

## اثر حفاظتی ویتامین D3 و کنژوگه GP63 و توکسوید کزاز بر ایجاد زخمهای جلدی لیشمانیایی در موش BALB/c

آرزو کرمانی جلیبوند<sup>۱</sup>، دکتر احمد زواران حسینی<sup>۲\*</sup>، دکتر علی فتاحی بافتی<sup>۳</sup>، سارا صعودی<sup>۴</sup>

### چکیده

**مقدمه:** GP63 پروتئاز اصلی سطح پروماستیگوتهای لیشمانیا است که در بیماریزایی آن نقش مهمی دارد. از آنجا که به تنهایی قادر به ایجاد محافظت مؤثر علیه لیشمانیوز نمی باشد، هدف این تحقیق بررسی اثر حفاظتی کنژوگه GP63 و توکسوید کزاز به همراه ویتامین D3 در موشهای حساس BALB/c در مقابل لیشمانیوز پوستی می باشد.

**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  $10^9 \times 5$  لیتوموناد *Leishmania (L.) Major* سویه [MRHO/IR/75/ER] را کشت دادیم. ملکول GP63 با روش افینیتی کروماتوگرافی تخلیص گردید و با توکسوید کزاز کنژوگه شد و برای ایمن سازی در ۸ گروه از موشهای ماده BALB/c استفاده شد.

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

**نتیجه گیری:** بنابراین کنژوگاسیون GP63 با توکسوید کزاز که باعث تقویت ایمنی سلولی است و به کار بردن آن همراه با ویتامین D3 که محرک فعالیت ماکروفاژهاست می تواند نوید بخش تولید یک فراورده مناسب علیه لیشمانیوز باشد.

**واژه‌های کلیدی:** لیشمانیا ال. ماژور، GP63، ویتامین D3، توکسوید کزاز، اثر حفاظتی، موش BALB/c

### مقدمه

تک یاخته‌ای از گروه تاژکداران ایجاد می گردد و با گزش پشه خاکی آلوده منتقل می گردد. 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 لیشمانیوز پوستی خود بهبود یابنده تا لیشمانیوز احشایی کشنده دارد. لیشمانیوز پوستی یا سالک به صورتی که در دنیای قدیم مشاهده می شود توسط لیشمانیاهای متعلق به کمپلکس تروپیکا ایجاد می شود. عامل لیشمانیوز جلدی در دنیای جدید گونه‌هایی از لیشمانیا مکزیکانا هستند. هر سال

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

\*۲- نویسنده مسئول: - استاد گروه ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی، ص پ ۱۴۱۱۵-۳۳۱  
تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۱۱۰۰۱ داخلی ۳۰۹۰، نمابر: ۰۲۱-۸۸۰۰۷۸۳۰

E-mail: zavarana@modares.ac.ir

۱- کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

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 پذیرش: ۸۴/۹/۳

تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۲۰

D3) تمایز منوسیت ها به ماکروفاژ را القا می کند و فعالیت فاگوسیتوز آنها را افزایش می دهد<sup>(۱۴)</sup> و فعالیت سایتوتوکسی سیتی ماکروفاژها را می افزاید<sup>(۱۵)</sup>. از آنجا که ماکروفاژها هنگامیکه توسط سایتوکاینها فعال می شوند، NO تولید می کنند، در کنترل عفونت نقش دارند<sup>(۱۶)</sup>.

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

### روش بررسی

این پژوهش مطالعه ای 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 RPMI-1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FCS (Sigma) به میزان انبوه کشت داده شد. پروماستیگوتهای جمع آوری شده بعد از سه بار شستشو با PBS ۰/۱۵ مولار (pH=۷/۲) در ۲۰۰۰ × g به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد و به انگلهای 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 لپتوموناد 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 PBS ۰/۱۵ مولار (pH=۷/۲) در ۲۰۰۰ × g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در بافر Tris-HCl (Sigma) یک میلی مولار (pH=۷/۲) حاوی مهارکننده پروتئاز PMSF (Sigma) ۹ مرتبه منجمد و ذوب شد

حدود ۱/۵ میلیون مورد لیشمانیوز جلدی ایجاد می شود که بیش از ۹۰ درصد آن در افغانستان، ایران، عراق، عربستان سعودی و سوریه در دنیای قدیم و پرو در دنیای جدید است<sup>(۱،۲،۳)</sup>.

درمان دارویی، حشره کش و واکسن مناسبی علیه این بیماری وجود ندارد. با وجود این افرادی که از لیشمانیوز بالینی بهبود می یابند مصنوعیت مؤثری علیه عفونت مجدد در آنها ایجاد می شود و این موضوع نشان می دهد که تهیه واکسن امکان پذیر است<sup>(۴)</sup>.

گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی (GP63)، پروتئین اصلی سطحی پروماستیگوتهای لیشمانیا است و به علت فراوانی آن و خصوصیت متالوپروتئینازی آن نشان داده شده که در بیماریزایی لیشمانیا نقش دارد. GP63 در تمام گونه های لیشمانیا بسیار محافظت شده است<sup>(۵)</sup>. ملکول GP63 نقش مهمی در چسبیدن پروماستیگوتها به ماکروفاژ ایفا می کند و چسبیدن از طریق این لیگاند باعث بیگانه خواری و ورود انگل به ماکروفاژ می شود. GP63 باعث تسریع تبدیل C3b به iC3b در سطح انگل می شود که به عنوان اپسونین برای لیشمانیا عمل می کند و اتصال آن را به رسپتور نوع ۳ کمپلمان (CR3) که رسپتور غالب برای بلعیدن متاسایکلیک ها است تسهیل می کند<sup>(۶،۷،۸)</sup>.

اثر حفاظتی این ملکول در چندین آزمایش با استفاده از سویه های مختلف موش آزمایش شده و در بین واکسنهای زیر واحد آنتی ژن بیشتر از همه مورد آزمایش قرار گرفته است<sup>(۹،۱۰)</sup>. اما GP63 به تنهایی قادر به ایجاد محافظت کامل علیه لیشمانیوز نمی باشد<sup>(۱۱،۱۲)</sup>. از طرف دیگر واکسنهای کنژوگه 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 ساکاریدهای کپسولی بسیاری از باکتریها اگر به یک پروتئین حامل مثل توکسویید کزاز (TT) کنژوگه شوند. پپتیدهای لازم برای شناسایی توسط سلولهای T مختص آنتی ژن فراهم می شود و پاسخ غیروابسته به سلول T به یک پاسخ وابسته سلول T تبدیل می شود<sup>(۱۳)</sup>.

از طرف دیگر ویتامین D3 (۱ و ۲۵ - دی هیدروکسی ویتامین

رازی) و GP63 در برابر تریس ۰/۱ M دیالیز شدند. با روش گلو تار آلدیید با کمی تغییرات به صورت زیر کنژوگاسیون صورت گرفت:

ابتدا ۲ ml GP63 (۳۰ µg/ml) و ۱ ml توکسویید کزاز (۱ µg/ml) (۱۲۰) به علاوه ۲۵ µl گلو تار آلدیید ۲۵٪ (Sigma) در بشر ریخته شد و روی همزن مغناطیسی (Pars Azma Co) به مدت ۲ ساعت در ۴°C در تاریکی قرار داده شد سپس ۱۰۰ µl گلاسیسین (MERCK) ۵ mg/ml به آن افزوده شد و ۲۰ دقیقه دیگر روی همزن مغناطیسی داخل یخچال گذاشته شد<sup>(۲۱)</sup>. برای جداسازی کنژوکه از سایر ترکیبات از روش ژل فیلتراسیون با استفاده از ژل سفاکریل (Pharmacia) S-300 و بافر تریس ۰/۱ mM با جریان عبوری ۴ ml/h استفاده گردید و با دستگاه جمع آوری نمونه (Pharmacia) فراکشن ها جمع آوری گردید.

#### ۴- ایمن سازی موشها

موشهای ماده BALB/c ۶ تا ۸ هفته ای به وزن ۲۵-۳۰ گرم (تهیه شده از موسسه واکسن و سرم سازی 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: بافر ۰/۱ M Tris - HCl ، گروه ۲: TT ، گروه ۳: ادجوانت کامل فروند (CFA) (Sunteb Co) ، گروه ۴: ویتامین D3 (داروپخش) (۸۰۰ µg) داخل صفاقی، گروه ۵: GP63 (۵ µg) در ۵۰ µl بافر تریس ۰/۱ M + ۵۰۰ µl CFA ، گروه ۶: GP63 (۵ µg) در ۵۰ µl بافر تریس ۰/۱ M + ۵۰۰ µl CFA + ویتامین D3 ، گروه ۷: کنژوکه (۵ µg) در ۵۰۰ µl بافر تریس ۰/۱ M + ۵۰۰ µl CFA ، گروه ۸: کنژوکه (۵ µg) در ۵۰۰ µl بافر تریس ۰/۱ M و ویتامین D3 (۸۰۰ µg داخل صفاقی) + ۵۰۰ µl CFA<sup>(۲۲)</sup>.

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

#### ۵- آلوده کردن موشها

۴ هفته بعد از تزریق دوم، تعداد ۱۰<sup>۶</sup> پروماستیگوت فرم Stationary در قاعده دم موشها تزریق شد و از زمان ظهور ندول

سپس پروماستیگوتهای لیز شده ۳۰ دقیقه در دور ۴۵۰۰۰ × g در ۴°C دمای با اولتراسانتریفوژ (Sorval combi plus) سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و به رسوب حاصل بافر تریس ۱ mM (pH=۷/۲) حاوی سدیم آزاید (MERCK) ۰/۰۲ درصد و فسفولیپاز C (Sigma) افزوده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷°C داخل انکوباتور (GALLENKAMP) قرار داده شد. سپس این محصول با دور ۴۵۰۰۰ × g به مدت ۹۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب آن جدا و مایع رویی برای کروماتوگرافی افینیتی نگهداری شد.

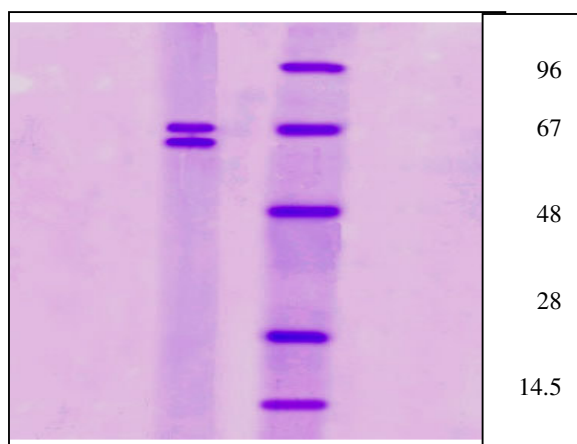
ستونی (Pharmacia) به ابعاد (۱۰ × ۱/۴ cm)، ژل Con-A Sepharose (Sigma) در آن ریخته شد و با mM Tris - HCl (pH=۷/۲) شستشو یافت سپس با ریختن آهسته و تدریجی مایع رویی حاصل از تغلیظ و آزادسازی پروتئین های انگل بر روی ستون کار تخلیص ملکول GP63 در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول بافر Washing (تریس) mM (Sigma) ۲۰ pH=۷/۲ ، کلرید کلسیم (MERCK) و کلرید منیزیم (MERCK) ۱ mM (۰/۱ درصد) به عنوان ۲ برابر حجم ستون با جریان عبوری ۴ ml/h از ستون عبور داده شد و در مرحله بعد بافر Eluting (تریس) ۰/۰۵ M با pH=۷/۲ ، کلرید کلسیم و کلرید منگنز (MERCK) ۰/۱ M مولار و کلرید سدیم (MERCK) ۰/۱ M به میزان ۳ برابر حجم ستون با جریان عبوری ۴ ml/h از ستون عبور داده شد<sup>(۵۱،۵۱۷)</sup>.

با روش برادفورد غلظت پروتئین تعیین شد<sup>(۱۸)</sup>. مشخص گردید ۱۰۰ µg GP63 تخلیص گردید. برای اثبات خلوص GP63 از روش PAGE برای مشخص کردن تعداد اجزای پروتئینی، SDS-PAGE برای تعیین وزن ملکولی پروتئین و رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (MERCK)<sup>(۱۹)</sup> و DOT-ELISA برای نشان دادن GP63 خالص با آنتی بادی منوکلونال ضد GP63 (تهیه شده از انستیتو پاستور) و anti-mouse IgG کنژوکه با HRP (SUNTEB Co. AP7170) و سوبسترای دی آمینو بنزیدین (Biogen) استفاده گردید<sup>(۲۰)</sup>.

#### ۳- کنژوگاسیون GP63 و توکسویید کزاز

ابتدا توکسویید کزاز (تهیه شده از موسسه واکسن و سرم سازی

شکل ۱: CBBR-250 Stained PAGE 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 برآورد وزن ملکولی دو ایزو فرم ۶۳ و ۶۷ 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 نیتروسولونز است. در این روش برای نشان دادن GP63 خالص از آنتی بادی مونوکلونال ضد GP63 و anti-mouse IgG کنتزوگه با HRP و سوبسترای 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 کنتزوگه شد و کنتزوگه با روش ژل فیلتراسیون در ستون حاوی سفاکریل S-300 از سایر مواد جدا گردید که میزان جذب فراکشنهای جمع آوری شده توسط دستگاه جمع آوری فراکشن از ستون سفاکریل S-300، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید.

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

#### ۶- بررسی سیستمیک شدن بیماری

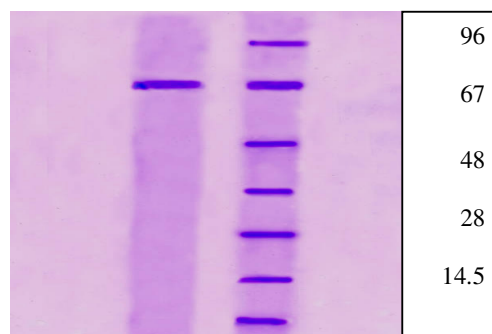
برای این منظور در هفته ۱۴ و ۱۵ از شروع زخم موشهایی به طور تصادفی از همه گروهها انتخاب شدند و طحال آنها داخل محیط NNN در شرایط استریل انداخته شد و در انکوباتور ۲۵°C نگهداری گردید و بعد از ۷۲ ساعت از نظر حضور انگل مورد بررسی قرار گرفت.

#### آنالیز آماری

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

#### نتایج

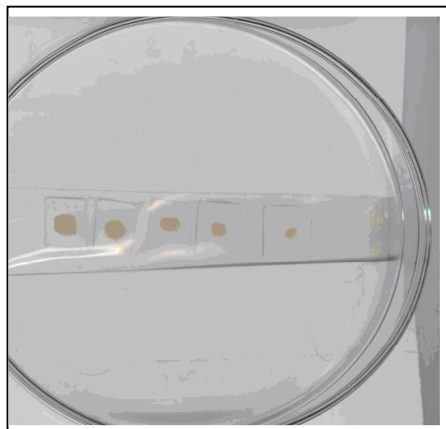
در این مطالعه  $10^9 \times 5$  انگل فرم لگاریتمی جمع آوری گردید و از این تعداد انگل، میزان ۱۰۰ µg GP63 تخلیص گردید. پس از تخلیص و تغلیظ GP63 ابتدا برای مشخص نمودن تعداد اجزای پروتئینی در شرایط طبیعی (بدون احیای نمونه) از روش PAGE با رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل و ظهور 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 PAGE gel. سمت راست نمونه استاندارد، سمت چپ GP63 قبل از احیا

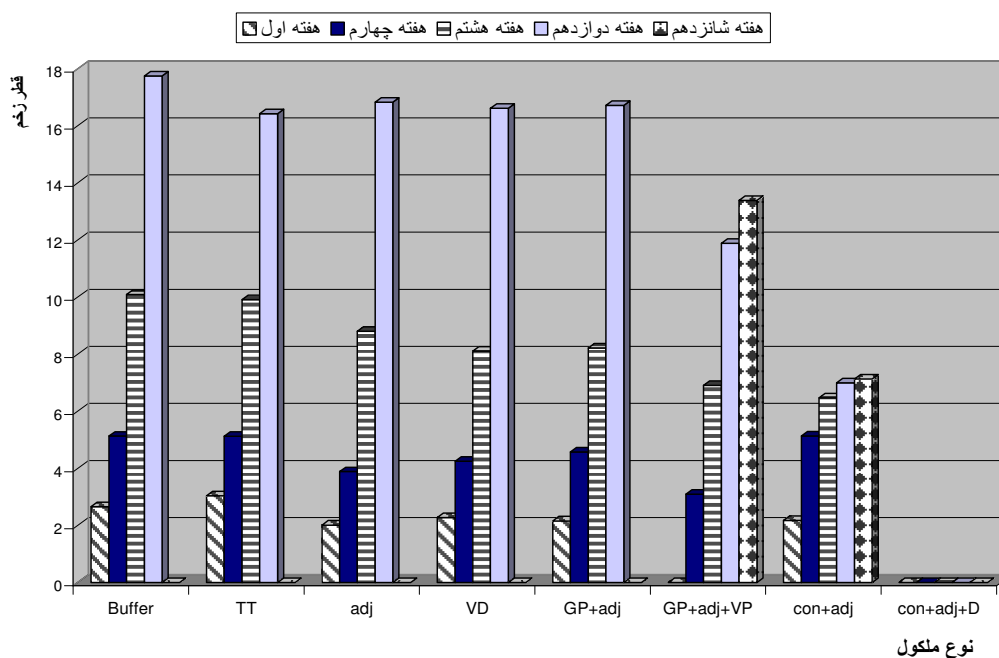
سیر کامل بیماری ادامه یافت. در مقایسه میانگین وزن موشها در طی ۱۶ هفته از شروع زخم گروه ۸ که کنژوگه و ویتامین D3 دریافت کردند با گروه هایی که بافر، TT، ادجوانت، ویتامین D3 و GP63 دریافت داشتند اختلاف معنی دار نشان دادند. ( $P \leq 0.05$ ) که در نمودار ۱ نتایج به صورت هر چهار هفته یک بار آمده است.

از زمان شروع ندول و زخم از هفته سوم پس از آلوده 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 کنژوگه و ویتامین D3 دریافت کردند هیچ زخمی ایجاد نکردند و با ۷ گروه دیگر اختلاف معنی دار نشان دادند ( $P \leq 0.05$ ). 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.

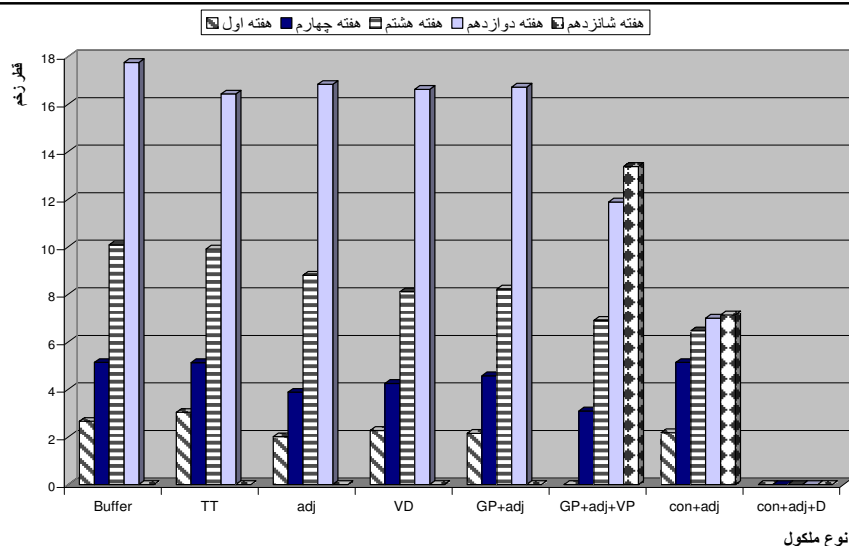


شکل ۳: DOT-ELISA GP63 از راست به چپ با افزایش غلظت GP63 پررنگ تر می شود.

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



نمودار ۱: میانگین وزن گروههای مختلف موشهای BALB/c 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 توکسین کزاز کتزوگه کردیم و همراه ویتامین D3 به کار بردیم. زیرا همانطور که تحقیقات نشان داده‌اند ویتامین D3، کشتن مایکوباکتریوم بویس را توسط افزایش تولید NO می‌افزاید و نیز بیان کردند که افزودن ویتامین D3 به کشت‌های منوسیت / ماکروفاژ آلوده به مایکوباکتریوم تویر کولوزیس رشد باکتری و درصد سلولهای زنده باکتری را می‌کاهد<sup>(۲۷)</sup>. همچنین نشان داده شده است که ویتامین D3 در محل التهاب برای محدود کردن فعالیت سلولهای T و برای فعال کردن سلول کشی ماکروفاژها عمل می‌کند<sup>(۱۵)</sup>.

در مطالعه‌ای که توسط آغولی و همکاران در سال ۱۳۷۶ صورت گرفت نشان داده شد که گروهی از موشها که غلظت ۸۰۰ µg ویتامین D3 و لیشمانیا را ۲۴ ساعت قبل از کشت ماکروفاژهای صفاقی دریافت کردند اختلاف معنی داری با گروه کنترل نشان دادند<sup>(۲۸)</sup>. در این تحقیق نیز همین غلظت به صورت *in vivo* براساس وزن موش به‌طور داخل صفاقی تزریق شد و براساس مقایسات و مطالعات آماری نشان داده شد که گروهی از موشها که کتزوگه و ویتامین D3 دریافت کردند اختلاف معنی داری 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 لیشمانیوز به نتیجه مطلوب نرسیده است بنابراین تحقیقات در این زمینه ادامه دارد. از جمله این تحقیقات استفاده از ملکول مؤثر و فراگیر سطح انگل است که در بیماری زایی نقش مؤثر دارد<sup>(۲۳ و ۲۲)</sup>. ولی ملکول GP63 خالص به تنهایی قادر به ایجاد پاسخ حفاظتی کامل علیه لیشمانیوز نمی‌باشد<sup>(۱۲، ۱۳، ۲۴)</sup>.

از طرف دیگر واکسنهای کتزوگه به خصوص در مورد ملکولهای پلی ساکاریدی و گلیکوپروتئینی امروزه مورد توجه محققین قرار گرفته است از جمله این تحقیقات، وسلز و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که اتصال پلی ساکاریدهای استرپتوکوک گروه B تایپ V به توکسین کزاز قادر به ایجاد پاسخهای مؤثر و محافظت کننده علیه این میکروارگانسیم بوده است<sup>(۲۴)</sup>. دوی و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند اتصال پلی ساکاریدهای کریپتوکوکوس نئوفرمانس به توکسین کزاز قادر به ایجاد محافظت علیه این میکروارگانسیم بوده است<sup>(۲۵)</sup>. کارلسون و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند اتصال پلی ساکاریدهای کپسولی استرپتوکوک گروه B تایپ V قادر به ایجاد محافظت علیه این میکروارگانسیم بوده است<sup>(۲۶)</sup>.

در ضمن توکسین کزاز یک آنتی ژن بی ضرر بوده و به‌عنوان واکسن علیه کزاز در تمام افرادی که بر ضد این بیماری واکسینه

### نتیجه گیری

متصل کردن ملکول GP63 که به تنهایی قادر به برانگیختن پاسخ حفاظتی کامل علیه لیشمانیا نمی باشد به یک ملکول حامل مثل توکسوئید کزاز که فعال کننده سیستم ایمنی سلولی می باشد و به کار بردن آن همراه ویتامین D3 که محرک فعالیت ماکروفاژ است می تواند 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 کنژوگه بدون ویتامین D3 دریافت داشتند روند گسترش و کاهش وزن هر دو وجود داشت و با اینکه این روند کندتر 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. ClinicalDermatology*. 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 Donovanii 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 Elicites High Protective Immune Response Against Cutaneous Leishmaniasis after Priming with DNA-P63/LACK and Cytokines, Followed by a Booster with a Vaccina 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 1 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 مولکولهای LPG و GP63 تخلیص شده از: Leishmania (L.) major در موش BALB/c و بیماران انسانی بهبود یافته و بهبود ناپابنده*. پایان نامه دکتری رشته انگل شناسی، ۱۳۸۲: ۷۶-۸۶.
- 13- Janeway C.A, Travers P, Wal ort M, Shlomchik M. J. *Immunobiology the immune system in health and disease*. USA. Garland Publishing. 2001; 5<sup>th</sup> edition: 581.
- 14- Clavreul A., D'hellencourt C.L, Monteromenei 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., Zavarani 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 Metaloprotease Inhibitors*. Molecular and Biochemical Parasitology. 2001; 57: 159-163.
- 18- Bradford M.M, Thrope R. *Immunochemistry in Practice*. Britain, Cambridge University Press. 1990, 2<sup>nd</sup> edition: 252-266.
- ۱۹- مصطفایی علی. *راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل*. تهران، انتشارات تزکیه، ۱۳۷۸، ۴۰۴-۹۳.
- 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 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.
- ۲۸- آغولی محمود. بررسی اثر ویتامین D3 و اینترفرون گاما، بر تکثیر لیشمانیا ماژور و تولید نیتریک اکساید (NO) در ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c به روش *In vitro*. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی، ۱۳۷۶: ۱۰۶-۱۰۷.