

اثر آلزینات *Pseudomonas aeruginosa* و پروتئین ایمونومدولاتور سیر بر اپسونوفاگوسیتوز در مدل موشی

دکتر طوبی غضنفری^۱، شاد آفرین هنرمندیان^۲، دکتر احیا عبدی عالی^۳، مروارید شفیعی^۴، دکتر خسرو خواجه^۴

خلاصه

مقدمه: ترکیب غیر طبیعی ترشحات راه‌های هوایی در بیماران فیروز سیستمیک (CF)، به کلونیزاسیون مزمن پاتوژن‌ها از جمله *Pseudomonas aeruginosa* در این مکان، کمک مؤثری می‌کند. مورفوتایپ موکوئیدی *P.aeruginosa* از تولید مقدار زیادی آگزوپلی ساکارید که اطراف سلول را در بر می‌گیرد، ناشی می‌شود که غالباً از آن به عنوان آلزینات یاد می‌شود. این ساختار علاوه بر اختلال در پاکسازی ارگانسیم از ریه بیماران، باعث مخفی ماندن باکتری از فرایند فاگوسیتوز نیز می‌شود. آلزینات ضد فاگوسیتوز است و کشندگی اپتیمال این باکتری بواسطه فاگوسیتوز، به آنتی‌بادی‌های اپسونیک نیاز دارد. از طرفی اثرات ایمونومدولاتوری سیر طی مطالعات مختلفی از جمله اثر سیر بر تقویت فعالیت فاگوسیتوز به اثبات رسیده است. لذا در این مطالعه، تأثیر آلزینات و پروتئین ایمونومدولاتور سیر بر تولید آنتی‌بادی‌های اپسونیک ضد آگزوپلی- ساکارید *P.aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت.

روش: برای استخراج آلزینات، از کشت ۷۲ ساعته سویه موکوئیدی *P.aeruginosa* 8821M استفاده شد. سپس آلزینات تحت تأثیر آنزیم‌های ۱ RNase A, DNase و Proteinase K قرار گرفت و در نهایت توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفاکریل S₄₀₀ تخلیص گردید. موش‌های ماده BALB/c حدود ۶ تا ۸ هفته در گروه‌های ۵ تایی، طی روزهای ۰، ۷ و ۱۴ تحت تزریق مقدار مشخصی سیر، آلزینات و ترکیب توأم سیر - آلزینات و در عین حال، فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) و ترکیب آلزینات-R10 قرار گرفتند. سپس سرم آنها برای سنجش فعالیت کشندگی اپسونوفاگوسیتیک جدا شد.

یافته‌ها: آلزینات تخلیص شده از *P.aeruginosa* حاوی ۳۴/۶ µg/ml یورونیک اسید و ۱/۴۵ µg/ml پروتئین، ۰/۵ µg/ml DNA و ۰/۰۸ µg/ml LPS بود. نتایج حاصل نشان‌دهنده فعالیت کشندگی اپسونوفاگوسیتیک سرم بعد از ایمن‌سازی موش با فراکشن ایمونومدولاتوری سیر به میزان ۶۹٪ و آلزینات به میزان ۶۷٪ و نیز مخلوط این دو به میزان ۸۲٪ بود که افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل حاکی از آن است که فراکشن ایمونومدولاتوری سیر نسبت به عصاره سیر که مخلوطی از ترکیبات و فراکشن‌های متفاوت می‌باشد، قادر خواهد بود در همراهی با آلزینات خالص شده از سویه موکوئیدی *P.aeruginosa*، ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی (موش BALB/c)، با القای آنتی‌بادی‌های کشنده اپسونیک افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: *P.aeruginosa*، آلزینات، فاگوسیتوز

۱- دانشیار ایمونولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد ۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی ۳- استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س) ۴- استادیار بیوشیمی،

دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

* نویسنده مسؤول، آدرس: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران • آدرس پست الکترونیک: abdialya@alzahra.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۷/۱۶ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۱۱/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۱/۲۲

مقدمه

مهم ترین مشکل بالینی بیماران مبتلا به فیروز سیستمیک (CF)، عفونت مزمن ناشی از *P.aeruginosa* در راه هوایی و پاسخ التهابی همراه آن است. التهاب حاصل از این عفونت باعث تخریب و از بین رفتن فعالیت بافتی می شود. سویه هایی از *P.aeruginosa* که از افراد مبتلا به CF جدا شده اند، اغلب دارای یک فنوتیپ موکوئیدی اند که ناشی از تولید مقدار زیادی اگزوپلی ساکارید است. اگزوپلی ساکارید *P.aeruginosa* که غالباً از آن به عنوان آلزینات یاد می شود و اگزوپلی ساکارید موکوئیدی (Mucoic Exopolysaccharide: MEP) نیز نامیده شده است، پلیمری استیل متشکل از واحدهای تکراری و تصادفی D-مانورونیک اسید و L-گلورونیک اسید می باشد (۱-۳).

اعتقاد بر این است که آلزینات فاکتور کلیدی بیماری زایی در عفونت های مزمن ریوی بیماران مبتلا به CF است چرا که به دلیل خواص آنتی فاگوسیتیک از جمله تداخل در مکانیسم های اپسونیزاسیون سلول های فاگوسیت سیستم ایمنی بدن میزبان و نیز به دلیل ماهیت پلی ساکاریدی اش در انسان که ایمونوزن ضعیفی است، از پاکسازی ریه جلوگیری می کند. علاوه بر محدودیت پاکسازی ریوی *P.aeruginosa* در بیماران CF، این ارگانیزم می تواند خود را از فاگوسیتوز نیز مخفی نگه دارد. مطالعات نشان می دهد که MEP، ضد فاگوسیتوز است و کشندگی اپتیمال این باکتری به واسطه فاگوسیتوز، به آنتی بادی های اپسونیک نیاز دارد. از طرفی تشکیل انواع میکروکلنی های مقاوم و بیوفیلیم در راستای شرایط ویژه موجود در ریه بیماران CF، با بلوکه کردن راه هوایی در طول بیماری، مانع عملکرد طبیعی ریه می شود (۳-۵).

در سال های اخیر تحقیقات فراوانی در مورد آثار مختلف ترکیبات سیر در درمان انواع بیماری ها به عمل آمده است و از جمله خواص شناخته شده آن، خواص ضد باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی و اثر آن در

کاهش چربی خون، مهار تجمع پلاکت ها، خاصیت آنتی اکسیدان و غیره می باشد. تأثیر سیر بر پاسخ های مختلف سیستم ایمنی، تنها در چند سال اخیر مطرح شده و تحقیقاتی در این باره آغاز گردیده است. نتایج این مطالعات نشان می دهد که سیر حاوی ترکیبات ایمونومدولاتوری است که به صورت وابسته به دوز قادرند بر این پاسخ ها تأثیر بگذارند (۶-۸).

همان طور که گفته شد، آلزینات در انسان ایمونوزن ضعیفی است. بنابر این به تنهایی نمی تواند برای ایمن سازی مبتلایان به عفونت های مزمن بکار رود. مطالعات مختلف نشان داده است که برای افزایش ایمنی زایی می توان از ترکیبات پروتئینی هم زمان با آلزینات استفاده کرد (۹،۱۰).

Pier و همکاران (۲۰۰۳) اثبات کردند که کونژوگاسیون آلزینات به KLH قادر به القای میزان بیشتری تیتراژ IgG بوده که چنین آنتی بادی هایی اپسونیزان می باشند. البته همان طوری که اشاره شد نحوه تخلیص و به کارگیری آلزینات در ایمنی زایی آن تأثیر به سزایی دارد (۱۰).

در سال ۲۰۰۶ کاشف و همکاران واکسن کونژوگه ای بر اساس آلزینات با وزن ملکولی بالا و توکسوئید کزاز تولید کردند (۹) البته با این که توکسوئید تتانوس در تهیه واکسن های انسانی کاربرد دارد، اما به دلیل مصرف مکرر در واکسن های دیگر، ممکن است باعث تحریک بیش از حد سیستم ایمنی افراد شده و در نتیجه واکنش های جانبی و ناسازگاری را در جمعیت هدف ایجاد کند (۹).

شایان ذکر است که واکسن های نو ترکیب بسیاری نیز علیه *P.aeruginosa* تولید شده اند اما این چنین واکسن هایی به دلیل تفاوت اسیلایون و گلیکوزیلایون بین باکتری، *E.coli* و *P.aeruginosa*، ایمنی زایی خوبی در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد نمی کردند (۱۱).

با توجه به ویژگی های عصاره سیر و فراکشن ایمونومدولاتور سیر در مطالعه حاضر ایمنی زایی آلزینات-عصاره سیر و نیز ایمنی زایی آلزینات-R10 با

اندازه‌گیری درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتوز آنتی‌بادی‌های اپسونین القاء شده در سرم موش‌های مورد آزمایش، بررسی شد.

روش بررسی

الف) جداسازی و تخلیص آلژینات

در این تحقیق آلژینات از سویه موکوئیدی *Pseudomonas aeruginosa* 8821M تخلیص شد. پس از کشت سویه موکوئیدی در محیط تغییر یافته Mian's، باکتری‌ها توسط سانتریفوژ با دور بالا (17000g)، به مدت 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 حل شد و به آن آنزیم‌های RNase A و DNase I اضافه شد (100µg/ml). پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، آنزیم Proteinase K (100µg/ml) به آن اضافه و در دمای ۵۶°C به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس با فنل ۹۶° به نسبت ۱:۱ تیمار گردید و مجدداً با آب دیونیزه دیالیز و سپس لایوفیلیزه گردید. در نهایت بعد از حل کردن در کلروآمونیم (۰/۰۳gr/ml) بر روی ستون کروماتوگرافی با ژل سفاکریل S₄₀₀ (1cm- 70 cm) قرار داده شد.

فراکشن‌های به دست آمده برای بررسی میزان یورونیک اسید سنجش شدند و فراکشن‌های مثبت که زودتر از ستون خارج شده بودند جمع‌آوری و یکی شدند (۱۰). برای سنجش میزان یورونیک اسید از روش پلیت میکروتیتراستفاده شد. به این ترتیب که ۸ رقت از اسید آلژینیک جدا شده از جلبک *Laminaria hyperborean* به عنوان استاندارد در PBS تهیه شد. برای تهیه محلول A ۹/۵۶gr/l و محلول B ۰/۴۸ gr/l، کاربازول در ۹۶٪ سدیم‌بورات دکاهیدرات در اسید سولفوریک ۰/۴۸ gr/l، محلول A حل گردید. سپس ۱۵۰µl از محلول B به هر خانه از پلیت میکروتیترا ۹۶ خانه‌ای وارد و مهر و موم شد و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۳۰µl از هر رقت استاندارد به ۸ چاهک ردیف A پلیت

در حالی که پلیت روی یخ خشک قرار داشت اضافه شد و با دستگاه هم‌زن به مدت ۱۵ دقیقه یکنواخت و سپس در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه نگهداری شد. در نهایت جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد.

میزان پروتئین نمونه توسط روش Bradford با BSA به عنوان استاندارد، میزان DNA با جذب در طول موج، ۲۶۰nm و میزان LPS آن با روش LAL (Limulus amebocyte lysate assay) که در آن نیز آندوتوکسین باکتری *E. coli* O₁₁₃:H₁₀ به عنوان استاندارد در نظر گرفته شده بود، سنجش گردید (۹،۱۰).

ب) تهیه عصاره سیر:

سیر تازه منطقه همدان، پس از جدا کردن پوست خرد شد و پس از مخلوط کردن با آب مقطر، تفاله‌های آن جدا گردید و میزان پروتئین آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV طبق فرمول زیر اندازه‌گیری شد (۶،۷):

(جذب در ۲۶۰ نانومتر) / ۰/۷۷ + (جذب در ۲۸۰ نانومتر) = ۱/۵۵ (mg/ml) غلظت پروتئین

ج) تهیه فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10):

در این روش، ابتدا عصاره سیر در مجاورت غشاهای ۵۰xm، ۳۰۰، ۱۰۰ و ۳۰، ۱۰pm اولترافیلتر شد. در نهایت اولترافیلتر R10 تولید شده، با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی با سفادکس G75 جداسازی و تخلیص شد الکتروفورز با به کارگیری ژل اکریل‌امید ۱۰٪ انجام گردید (۸).

د) ایمن‌سازی موش‌ها:

موش‌های ماده BALB/c، ۸-۶ هفته، که از مؤسسه تحقیقاتی پاستور خریداری شده بودند در گروه‌های ۵تایی، به صورت زیرپوستی تحت ۳ بار تزریق با دوزهای مختلفی از آلژینات، عصاره سیر مخلوط آلژینات - سیر و نیز R10 و آلژینات R10- (۶،۷) در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ قرار گرفتند (۶،۷).

ه) سنجش اپسونوفاگوسیتیک:

برای سنجش فعالیت Opsonophagocytic killing سرم موش‌های ایمن شده، ابتدا ۱۰۰ μl سرم موش ۱:۲ رقیق شده از هر گروه موش که فعالیت کمپلمان آن در دمای ۵۶ °C به مدت ۳۰ دقیقه از بین رفته است همراه ۱۰۰ μl از ماکروفاژهای موش ایمن نشده که در هر میلی‌لیتر آن 2×10^7 ماکروفاژ وجود داشته باشد در لوله‌های میکروفیوژ استریل ریخته شد و سپس ۱۰۰ μl از محلول ۵٪ کمپلمان خرگوش در سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید و در نهایت ۱۰۰ μl از سویه موکوئیدی *P.aeruginosa* 8821 M دارای 2×10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر به لوله‌های میکروفیوژ استریل اضافه شد. هم‌چنین لوله کنترلی که فاقد سرم نمونه بوده و به جای آن ۱۰۰ μl سرم فیزیولوژی یا ۱۰۰ μl محیط RPMI با ۱۵٪ سرم جنین گاوی غیر فعال شده توسط حرارت، جایگزین شده بود، در نظر گرفته شد.

سپس لوله‌ها روی دستگاه هم‌زن به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. بعد از طی دوره انکوباسیون، ۲۵ μl از ترکیبات فوق برداشته شد و در حجم ۱۰۰ برابر در سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد. جهت شمارش باکتری‌ها، از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط تریپتیکازسوی آگار (TSA) کشت یکنواختی تهیه شد و در ۳۷ °C به مدت یک شب انکوبه گردید. پس از شمارش کلنی‌های موکوئیدی باکتری، درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۲،۱۳):

$$\text{Percent Kill} = 100 \times (\text{CFU Surviving after } 90' \text{ in normal mouse serum} - \text{CFU Surviving in immune serum}) / (\text{CFU Surviving in normal mouse serum})$$

که در آن CFU (Colony forming units) بیانگر تعداد سلول‌های زنده در میلی‌لیتر محیط مایع می‌باشد که معیار آن تشکیل کلنی در محیط جامد است.

جهت به‌دست آوردن ماکروفاژهای موشی، بهترین محل، صفاق می‌باشد. به این ترتیب پس از بیهوش کردن ۳-۴ موش BALB/c ۸-۶ هفته‌ای با کلروفرم، پوست شکم آنها با رعایت کامل شرایط استریل بدون این که به پرده صفاق آسیبی برسد باز شد و جهت

کندن ماکروفاژهای صفاقی ۳-۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سرد به پرده صفاق تزریق و سپس جمع‌آوری گردید. ماکروفاژهای صفاقی توسط سانتریفوژ با دور 1500g × به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C رسوب داده شد و با محیط RPMI شسته و مجدداً سانتریفوژ گردید. به رسوب حاصل ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI غنی شده با FBS به نسبت ۹:۱ اضافه و یکنواخت گردید و سپس سلول‌های موجود در سوسپانسیون به‌دست آمده توسط لام نئوبار شمارش شد. (باید توجه داشت که حدود ۷۰-۶۰ درصد سلول‌های مشاهده شده زیر میکروسکوپ، ماکروفاژ هستند که باید در شمارش لحاظ شوند). با تغییر در غلظت سوسپانسیون می‌توان سوسپانسیونی با تعداد سلول 2×10^7 در هر میلی‌لیتر تهیه کرد.

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از برنامه نرم افزاری Microsoft Excel 2000 استفاده گردید. به‌وسیله این نرم‌افزار درصد کشندگی اپسونیک نمونه‌ها توسط آنالیز t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪ سنجیده و با گروه کنترل مقایسه شد.

نتایج

جداول ۱ و ۲ میزان دوزهای تزریقی برای ایمن‌سازی را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. آلزینات تخلیص شده از *P.aeruginosa* حاوی ۳۴/۶g/ml یورونیک اسید و ۱/۴۵ μg/ml پروتئین، ۰/۵ μg/ml DNA و ۰/۰۸ μg/ml LPS بود (جدول ۳).

عصاره سیر حاوی ۷۰ mg/ml پروتئین بود.

نتایج حاصل از فعالیت اپسونوفاگوسیتیک عصاره سیر، آلزینات و مخلوط عصاره سیر - آلزینات نشان داد که کمترین CFU نسبت به گروه کنترل، به ترتیب متعلق به گروه‌های سیر، آلزینات و سپس مخلوط سیر-آلزینات می‌باشد. کاهش CFU نشان‌دهنده افزایش فعالیت اپسونوفاگوسیتیک در این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل و نیز سایر گروه‌ها است (نمودار ۱).

جدول ۱: دوزهای تزریق شده سیر، آلزینات و مخلوط سیر-آلزینات

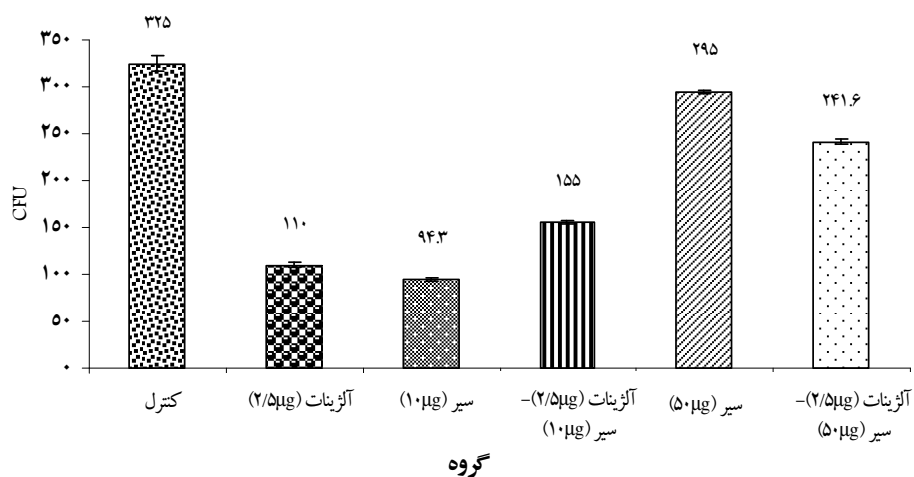
گروه	دوز	آلزینات (µg/mouse)	عصاره سیر (µg/mouse)
کنترل (PBS)	-	-	-
آلزینات	-	۲/۵	-
عصاره سیر	-	-	۱۰
آلزینات-عصاره سیر	-	۲/۵	۱۰
عصاره سیر با غلظت بیشتر	-	-	۵۰
آلزینات-عصاره سیر با غلظت بیشتر	-	۲/۵	۵۰

جدول ۲: دوزهای تزریق شده R₁₀، آلزینات و مخلوط R₁₀-آلزینات

گروه	دوز	آلزینات (µg/mouse)	عصاره سیر (µg/mouse)
کنترل (PBS)	-	-	-
آلزینات	-	۳	-
R ₁₀	-	-	۴
آلزینات - R ₁₀	-	۳	۴
R ₁₀ با غلظت بیشتر	-	-	۴۰
آلزینات - R ₁₀ با غلظت بیشتر	-	۳	۴۰

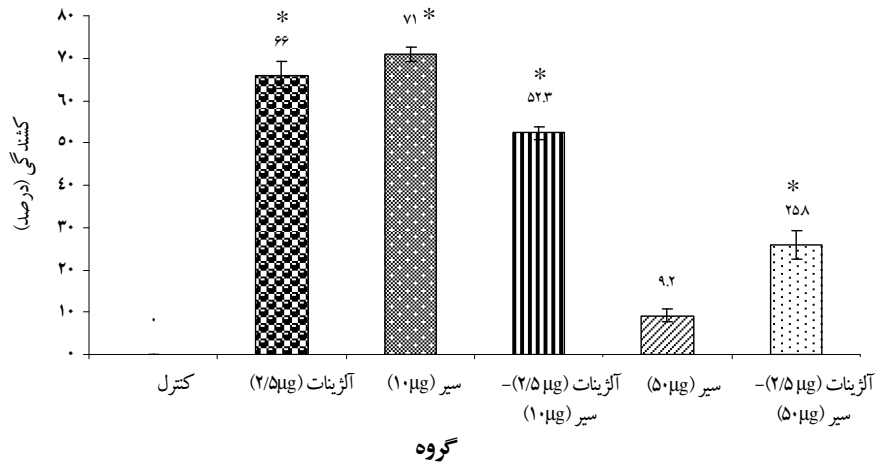
جدول ۳: مشخصات آلزینات به دست آمده

نام	میزان (میکروگرم در هر میلی لیتر)
یورونیک اسید	۳۴/۶
پروتئین	۱/۴۵
اسید نوکلئیک	۰/۵
لیپوبلی ساکارید	۰/۰۸



نمودار ۱: میانگین فعالیت اپسونوفاگوسیتیک سرم موش های ایمن شده با عصاره سیر، آلزینات و مخلوط آلزینات و

عصاره سیر بر کشتندگی اپسونیک *P.aeruginosa*



نمودار ۲: نتایج حاصل از مقایسه درصد کشدگی اپسونوفاگوسیتیک گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل

$P < 0.05^*$

(۷۷٪)، R_{10} غلیظ (۷۱٪)، R_{10} (۶۹٪) و سپس آلزینات (۶۷٪)، به ترتیب بیشترین درصد کشدگی معنی‌دار حاصل از اپسونوفاگوسیتوز را نشان دادند (نمودار ۴ و جدول ۵).

جدول ۴: مقایسه درصد کشدگی اپسونوفاگوسیتیک سویه موکونیدی *P. aeruginosa* 8821 M به وسیله سرم موش‌های ایمن شده در گروه‌های مختلف

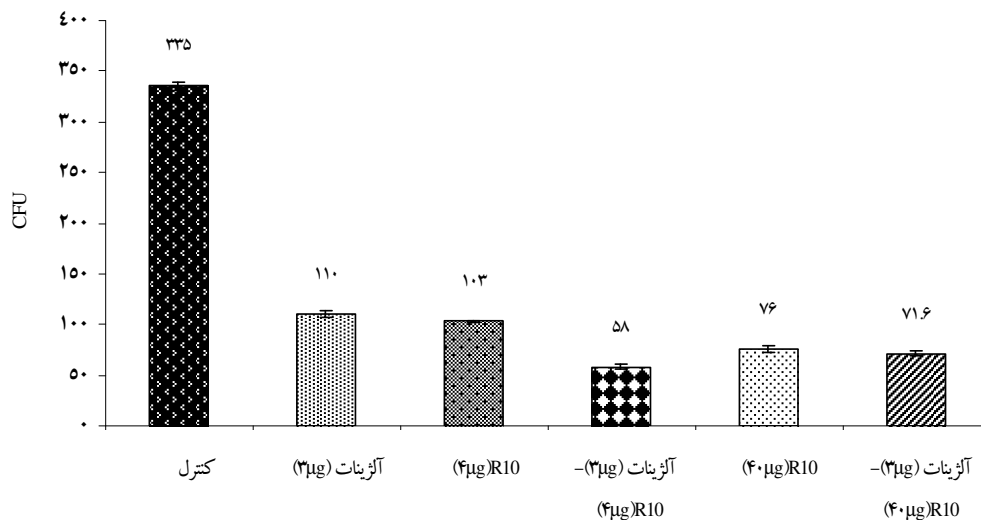
آنالیز آماری t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪	گروه‌های مقایسه شده
۰/۰۰۳*	کنترل-آلزینات
۰/۰۰۳*	کنترل-سیر
۰/۰۰۶*	کنترل-آلزینات سیر
۰/۱۶	کنترل-سیر غلیظ
۰/۰۲*	کنترل-آلزینات سیر غلیظ

* افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$)

بر اساس نتایج t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪ گروه‌های عصاره سیر (۷۱٪)، آلزینات (۶۶٪) و مخلوط سیر-آلزینات (۵۲/۳٪)، به ترتیب بیشترین درصد کشدگی معنی‌دار حاصل از اپسونوفاگوسیتوز را نشان دادند. این در حالی است که گروه ایمن شده با غلظت بیشتر عصاره سیر (۹/۲٪)، دارای کمترین درصد کشدگی بود (نمودار ۲ و جدول ۴).

بر اساس نتایج حاصل از فعالیت اپسونوفاگوسیتیک فراکشن ایمونومولودولانوری سیر (R_{10})، آلزینات و مخلوط آلزینات- R_{10} ، کمترین CFU به ترتیب متعلق به گروه‌های آلزینات- R_{10} ، آلزینات- R_{10} با غلظت بیشتر، R_{10} با غلظت بیشتر، R_{10} و سپس آلزینات می‌باشد. همراهی R_{10} با آلزینات در ایمن‌سازی گروه‌های فوق، افزایش فعالیت کشدگی اپسونوفاگوسیتیک را در گروه‌های آلزینات- R_{10} و آلزینات- R_{10} غلیظ، نسبت به گروه کنترل و نیز هر کدام را به تنهایی سبب شده است (نمودار ۳).

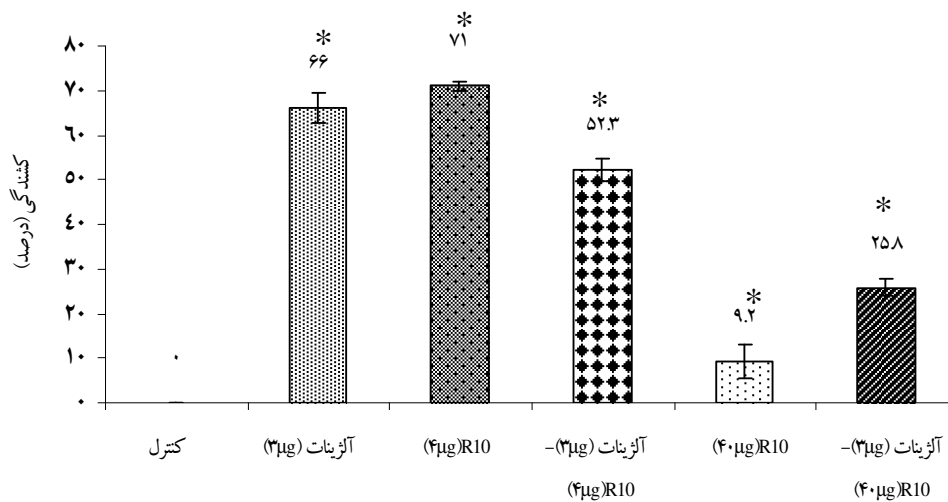
بر اساس نتایج t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪، گروه‌های آلزینات- R_{10} (۸۲٪)، آلزینات- R_{10} غلیظ



گروه

نمودار ۳. میانگین فعالیت اپسونوفاگوسیتیک سرم موش‌های ایمن شده با فراکشن R10، آلزینات و مخلوط فراکشن R10 - آلزینات

بر کشندگی اپسونوفاگوسیتیک *P. aeruginosa*



گروه

نمودار ۴. نتایج حاصل از مقایسه درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل

$P < 0.05^*$

جدول ۵: مقایسه درصد کشندگی اپسونوفاگوسیتیک سویه موکوئیدی *P. aeruginosa* 8821 M به وسیله سرم موش‌های ایمن شده

در گروه‌های مختلف

گروه‌های مقایسه شده	آنالیز آماری t-test با ضریب اطمینان ۹۵٪*
آئزینات-کنترل	۰/۰۰۲
R ₁₀ - کنترل	۰/۰۰۴
R ₁₀ آئزینات-کنترل	۰/۰۰۱
غلیظ R ₁₀ -کنترل	۰/۰۰۰۸
غلیظ R ₁₀ آئزینات-کنترل	۰/۰۰۲

* افزایش معنی‌دار در همه گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل دیده می‌شود (P < ۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت ریوی مزمن بزرگ‌ترین علت تخریب پیشرونده ریوی در بیماران مبتلا به فیروزسیتیک (CF) است. عفونت ریوی حاصل از *P. aeruginosa* با آسیب شدید به سطوح اپی‌تلیال و سوراخ کردن راه هوایی عامل مهم کاهش فعالیت ریه در پاک‌سازی عفونت، مرگ سلول‌های مستعد و در نهایت مرگ بیماران مبتلا به CF است (۲،۳). بنابراین می‌توان *P. aeruginosa* را به عنوان پاتوژن غالب موجود در راه هوایی این بیماران، قلمداد کرد. یکی از مشخصات بارز این باکتری تمایل آن برای تبدیل به فنوتیپ موکوئیدی است که منجر به تولید مقدار زیادی آگزوپلی‌ساکارید موکوئیدی (MEP) در اطراف سلول یا به اصطلاح آئزینات می‌گردد (۱۷-۱۴ و ۳).

آئزینات با تداخل در مکانیسم‌های اپسونیزاسیون و نیز ممانعت از روند فاگوسیتوز اپسونیک و غیر اپسونیک توسط ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها، سرکوب انفجار اکسیداسیون در سلول‌های فاگوسیتی و خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن، سرکوب فعالیت لنفویست‌ها و نیز تمایل به تشکیل میکروکلنی‌های مقاوم و بیوفیلیم که در چسبندگی باکتری و سایر ارگانیزم‌ها نقش دارد، عامل مهم در بیماری‌زایی و ایجاد عفونت مزمن در بیماران CF است (۱۸، ۳).

توانایی‌های فوق‌العاده زیاد *P. aeruginosa* در زمینه

ایجاد مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معمولی مورد استفاده، ریشه‌کنی این باکتری را در بیماران CF با مشکل رو به رو کرده است. مطالعات انجام شده، وجود فعالیت کشندگی اپسونوفاگوسیتیک آنتی‌بادی تولید شده علیه آگزوپلی‌ساکارید موکوئیدی *P. aeruginosa* را در سرم خرگوش ایمن شده با MEP خالص در شرایط *in vitro* نشان داده‌اند. افزایش این نوع آنتی‌بادی‌های خرگوش علیه MEP خالص، منجر به تسهیل عمل کشندگی فاگوسیتیک، در حضور لوکوسیت‌های خون محیطی انسان و نیز سطح پایینی از سرم تازه انسانی به عنوان منبع کمپلمان گردید (۱۹، ۱۲).

مطالعات نشان می‌دهد که حضور قبلی آنتی‌بادی‌های غیر اپسونیک علیه *P. aeruginosa* به دنبال ایمنی‌زایی با MEP، تولید آنتی‌بادی‌های کشنده اپسونیک علیه باکتری فوق را محدود می‌کند. این امر ایمنی‌زایی بیمارانی را که دارای تیترا بالای آنتی‌بادی‌های غیر اپسونیک هستند، با مشکل روبه‌رو می‌کند. به همین دلیل واکسیناسیون با MEP به تنهایی، باعث ایجاد یک پاسخ ضعیف ایمنی به دنبال تحریک کم تولید آنتی‌بادی‌های اپسونیک، می‌شود (۵).

از طرف دیگر MEP به تنهایی یک آنتی‌ژن غیره وابسته به T-cell است که خاطره ایمنی بر جای نمی‌گذارد. این در حالی است که استفاده از MEP

۲- تلقیح مکرر دوزهای بالا از آنتی ژن و یا دوزهای پایینی که پایین تر از حد آستانه تحریک پاسخ ایمنی باشند.

در این مطالعه، موش‌های ماده BALB/C که تحت تزریق قرار گرفته بودند در سنین ۶ تا ۸ هفته بوده و از لحاظ ایمنولوژیکی نیز به بلوغ رسیده بودند و از سوی دیگر، از آن جایی که غلظت پایین فراکشن پروتئینی نیز به همراه آلژینات، باعث تحریک سیستم ایمنی شده است، لذا به نظر می‌رسد که غلظت بیشتر R_{10} به همراه آلژینات باعث پدیده تحمل گردیده است (۵-۸).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر حاکی از آن است که فراکشن ایمنومدولاتوری سیر (R_{10}) نسبت به عصاره سیر که مخلوطی از ترکیبات و فراکشن‌های متفاوت است، قادر خواهد بود در همراهی با آلژینات خالص شده از سویه موکوئیدی *P.aeruginosa*، ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی (موش BALB/c)، با القای آنتی‌بادی‌های کشندهٔ اپسونیک که اپی‌توپ‌های آن، گروه‌های O استیل‌ه موجود بر روی MEP می‌باشد و عمدتاً از کلاس IgG هستند (۲۱)، افزایش دهد. پیش‌بینی می‌گردد که کونژوگه کردن آلژینات با فراکشن ایمنومدولاتوری سیر (R_{10}) بتواند باعث افزایش ایمنی‌زایی علیه آگزوپلی‌ساکارید موکوئیدی *P.aeruginosa* به‌خصوص در بیماران فیبروزسیستیک، حتی در حضور آنتی‌بادی‌های غیر اپسونیزان، گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر کاشف و سرکار خانم دکتر یارایی و جناب آقای پروفیسور Pier و نیز پرسنل بخش بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس و بخش ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد در اجرای این تحقیق تشکر می‌شود.

همراه با یک پروتئین ایمنومدولاتور به صورت ترکیب توأم و به‌ویژه کونژوگه کردن، می‌تواند ایمنی‌زایی را نسبت به استفاده از MEP به تنهایی، افزایش دهد و این آنتی‌ژن را به آنتی‌ژن وابسته به T-cell تبدیل کرده و علاوه بر پاسخ ایمنی فعال‌تر، خاطره ایمنی نیز ایجاد نماید (۲۱-۱۹ و ۱۳).

نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که عصاره سیر و فراکشن ایمنومدولاتوری آن (R_{10}) باعث افزایش ازدیاد حساسیت تأخیری، تکثیر لنفوسیت‌های T، فعالیت سلول‌های NK و نیز تقویت پاسخ‌های Th_1 که در ایجاد ایمنی سلولی نقش دارد، می‌گردد که بیانگر وجود ترکیبات ایمنومدولاتور در سیر می‌باشد (۶،۷).

در مطالعه حاضر مخلوط عصاره سیر به همراه آلژینات نتوانست ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی افزایش دهد. به نظر می‌رسد که ترکیبات سولفیدریل و تیول که در سیر به فراوانی یافت می‌شوند به گونه‌ای با گروه‌های هیدروکسیل آزاد و یا حتی گروه‌های استیل‌ه مانورونیک اسید که اپی‌توپ‌های (epitope) اصلی آلژینات محسوب می‌شوند واکنش داده و اثرات آن را تا حدودی از بین برده‌اند و با افزایش غلظت سیر، با این که گروه‌های تیول و سولفیدریل توانسته‌اند بر اپی‌توپ‌های آلژینات غلبه یابند، اما ترکیب میتوژن و لکتین مانند سیر تا حدودی توانسته است، باعث تحریک سیستم ایمنی شود (۳-۸ و ۶).

فراکشن R_{10} نیز در غلظت بالا نتوانست ایمنی‌زایی را علیه کلونیزاسیون این باکتری در مدل حیوانی افزایش دهد، که به نظر می‌رسد در غلظت بالای R_{10} و آلژینات، سیستم ایمنی با پدیده تولرانس مواجه گردیده است. تولرانس طی دو حالت ممکن است رخ دهد:

۱- تلقیح آنتی‌ژن به حیواناتی که از لحاظ ایمنولوژیکی نابالغ هستند.

The Effect of Combination of *Pseudomonas aeruginosa* Alginate and an Immunomodulator Protein of Garlic on Opsonophagocytosis in Murine Model

Ghazanfari T., Ph.D.¹, Honarmandian Sh., M.Sc.², Abdiali A., Ph.D.^{3*}, Shafiei M., M.Sc.², Khajeh Kh., Ph.D.⁴

1. Associate Professor of Medical Immunology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

2. Master of Science in Microbiology

3. Assistant Professor of Microbiology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

4. Assistant Professor of Biochemistry, School of Basic Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

* Corresponding author, e-mail: abdialya@alzahra.ac.ir

(Received 7 Oct. 2007 Accepted 10 April 2008)

Abstract

Background & Aims: Chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis is predominantly due to infection by mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mucoid *P. aeruginosa* is due to the production of exopolysaccharide called also alginate. Alginate in addition to interference with the clearance of lung has antiphagocytic property. Optimal killing activity of *P. aeruginosa* requires opsonic antibodies. Since immunomodulatory effects of garlic on enhancing phagocytic activity has been proved, in this study the effect of combination of alginate and an immunomodulator protein of garlic on production of opsonic antibodies against *P. aeruginosa* mucoid exopolysaccharide has been investigated.

Methods: Alginate was extracted from a 72-hour culture of *P. aeruginosa* strain 8821M and then DNase1, RNaseA and Proteinase k were added. Subsequently, alginate was purified with gel filtration chromatography by sephacryl S-400. Female BALB/c mice aged 6-8 weeks were divided into five groups and injected subcutaneously on days 0,7,14 with either alginate, garlic, alginate- garlic, R10 or alginate-R10 and opsonophagocytic killing activity was calculated in each group.

Results: The purified alginate contained 34.6µg/ml uronic acid, 0.5 µg/ml nucleic acid, 1.45 µg/ml protein and 0.08µg/ml LPS. Opsonophagocytic killing activity after immunization with R10, alginate and their combination showed significant increases of respectively 69%, 67% and 82% comparing to the control group.

Conclusion: Combination of *P.aeruginosa* alginate and immunomodulator fraction of garlic enhances immunogenicity to *P.aeruginosa* by the elicitation of opsonic antibodies in BALB/c mice.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Alginate, Garlic, Phagocytosis

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2008; 15(4): 283-294

References

1. Doggett RG, Harrison GM, Wallis ES. Comparison of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in persons with and without cystic fibrosis. *J Bacteriol* 1964; 87(2): 427-31.
2. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 194-222.
3. Govan JR, Deretic V. Microbial Pathogenesis in cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60(3): 539-74.

4. Cryz SJ, Furer E, Que JU. Synthesis and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* alginate-toxin A conjugate vaccine. *Infect Immun* 1991; 59(1): 45-50.
5. Pier GB, Desjardin D, Grout M, Garner C, Bennet SE, Pekoe G. Human immune response to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide vaccine. *Infect Immun* 1994; 62(9): 3972-9.
6. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebrahimi M. Immunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. *Int Immunopharmacol* 2002; 2(11): 1541-9.
7. Ghazanfari T, Hassan ZM, Khamesipour A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment. *J Ethnopharmacol* 2006; 103(3): 333-7.
8. Hassan ZM, Yaraee R, Zare N, Ghazanfari T, Sarrafnejad AH, Nazori B. Immunomodulatory affect of R10 fraction of garlic extract on natural killer activity. *Int Immunopharmacol* 2003; 3(10-11): 1483-9.
9. Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najar-Peerayeh S, Mousavi-Hosseini K, Moazzeni M, Djavid GE. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. *J Med Microbiol* 2006; 55(pt 10): 1441-6.
10. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Liosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharid-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun* 2003; 71(7): 3875-84.
11. Staczek j, Gilleland LB, Van der Heyde HC, Gilleland HE. DNA vaccines against chronic lung infections by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 37(2-3): 147-53.
12. Ames P, DesJardins D, Pier GB. Opsonophagocytic killing activity of rabbit antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide. *Infect Immun* 1985; 49(2): 281-5.
13. Garner CV, DesJardins D, Pier GB. Immunogenic properties of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide. *Infect Immun* 1990; 58(6): 1835-42.
14. Ramphal R, Pier GB. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infect Immun* 1985; 47(1): 1-4.
15. Van Heeckeren AM, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Response to acute lung infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(3): 288-96.
16. Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2006. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(8): 754-7.
17. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 2007; 153(pt 4): 917-23.
18. Pier GB, Matthews WJ, Eardley DD. Immunochemical characterization of the mucoid exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1983; 147(3): 494-503.
19. Pier GB, Saunders JM, Ames P, Edwards MS, Auerbach H, Goldfarb J, et al. Opsonophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in older noncolonized patients with cystic fibrosis. *New Eng J Med* 1987; 317(13): 793-8.

20. Lang AB, Rudeberg A, Schoni MH, Que JU. Vaccination of cystic fibrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa* reduces the proportion of patients infected and delays time to infection. *Pediatr Infect Dis* 2004; 23(6): 504-10.
21. Pier GB, Coleman F, Grout M, Franklin M, Ohman DE. Role of alginate O-acetylation in the resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 2001; 69(3): 1895-901.