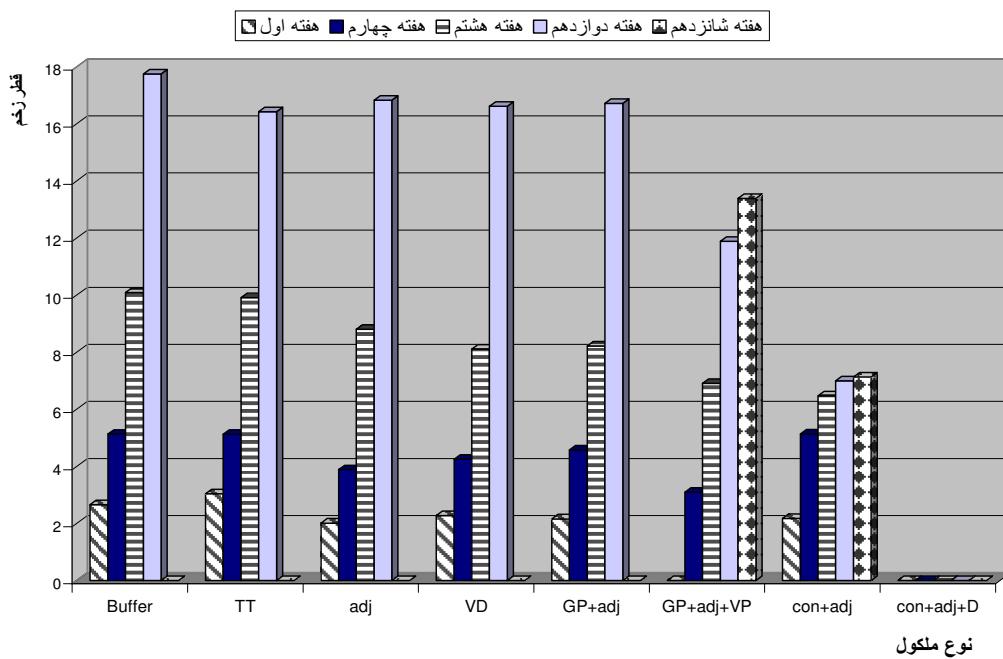
سیر کامل بیماری ادامه یافت. در مقایسه میانگین وزن موشها در طی ۱۶ هفته از شروع زخم گروه ۸ که کنزوگه و ویتامین D3 دریافت کردند با گروه هایی که بافر، TT، ادجوانت، ویتامین D3 و GP63 دریافت داشتند اختلاف معنی دار نشان دادند. (P≤0.05) که در نمودار ۱ نتایج به صورت هر چهار هفته یک بار آمده است.

از زمان شروع ندول و زخم از هفته سوم پس از آلووده سازی موشها قطر زخم موشها با کولیس ورنیه (China) اندازه گیری شد و این کار تا سیر کامل بیماری ادامه یافت. در مقایسه میانگین قطر زخم موشها در ۱۶ هفته از شروع زخم گروهی که کنزوگه و ویتامین D3 دریافت کردند هیچ زخمی ایجاد نکردند و با ۷ گروه دیگر اختلاف معنی دار نشان دادند (P≤0.05). در این ۷ گروه در ۳۵ موش بیماری بصورت سیستمیک در آمد و در هفته بیست و چهارم تمام این موشها مردند. در نمودار ۲ نتایج به صورت هر چهار هفته یک بار آمده است.

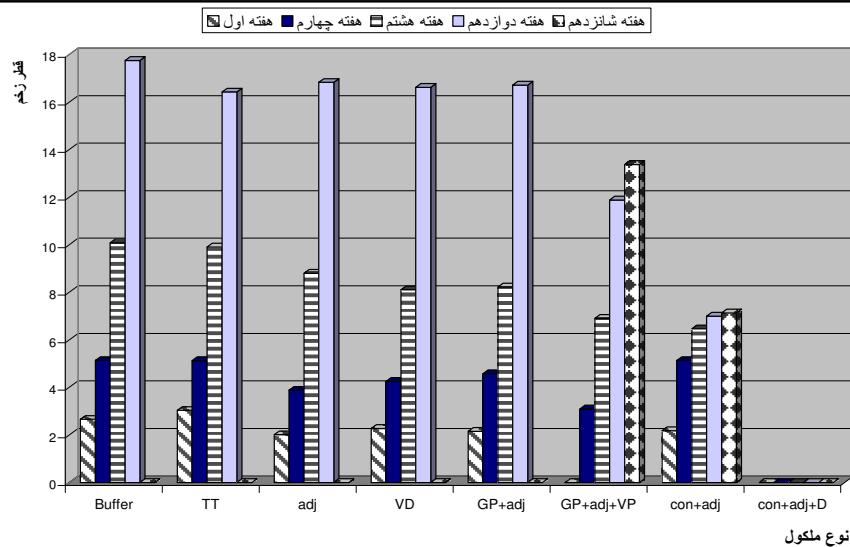


شکل ۳: DOT-ELISA GP63 از راست به چپ با افزایش غلظت GP63 پر رنگ تر می شود.

بعد از به دست آوردن کنزوگه GP63 و توکسوید کزاز ایمن سازی و آلووده کردن موشها انجام شد. از زمان شروع ندول و زخم از هفته سوم پس از آلووده سازی موشها وزن موشها به طور هفتگی با ترازوی (Sartorius) اندازه گیری شد و این کار تا



نمودار ۱: میانگین وزن گروههای مختلف موشها بر حسب گرم در طی ۱۶ هفته پس از شروع زخم



نمودار ۲: میانگین قطر زخم گروههای مختلف موشهای BALB/c بر حسب میلی متر در طی ۱۶ هفته پس از شروع زخم

بحث

می‌شوند استفاده می‌گردد. بنابراین ما در این تحقیق ملکول GP63 را با توکسوید کراز کثروگه کردیم و همراه ویتامین D3 به کار بردیم. زیرا همانطور که تحقیقات نشان داده‌اند ویتامین D3، کشن مایکوباتریوم بویس را توسط افزایش تولید NO می‌افزاید و نیز بیان کردند که افزودن ویتامین D3 به کشت‌های منوسيت / ماکروفاز آلوید به مایکوباتریوم توبرکولوزیس رشد باکتری و درصد سلولهای زنده باکتری را می‌کاهد^(۲۷). همچنین نشان داده شده است که ویتامین D3 در محل التهاب برای محدود کردن فعالیت سلولهای T و برای فعل کردن سلول کشی ماکروفازها عمل می‌کند^(۱۵).

در مطالعه‌ای که توسط آغولی و همکاران در سال ۱۳۷۶ صورت گرفت نشان داده شد که گروهی از موشهای که غلظت $\mu\text{g}/\text{ml}$ ویتامین D3 و لیشمانيای را ۲۴ ساعت قبل از کشت ماکروفازهای صفاقی دریافت کردن اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان دادند^(۲۸). در این تحقیق نیز همین غلظت به صورت *in vivo* براساس وزن موش به طور داخل صفاقی تزریق شد و براساس مقایسات و مطالعات آماری نشان داده شد که گروهی از موشهای کثروگه و ویتامین D3 دریافت کردن اختلاف معنی‌داری از لحاظ اندازه قطر زخم با سایر گروهها داشتند ($P \leq 0.05$) و هیچ زخمی در آنها ایجاد نشد و در بررسی سیستمیک شدن بیماری

از آنجا که آخرین تلاشها جهت تهیه واکسن مؤثر علیه لیشمانيوز به نتیجه مطلوب نرسیده است بنابراین تحقیقات در این زمینه ادامه دارد. از جمله این تحقیقات استفاده از ملکول مؤثر و فرآگیر سطح انگل است که در بیماری زایی نقش مؤثر دارد^(۲۲ و ۲۳). ولی ملکول GP63 خالص به تنها‌یاب قادر به ایجاد پاسخ حفاظتی کامل علیه لیشمانيوز نمی‌باشد^(۲۴).

از طرف دیگر واکنهای کثروگه به خصوص در مورد ملکولهای پلی‌ساکاریدی و گلیکوپروتئینی امروزه مورد توجه محققین قرار گرفته است از جمله این تحقیقات، وسلز و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که اتصال پلی‌ساکاریدهای استرپتوکوک گروه B تایپ V به توکسوید کراز قادر به ایجاد پاسخهای مؤثر و محافظت کننده علیه این میکرووارگانیسم بوده است^(۲۴). دوی و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند اتصال پلی‌ساکاریدهای کرپیتوکوس نئوفرمانس به توکسوید کراز قادر به ایجاد محافظت علیه این میکرووارگانیسم بوده است^(۲۵). کارلسون و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند اتصال پلی‌ساکاریدهای کپسولی استرپتوکوک گروه B تایپ V قادر به ایجاد محافظت علیه این میکرووارگانیسم بوده است^(۲۶).

در ضمن توکسوید کراز یک آنتی‌ژن بی ضرر بوده و به عنوان واکسن علیه کراز در تمام افرادی که بر ضد این بیماری واکسینه

نتیجه‌گیری

متصل کردن ملکول GP63 که به تنها بی‌ قادر به برانگیختن پاسخ حفاظتی کامل علیه لیشمانیا نمی‌باشد به یک ملکول حامل مثل توکسوید کراز که فعال کننده سیستم ایمنی سلولی می‌باشد و به کار بردن آن همراه ویتامین D3 که محرک فعالیت ماکرووفاز است می‌تواند نویدبخش تولید یک فراورده مناسب علیه لیشمانیوز به منظور پیشگیری از ایجاد عفونت باشد.

هم انگلی در محیط کشت دیده نشد اما در گروهی از موشها که GP63 تنها دریافت کردند روند بیماری مثل گروه دریافت کننده بافر بود و در گروههایی که GP63 و ویتامین D3 و کنزوکه بدون ویتامین D3 دریافت داشتند روند گسترش و کاهش وزن هر دو وجود داشت و با اینکه این روند کندر بود و اندازه زخمها از یک حدی بزرگتر نشد ولی بیماری سیستمیک شد و موشها در نهایت تلف شدند.

References

- 1- Versa P.S.T, Brodskyn C.I, Balestieri F, Freitas L, Romas A, Queiroz A. *Adhfr-ts Leishmania Major Knockout Mutant Cross-protects Against Leishmania Amazonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Riode Janeiro 1999; 94(4): 491-496.
- 2- Hepburn N.C. *Cutaneous Leishmaniasis. Clinical Dermatology*. 2000; 25: 363-370.
- 3- Hey A.S, Theander T.G, Hviid L, Hazrati S.M, Kemp M, Kharazm A. *The Major Surface Glycoprotein (GP63) from Leishmania Major and Leishmania Donovani Cleaves CD4 Molecules on Human T cells*. Journal of Immunology. 1994; 152: 4542-4549.
- 4- Tapia E, Perez-Jimenez E, Lopez-Fuertes L, Gonzalo R, Gherardi M.M, Esteban M. *The Combination of DNA Vectors Expressing IL-12 + IL-18 Elicits High Protective Immune Response Against Cutaneous Leishmaniasis after Priming with DNA-P63/LACK and Cytokines, Followed by a Booster with a Vaccinia Virus Recombinant Expressing P63/LACK*. Microbes and Infection. 2002; 5: 73-84.
- 5- Brittingham A, Chen G, McGwrie B.S, Chang K, Mosser DM. *Interaction of Leishmania GP63 with Cellular Receptors for Fibronectin*. Infection and Immunity. 1999; 67(9): 4477-4484.
- 6- Brittingham A, Morrison C.J, McMaster W.R, McGwire B.S, Chang K.P, Mosser DM. *Role of the Leishmania Surface Protease GP63 in Complement Fixation, Cell Adhesion and Resistance to Complement-Mediated Lysis*. Journal of Immunology. 1995; 155(6): 3102-3111.
- 7- Russell D.G, William H. *The Involvement of the Major Surface Glycoprotein (GP63) of Leishmania Promastigotes in Attachment to Macrophages*. Journal of Immunology. 1986; 136(7): 2613-2620.
- 8- Bogdan C, Rollinghoff M. *The Immune response to Leishmania : Mechanisms of Parasite Control and Evasion*. International Journal for Parasitology. 1998; 28: 121-134.
- 9- Walker P.S, Scharton-Kersten T, Rowton ED,

- Hengge U, Bouloc A, Udey M.C, Vogel J.C. *Genetic Immunization with Glycoprotein 63 cDNA Results in a Helper T cell Type I Immune Response and Protection in a Murine Model of Leishmaniasis.* Human Gene Therapy. 1998; 9(13): 1899-1908.
- 10- Paraguai de Souza E, Bernardo R.R, Palatnik M, *Palatnik de Sousa C.B. Vaccination of Balb/c Mice Against Experimental Visceral Leishmaniasis with the GP63 Glycoprotein Antigen of Leishmania Donovanii.* Vaccine. 2001; 19: 3104-3115.
- 11- River D, Bovay P, Shah R, Didisheim S, Mauel J. *Vaccination Against Leishmania Major in a CBA Mouse Model of Infection: Role of Adjuvants and Mechanism of Protection.* Parasite Immunology. 1999; 21: 461-473.
- ۱۲- فتاحی بافقی علی. ارزیابی پاسخهای ایمنی سلولی بر ضد موکولهای Leishmania (L.) major : GP63 و LPG تخلیص شده از BALB/c و بیماران انسانی بهبود یافته و بهبود نایابند، پایان نامه دکتری رشته انگل شناسی، ۱۳۸۲: ۷۶-۸۶.
- 13- Janeway C.A, Travers P, Walport M, Shlomchik M. J. *Immunobiology the immune system in health and disease.* USA. Garland Publishing. 2001; 5th edition: 581.
- 14- Clavreul A., D'hellencourt C.L, Montero-menei C, Potron G, Couse D. *Vitamin D Differentially Regulates B7.1 and B7.2 Expression on Human Peripheral Blood Monocytes.* Immunology. 1998; 95: 272-277.
- 15- Rigby W.F.C. *The Immunobiology of Vitamin D.* Immunology Today. 1988; 57: 159-163.
- 16- Kharazi S., Zavarzan H.A., Tiraihi T. *The Role of Over Production of Nitric Oxide in Apoptosis of BALB/c Mice Macrophages Infected with Leishmania Major in Vitro.* Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology. 2003; 2(4): 209-214.
- 17- James D, Bangs D. A, Ranson M. N, Gary C, Hooper N.M. *In Vitro Cytocidal Effects on Trypanosoma Brucei and Inhibition of Leishmania Major GP63 by Peptidomimetic Metaloproteas Inhibitors.* Molecular and Biochemical Parasitology. 2001; 57: 159-163.
- 18- Bradford M.M, Thrope R. *Immunochemistry in Practice.* Britain, Cambridge University Press. 1990, 2nd edition: 252-266.
- ۱۹- مصطفایی علی. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ذزل. تهران، انتشارات ترکیه، ۱۳۷۸: ۴۰-۹۳.
- 20- Gores J. *Immunochemical Techniques Laboratory.* 1993, Manul Ed. Academic.
- 21- Aslem M, Alastair D. *Bioconjugation protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences.* USA, Mc millian Reference Ltd: 41-43.
- 22- Joshi P.B, Kelly B.I, Kamhawi S, Sacks L, McMaster W.R. *Targeted Gene Deletion in Leishmania Major Identifies Leishmanolysin (GP63) as a Virulence Factor.* Molecular and Biochemical Parasitology. 2002; 120: 33-40.
- 23- River D, Shah R, Bovey P. *Vaccine Development Against Cutaneous Leishmaniasis Subcutaneous Administration of Radioattenuated parasite Protects CBA Mice Against Virulent Leishmania Major Challenge.* Parasite Immunology. 1993; 15: 75.
- 24- Wessels M.R, Paoletti L.C, Pinel J, Kasper D.L. *Immunogenicity and protective Activity in Animals of Type V Group B Streptococcal Activity in Animals of Type V Group B Streptococcal polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine.* Journal of Infective disease. 1995; 4: 879-884.
- 25- Devi S. J. *Preclinical Efficacy of a*

- Glucuronoxylomannan-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine of Cryptococcus Neoformans in Murine Model.* Vaccine. 1996; 14(13): 1298.
- 26- Carlsson R, Claesson B.A, Käyhty H. *Studies on a Hib-tetanus Toxoid Conjugate Vaccine, of Administration Route and of Combined Administration with an Inactivated Polio Vaccine.* Vaccine 2000; 18: 468-478.
- 27- Waters W.R, Nonnecke B.J, Rahner T.E. *Modulation of Mycobacterium Bovis-Specific Responses of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells by 1,25-Dihydroxy Vitamin D3.* Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2001; 8(6): 1204-1212.
- آغولی محمود. بررسی اثر ویتامین D3 و ایترافون گاما، بر تکثیر لیشمانیا ماذور و تولید نیتریک اکساید (NO) در مکروفازهای صناقی موش BALB/c به روشن. *In vitro*. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی، ۱۳۷۶: ۱۰۶-۱۰۷.