Original Article

Evaluating the immunogenicity for plasmid encoding GRA5 antigen of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice

Naserifar R[1], Ghaffarifar F[1*], Dalimi-Asl A[1], Sharifi Z[2], Shojaei S[3], Salimi M[3]

1- Department of Medical Parasitology and Entomology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.
2- Research Center of Iranian Blood Transfusion Organizations, Tehran, I. R. Iran.
3- Department of Medical Parasitology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received January 5, 2012; Accepted February 23, 2012

Abstract:

Background: Severe or lethal damages of toxoplasmosis clearly indicate the need for the development of a more effective vaccine. Immunization with recombinant plasmid encoding protective proteins is a promising vaccination technique. Therefore, this study aimed to evaluate the immunization with plasmid encoding GRA5 antigen of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice**.**

Materials and Methods: In this experimental study, three groups of BALB/c mice (n=10 in each group) were selected using simple random sampling. GRA5 gene was cloned into pcDNA3 plasmid and purified by plasmid purification kits and then the product was injected (IM). To determine the status of cellular and humoral immunity, the Il-4, IFN-y and IgG, IgG2a, IgG subtypes were evaluated respectively using the ELISA-based assay.

Results: The group immunized with pcGRA5 indicated a significant augmented response in humoral and cellular immunity ($P \leq 0.05$) which was confirmed by MTT test. The mean survival time for the experimental and control groups were 9 and 6 days, respectively.

Conclusion: The immunized mice by pcGRA5 produce the higher titers of IFNγ indicated a Th1 response which is confirmed by the high level of IgG2a. Findings of this study demonstrate that GRA5 gene of *T. gondii* can be a potential vaccine candidate against the toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, DNA Vaccine, Cellular immunity, Humoral immunity, GRA5 antigen

*** Corresponding Author.**
Email: ghafarif@modares.ac.ir
Tel: 0098 21 828 84553
Fax: 0098 21 828 84555

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences July, 2012; Vol. 16, No 3, Pages 317-323

Please cite this article as: Naserifar R, Ghaffarifar F, Dalimi-Asl A, Sharifi Z, Shojaei S, Salimi M. Evaluating the immunogenicity for plasmid encoding GRA5 antigen of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. ***Feyz*** 2012; 16(4): 317-23.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کد کننده آنتی‌ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی در موش BALB/c

راضی ناصری‌فر [۱]، فاطمه غفاری‌فر [۲*]، عبدالحسین دلیمی‌اصل [۳]، زهره شریفی [۴]، سعیده شجاعی [۵]، محبوبه سلیمی [۶]

خلاصه:

سابقه و هدف: عوارض توکسوپلاسموز ضرورت یافتن واکسن مؤثری علیه این بیماری را مطرح می‌سازد. ایمن‌سازی با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های محافظت کننده، راه‌کاری امید بخش برای ساخت واکسن به‌شمار می‌آید. تحقیق حاضر با هدف ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کد کننده آنتی‌ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی در موش BALB/c صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق تجربی روی ۳ گروه ۱۰ تائی موش BALB/c که به‌طور تصادفی ساده انتخاب شده بودند، صورت گرفت. پس از کلون کردن ژن GRA5 در پلاسمید بیانی pcDNA3 و استخراج انبوه پلاسمید، محصول به‌دست آمده تزریق عضلانی گردید. جهت تعیین وضعیت ایمنی سلولی، سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4 و برای ایمنی هومورال، IgG و ساب‌تایپ‌های IgG1، IgG2a با استفاده از تست الایزا بررسی شدند.

نتایج: گروه ایمن شده توسط pcGRA5 افزایش معنی‌داری را در پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی نشان داد (P=۰/۰۰۳) که با تست MTT تایید گردید. متوسط زمان بقا در گروه تجربی ۹ و در گروه‌های کنترل ٦ روز بود.

نتیجه‌گیری: موش‌های ایمن شده با پلاسمید حاوی ژن GRA5 باعث تولید مقادیر بیشتری از IFN-γ شده که تمایل پاسخ ایمنی به سمت Th1 را نشان می‌دهند که این موضوع با سطح بالای IgG2a تأیید گردید. یافته‌های این تحقیق مشخص نمود که ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی می‌تواند کاندید مناسبی برای واکسیناسیون بر علیه توکسوپلاسموز باشد.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، DNA واکسن، ایمنی سلولی، ایمنی هومورال، ژن GRA5

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ٤، مهر و آبان ۱۳۹۱، صفحات ۳۲۳-۳۱۷

مقدمه

توکسوپلاسموز یکی از بیماری‌های زئونوز وسیع با انتشار جهانی است، به‌گونه‌ای که حداقل یک سوم جمعیت‌های انسانی دارای واکنش مثبت آنتی‌بادی می‌باشند. عامل بیماری یک تک-یاخته درون سلولی اجباری به نام توکسوپلاسما گوندی است که باعث عوارض شدید عصبی و بیماری‌های چشمی در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی و نوزادان متولد شده از مادران آلوده می‌گردد [۳-۱].

[۱] دانشجوی دکترای انگل‌شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] دانشیار، گروه انگل‌شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] استاد، گروه انگل‌شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۴] دانشیار، مرکز تحقیقات انتقال خون موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران

[۵] استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۶] کارشناس آزمایشگاه، گروه انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

***نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی

تلفن: ۸۲۸۸۴۵۵۳ ۰۲۱ **دورنویس:** ۸۲۸۸۴۵۵۵ ۰۲۱

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۵ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۰/۱۲/۴

بروز موارد بالای بیماری و عوارض جبران ناپذیر آن، ضرورت دست‌یابی به واکسن مؤثری را ایجاب می‌کند [٤]. در حال حاضر واکسن انسانی مؤثری در دسترس نمی‌باشد و به‌همین دلیل درمان بیماری در خیلی از موارد موفقیت‌آمیز نمی‌باشد [٦،٥]. ایمن‌سازی با پلاسمید DNA به‌عنوان راه‌کار امید بخش از تکنیک‌های ساخت واکسن به‌شمار می‌آید [۸،۷]. وجودگرانول‌های فشرده در ساختمان انگل و تراکم بالای پروتئین‌های داخل آن، امکان ساخت واکسن را از آن‌ها فراهم نموده است [۹]. GRA5 یکی از آنتی‌ژن‌های مهم توکسوپلاسما است که در اشکال مرفولوژیک و مراحل مختلف چرخه زندگی انگل وجود داشته و منجر به تحریک پاسخ ایمنی می‌گردد [۱۰]. تاکنون شواهدی در اختیار می‌باشند که نشان می-دهند این ژن در ایجاد ایمنی‌زایی از طریق تولید واکسن مؤثر بوده است. Gasior و همکاران برای اولین‌بار ارزیابی آنتی‌ژن نوترکیبی GRA5 کامل توکسوپلاسما برای تشخیص سرولوژیک توکسو-پلاسموز انسانی استفاده نمودند. این مطالعه نشان داد که rGRA5 کامل برای استفاده به عنوان جزء آنتی‌ژن کوکتل برای تشخیص آنتی‌بادی IgG علیه توکسوپلاسموز مناسب است [۱۱]. Igarashi و همکاران از طریق کلون‌نمودن ژن‌های ROP2، GRA7 و GRA5 توکسوپلاسما گوندی سوش RH، توانستند پروتئین‌های نوترکیب را تولید کرده و در ساخت واکسن مورد استفاده قرار-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

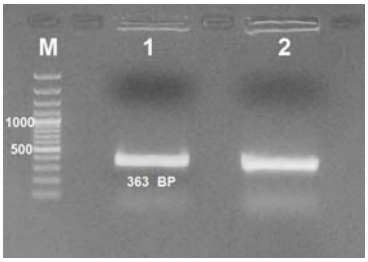
دهند [۱۲]. نظر به این‌که تا کنون نظرات متفاوتی در زمینه اثر بخشی واکسن‌های تولید شده وجود دارد، از این‌رو تحقیق حاضر با هدف ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کدکننده آنتی‌ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی در موش BALB/c صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌دلیل حساسیت موش BALB/c به سویه RH توکسو-پلاسما گوندی، این مطالعه روی ۳۰ سر موش ماده در سن ۸ هفتگی به‌طور تجربی صورت گرفت. مراحل انجام ایمنی‌زایی عبارت است از:

تهیه پلاسمید و تأیید بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوتیک

در این مطالعه جهت استخراج DNA از تاکی‌زوئیت انگل و تکثیر ژن GRA5 از کیت استخراج شرکت Bioneer استفاده شد. ژن کامل GRA5 به روش PCR کلاسیک تکثیر و قطعه bp ۳۶۳ با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگاروز مشخص گردید (شکل شماره ۱). به‌منظور کلون نمودن این ژن به‌ترتیب از پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T پروکاریوتی و پلاسمید بیانی یوکاریوتی pcDNA3 استفاده شد. برای مستعد نمودن سلول‌های پروکاریوتی از روش شوک حرارتی و جهت ترانسفکت پلاسمید نوترکیب به داخل سلول یوکاریوتی CHO از کیت Fugene 6 Transfection reagent شرکت Roche استفاده شد. بیان ژن GRA5 در محیط کشت سلولی با روش‌های SDS-PAGE، Western blot و RT-PCR مورد تأیید قرار گرفت. پس از تأیید نهایی طبق دستورالعمل کیت Mega Plasmid Endo Free شرکت Qiagen استخراج انبوه پلاسمید نوترکیب pcGRA5 انجام گردید [۱۳،۱٤].



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR ژنGRA5 توکسوپلاسما گوندی روی ژل آگارز۱ درصد
ستون ۱ و ۲ محصول PCR (قطعه bp ۳٦۳)، M مارکر bp ۱۰۰

ایمنی‌زایی

جهت بررسی ایمنی‌زایی پلاسمید نوترکیب تعداد ۳۰ سر موش BALB/c به ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم گردید. در گروه اول به‌عنوان کنترل منفی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS، گروه دوم به‌عنوان کنترل مثبت مقدار ۷۵ میکروگرم پلاسمید pcDNA3 و گروه سوم به‌عنوان گروه تجربی مقدار ۷۵ میکروگرم پلاسمید نوترکیب pcGRA5 به‌صورت تزریق عضلانی در عضله چهار سر ران Quadriceps تزریق شد. ایمن‌سازی در ۳ نوبت به فاصله ۳ هفته و در روزهای ۱، ۲۱ و ٤۲ صورت گرفت.

بررسی ایمنی هومورال

از هر ۳ گروه تحت مطالعه، به‌صورت تصادفی ۵ سر موش انتخاب شده و از آن‌ها در روزهای ٤۲ و ٦۳ بعد از تزریق خون‌گیری از گوشهٔ چشم به عمل آمد. بررسی ایمنی هومورال از طریق اندازه‌گیری مقدار تام و ساب‌تایپ‌های IgG سرم و با استفاده از تکنیک ELISA انجام شد. به‌منظور بررسی سطح آنتی-بادی با تکنیک Checker board titration ELISA مقادیر بهینهٔ آنتی‌ژن، رقت سرم و رقت آنتی‌بادی کونژوگه در موش‌های آلوده به انگل و سالم به‌عنوان کنترل مثبت و منفی تعیین گردید. مقدار IgG تام و ساب‌تایپ IgG1 با روش الایزای غیرمستقیم و ساب-تایپ IgG2a با روش Capture ELISA و با استفاده از کیت Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents و مطابق با دستورالعمل شرکت Sigma تعیین گردید.

بررسی ایمنی سلولی

ایمنی سلولی با اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL4 و IFNγ به روش الایزا و آزمایش MTT مورد بررسی قرار گرفت. ۷ هفته پس از تزریق سوم، لنفوسیت‌های خارج شده از طحال موش‌ها کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ٤۸ و ۷۲ ساعت (۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2) سوپ رویی جمع‌آوری شده و جهت سنجش سایتوکاین‌های IL-4 و IFNγ از کیت U-Cy Tech استفاده شد. آزمایش MTT جهت بررسی حداکثر میزان تحریک لنفوسیت‌ها در محیط برون تنی انجام شد. نتایج حاصل با استفاده از آزمون‌های Kaplan-Meier، Mann-Whitney و ANOVA مورد ارزیابی قرارگرفت.

چالش

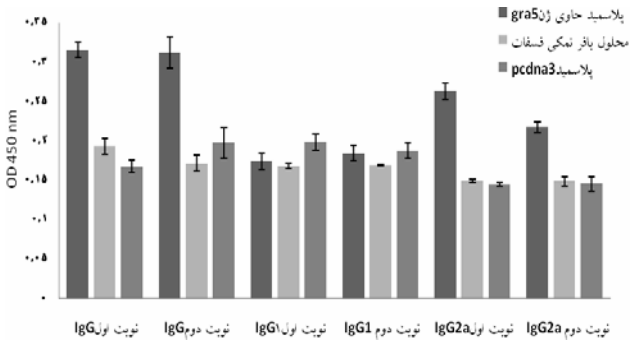
سه هفته پس از آخرین تلقیح موش‌های گروه تجربی و کنترل با ۱×۱۰^{٤} تاکی‌زوئیت زنده سویه RH توکسوپلاسما گوندی، به‌صورت داخل صفاقی چالش شده و مرگ و میر آن‌ها به‌صورت روزانه ثبت گردید.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

نتایج

بررسی ایمنی هومورال

مقایسه میانگین OD مربوط به IgG تام با استفاده از تست‌های Mann whitney و ANOVA نشان داد کمترین مقدار IgG تام در نوبت اول و دوم خونگیری به‌ترتیب مربوط به گروه pcDNA3 و PBS و بیشترین مقدار آن مربوط به گروه pcGRA5 می‌باشد که در هر دو نوبت خونگیری این اختلافات معنی دار بود (در نوبت اول خونگیری P=۰/۰۰۳ و در نوبت دوم خونگیری P=۰/۰۰۱). بر اساس نتایج حاصل از سنجش ایزوتایپ IgG1 با استفاده از آزمون‌های ذکرشده، مشخص می‌شود که کمترین مقدار OD در نوبت اول و دوم خونگیری مربوط به گروه PBS و بیشترین مقدار آن مربوط به گروه pcDNA3 بوده، اما اختلاف مشاهده شده معنی‌دار نبود(در نوبت اول خونگیری P=۰/۰۵۸ و در نوبت دوم خونگیری P=۰/۰۵۳). حال آن‌که اندازه‌گیری ایزوتایپ IgG2a در موش‌های مورد بررسی نشان داد، کمترین مقدارOD در نوبت اول و دوم خونگیری مربوط به گروه pcDNA3 و بیشترین مقدار مربوط به گروه pcGRA5 (P=۰/۰۰۱) می‌باشد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین IgG OD تام و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a در موش‌های ایمن شده گروه تجربی و کنترل
*: علامت روی ستون معرف sd می‌باشد.

نسبت IgG2a OD به IgG1 در گروه‌های تجربی و کنترل PBS و pcDNA3 به‌ترتیب ۱/۵۱، ۰/۸۹ و ۰/۷۳ تعیین گردید.

بررسی ایمنی سلولی

الف: سنجش سایتوکاین IFN-γ و IL-4

مقایسه میانگین مقدار سایتوکاین IFN-γ با استفاده از تست‌های Mann whitney و ANOVA نشان‌داد که کمترین مقدار سایتوکاین IFN-γ در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت لنفوسیتی به‌ترتیب مربوط به گروه PBS و بیشترین مقدار آن مربوط به گروه pcGRA5 (پس از ۴۸ ساعت P=۰/۰۰۱ و پس از ۷۲ ساعت P=۰/۰۰۱ می‌باشد). بررسی مقدار سایتوکاین IL-4 نشان‌داد که کمترین مقدار این سایتوکاین در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت لنفوسیتی به‌ترتیب مربوط به گروه PBS و بیشترین مقدار آن مربوط به گروه pcGRA5 می‌باشد (جدول شماره ۱) و این در حالی است که در کشت لنفوسیتی ۷۲ ساعت اختلاف مشاهده شده معنی‌دار نبود (P=۰/۰۷).

ب: سنجش MTT

جدول شماره ۲ نتایج سنجش MTT در گروه‌های مورد (تحریک آنتی‌ژنی) و شاهد (بدون تحریک آنتی‌ژنی) را با یکدیگر مقایسه نموده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود نسبت SI (۱/۴۵) درگروه pcGRA5 بالاتر از سایر گروه‌ها می‌باشد.

جدول شماره ۱- مقایسه میانگین مقدار سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-4 پس از کشت ۴۸ و ۷۲ ساعت لنفوسیتی در موش‌های ایمن شده گروه تجربی و کنترل

گروه‌ها	IFN-γ (pg/µl)				IL-4 (pg/µl)			
	کشت ۴۸ ساعت $\overline{X} \pm SD$	*($P \leq$۰/۰۵)	کشت ۷۲ ساعت $\overline{X} \pm SD$	*($P \leq$۰/۰۵)	کشت ۴۸ ساعت $\overline{X} \pm SD$	*($P \leq$۰/۰۵)	کشت ۷۲ ساعت $\overline{X} \pm SD$	*($P \leq$۰/۰۵)
پلاسمید حاوی ژن GRA5 (۱)	۸۴۳ ±۱۳۷	(۳.۲)	۱۰۹۳±۱۴/۵	۳.۲	۷۴ ±۱۲/۱	(۳.۲)	۵۰±۱۷/۳	---
محلول بافر نمکی فسفات (۲)	۱۵۳±۴/۴۰	(۱)	۱۶۷±۶/۶۵	۱	۲ ±۰/۵۷	(۱)	۱±۰/۵۵	
پلاسمید pcDNA3 (۳)	۱۷۲±۷/۲۶	(۱)	۱۸۰±۴/۵۸	۱	۴ ±۰/۸۸	(۱)	۳ ±۰/۳۳	

* طبق آزمون Mann whitney و ANOVA برای هر گروه با شماره گروه‌های ذکر شده در پرانتز اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

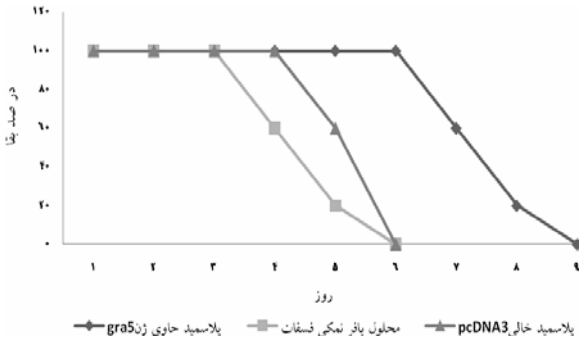
جدول شماره ۲- سنجش MTT در گروه‌های تحریک آنتی‌ژنی و بدون تحریک آنتی‌ژنی (برحسب میلیون لنفوسیت)

گروه‌ها	گروه‌های تحریک آنتی‌ژنی	گروه‌های بدون تحریک آنتی‌ژنی	*محاسبه نسبت SI
پلاسمید حاوی ژن GRA5	۱۱/۲	۷/۷	۱/٤٥
محلول بافر نمکی فسفات	۱/۲	۱/۱	۱/۰۹۰
پلاسمید pcDNA3	۲/۳	۲/۱	۱/۰۹٥

* بر اساس نسبت میان OD سلول‌های تحریک شده و سلول‌های تحریک نشده محاسبه می‌شود.

بررسی طول عمر موش‌ها پس از چالش با سویه با حدت RH

نتایج حاصل از چالش انگل نشان‌داد که مرگ و میر در موش‌های تحت مطالعه از روز چهارم به بعد آغاز و تا روز نهم ادامه داشت. در روز ششم همه موش‌های گروه‌های PBS و pcDNA3 و در روز نهم همه موش‌های گروه pcGRA5 دچار مرگ شدند (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- درصد بقاء موش‌های مورد مطالعه با چالش ۱×۱۰^{٤} تاکی‌زوئیت زندهٔ توکسوپلاسما گوندی سویه RH

آزمون آماری Wilcoxan نشان‌داد، بقای موش‌های گروه تجربی طولانی‌تر از گروه‌های کنترل بوده (P=۰/۰۱) و در مقایسه دو به دو، اختلاف گروه pcGRA5 با گروه‌های pcDNA3 و PBS معنی‌دار بود (به‌ترتیب P=۰/۰۰۷ وP= ۰/۰۰۱). هم‌چنین آزمون Kaplan-Meier نشان‌داد، میانگین زمان بقا در گروه تجربی بالاتر از گروه‌های کنترل بوده است

بحث

در این تحقیق نتایج بررسی مقدار سایتوکاین‌های INF-γ و IL-4 نشان‌داد که پلاسمید نوترکیب pcGRA5 قادر به تحریک ایمنی سلولی است. در روش MTT نیز مشخص شد در اثر تزریق پلاسمید نوترکیب pcGRA5 سلول‌های طحال تحریک و تکثیر یافته و بدین ترتیب باعث القای پاسخ ایمنی سلولی می‌شود. در مطالعهMartin و همکاران کارآیی واکسیناسیون با پروتئین ترکیبی GRA4 و ROP2 به‌همراه مخلوط آلوم در موش‌های C3H و C57B46 مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص شد کهGRA4 در تحریک سلول‌های طحال موش واکسینه شده و در نتیجه تولید INF-γ نقش دارد [۱٥]. در مطالعات مشابه و با استفاده از پلاسمید pcSAG1 مشخص گردیده است که افزایش مقدار INF-γ از طریق **افزایش مقدار IgG2a منجر به القای پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 شده است [۱٦،۲]. Peng و همکارانش توانستند DNA واکسنی با استفاده از ژن MIC6 توکسوپلاسما تولید نمایند. نتایج این تحقیق نشان‌داد در گروه ایمن شده با PVAX MIC6 درصد بالایی از آنتی‌بادی علیه TLA ترشح شده و پاسخ لنفی بسیار قوی ایجاد می‌شود [۱۷]. مطالعه خسروشاهی و همکاران نیز نشان‌داد که در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد سطح بالای INF-γ، IL-2 و IL-10 بیان‌گر آن است که واکسن کوکتل مورد استفاده منجر به تحریک ایمنی سلولی می‌شود [۱۸]. Denkers و همکاران [۱۹] Gazzinelli و همکاران [۲۰] بر نوع سلول‌های ایمنی و مکانیسم‌های دخیل در کنترل رشد انگل داخل سلولی توکسوپلاسما اشاره نمودند. پاسخ ایمنی از نوع Th1 عمده‌ترین پاسخ مؤثر در مقابله با بیماری می‌باشد. لنفوسیت‌های CD^{+4}، CD^{+8}، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و نوتروفیل‌ها نقش عمده‌ای در ایجاد و بقای پاسخ Th1 دارند [۲۱]. معمولا تعادل در پاسخ‌های ایمنی نتیجه بیماری را تعیین نموده و موجب مزمن شدن بیماری و در نتیجه بقای میزبان می‌شود. نقش لنفوکاین‌ها در محافظت میزبان اهمیت خاصی داشته و از این بین INF-γ و TNF-α به‌عنوان اجزای کلیدی در پاسخ بر علیه توکسوپلاسما می‌باشند [۲۱]. از سوی دیگر ماکروفاژها در ایمنی ذاتی علیه عفونت توکسوپلاسما گوندی نقش کلیدی داشته**

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

و INF-γ القاءکننده اصلی فعالیت کلاسیک ماکروفاژهاست. ماکروفاژهای فعال شده از طریق تخریب تریپتوفان (مورد نیاز برای رشد انگل) و تحریک مکانیسم iNos (نیتریک اکسید سنتاز القایی) انگل توکسوپلاسما گوندی را نابود می‌کنند [۱۱]. در مطالعه حاضر با بررسی مقدار آنتی‌بادی IgG و زیر گروه‌های IgG1 و IgG2a نشان‌داده شد که پلاسمید نوترکیب pcGRA5 باعث تحریک پاسخ ایمنی هومورال شد. در بررسی مشابه که با استفاده از پلاسمید ROP2، GRA7 و GRA1 صورت گرفته است نیز نسبت بالایی از IgG1/IG2a در موش‌های C3H ایمن شده نشان داده شد [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر، Golkar و همکاران نسبت بالایی از IgG1/IgG2a را علیه GRA2 و GRA4 گزارش نمودند [۲۳]. یافته‌های این تحقیق نشان داد که میزان بقا در گروه پلاسمید نوترکیب pcGRA5 حدود ۵۰ درصد بیشتر از گروه‌های کنترل می‌باشد. براساس یافته‌های پژوهش Kalantari و همکاران استفاده از واکسن نوترکیب GRA1 منجر به افزایش قابل توجه پاسخ ایمنی و زمان بقای حیوان می‌شود [۲٤]. در مطالعه Wang و همکاران از پلاسمید pcSAG1-MIC4 برای محافظت موش‌های BALB/c در مقابل توکسوپلاسما استفاده شده است که این واکسن باعث تحریک ایمنی هومورال و سلولی و افزایش طول عمر موش‌های واکسینه شد [٦]. Jongert و همکاران نیز با استفاده از واکسن DNA کوکتل GRA7 و GRA1 نشان دادند بعد از مواجهه با انگل، سطح آنتی‌بادی‌ها افزایش یافته و پرولیفراسیون لنفوسیت با تولید INF-γ همراه است [۵]. پروتئین‌های گرانول فشرده توکسوپلاسما گوندی به‌عنوان کاندیدای مناسب واکسن ضد انگل معرفی شده است. واکسیناسیون با استفاده از پلاسمیدهای کدکننده آنتی‌ژن‌های مزبور به خصوص GRA5، باعث تحریک ایمنی و تولید آنتی‌بادی می‌شود [۲۵،۱۲]. پروتئین‌های GRA5 که از گرانول فشرده ترشح می‌شوند پس از گلیکولیزه شدن، دارای وزن ملکولی حدود ۲۵-۲۱ کیلو دالتون می‌باشند. این پروتئین‌ها در تهاجم و ایجاد واکوئل پارازیتوفوروس و ماندگاری انگل پس از تهاجم سلولی ضروری می‌باشند [۱۲]. مهار کننده ۱ سرین پروتئاز توکسوپلاسما گوندی (Tg-PI-1)، یک آنتی‌ژن گرانول فشرده می‌باشد که وظیفه آن به‌طور اختصاصی مهار تریپسین، کیموترپسین و نوتروفیل الاستاز می‌باشد. این بدان معنی است که Tg-PI-1، نقش تنظیم‌کننده در فرآیند تهاجم و گسترش پاسخ ایمنی ذاتی دارد [۲٦]. آنتی‌ژن GRA5 علاوه بر جنبه تشخیصی، در محافظت از بیماری نیز کاربرد دارد. در مطالعه Igarashi و همکاران که با هدف ارزیابی نحوه محافظت در مقابل تشکیل کیست مغزی در موش‌های BALB/c با استفاده از واکسن نوترکیب استنشاقی rGRA5، rROP2 و rGRA7 انجام شده است مشخص شد که ایمن‌سازی توسط واکسن مزبور همراه با توکسین وبا باعث محافظت نسبی شده و بعد از تجویز خوراکی، از تشکیل کیست نسجی توکسوپلاسما جلوگیری می‌کند [۲۷]. در یک مطالعه‌ی دیگر نیز ژن‌های ROP2، GRA7 و GRA5 توکسو-پلاسما گوندی سوش RH کلون شده و به‌منظور تولید پروتئین-های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است [۱۲].

نتیجه‌گیری

تزریق پلاسمید نوترکیب pcGRA5 از طریق ترشح IgG2a باعث تولید مقادیر بالایی از IFN-γ شده و پاسخ ایمنی به سمت Th1 تمایل پیدا می‌کند. بر همین اساس ژن کامل GRA5 کاندید مناسبی برای واکسیناسیون بر علیه توکسوپلاسموز است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل بخشی از رساله دکتری تخصصی رشته انگل شناسی پزشکی به شماره ۵۲/۷۵۷۹۳ مورخ ۸۹/۹/۲۰ و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام یافته است. نویسندگان از مدیر محترم گروه انگل شناسی جناب آقای دکتر جاوید صدرائی و خانم قاسمی نیکو کارشناس محترم گروه و آقایان دکتر مجید پیرستانی و دکتر شهاب-الدین سروی به خاطر همکاری‌های همه جانبه تشکر می‌نماید.

References:

[1] Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. Toxoplasma gondii: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. ***Exp Parasitol*** 2009; 123(1): 81-9.

[2] Qu D, Wang S, Cai W, Du A. Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated Salmonella typhimurium against Toxoplasma gondii infection in mice. ***Vaccine*** 2008; 26(35): 4541-8.

[3] Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, et al. Identification of T. gondii epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. ***Vaccine*** 2010; 28(23): 3977-89.

[4] Zhang J, He S, Jiang H, Yang T, Cong H, Zhou H, et al. Evaluation of the immune response

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of Toxoplasma gondii and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. ***Parasitol Res*** 2007; 101(2): 331-8.
[5] Jongert E, Melkebeek V, De Craeye S, Dewit J, Verhelst D, Cox E. An enhanced GRA1-GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-Toxoplasma immune responses in pigs. ***Vaccine*** 2008; 26(8): 1025-31.
[6] Wang H, He S, Yao Y, Cong H, Zhao H, Li T, et al. Toxoplasma gondii: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. ***Exp Parasitol*** 2009; 122(3): 226-32.
[7] Yang X, Huang S, Chen J, Song N, Wang L, Zhang Z, et al. Evaluation of the adjuvant properties of Astragalus membranaceus and Scutellaria baicalensis GEORGI in the immune protection induced by UV-attenuated Toxoplasma gondii in mouse models. ***Vaccine*** 2010; 28(3): 737-43.
[8] Xue M, He S, Zhang J, Cui Y, Yao Y, Wang H. Comparison of cholera toxin A2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of Toxoplasma multi-antigenic SAG1-ROP2 DNA vaccine. ***Exp Parasitol.*** 2008; 119(3): 352-7.
[9] Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. ***An Acad Bras Cienc*** 2006; 78(2): 271-91.
[10] Holec-Gasior L, Kur J. Toxoplasma gondii: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. ***Exp Parasitol*** 2010; 124(3): 272-8.
[11] Louis M, Weiss K. Toxoplasma gondii The Model Apicomplexan Perspectives and Methods. 1st ed. London: Elsevier Ltd; 2007.
[12] Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Kawasaki PM, Navarro IT, Vidotto O, et al. Toxoplasma gondii: cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of ROP2, GRA5 and GRA7. ***Genet Mol Res*** 2008; 7(2): 305-13.
[13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 32, 123.
[14] Masbi N, Ghafarifar F, Sharifi Z, Dalimi A, Vazini H. Cloning and Characterization of GRA4 gene of Toxoplasma gondii (RH strain) in expression eukaryotic vector pcDNA3. ***Daneshvar*** 2010; 17(85): 1-8. [in Persian]
[15] Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, De Roodt AR, et al. 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.
[16] Yan HK, Yuan ZG, Petersen E, Zhang XX, Zhou DH, Liu Q, et al. Toxoplasma gondii: protective immunity against experimental toxoplasmosis induced by a DNA vaccine encoding the perforin-like protein 1. ***Exp Parasitol*** 2011; 128(1): 38-43.
[17] Peng GH, Yuan ZG, Zhou DH, He XH, Liu MM, Yan C, et al. Toxoplasma gondii microneme protein 6 (MIC6) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. ***Vaccine*** 2009; 27(47): 6570-4.
[18] 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(4): 778-83.
[19] Denkers EY. Toll-like receptor initiated host defense against Toxoplasma gondii. ***J Biomed Biotechnol*** 2010; 2010: 737125.
[20] Mendes EA, Caetano BC, Penido ML, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT. MyD88-dependent protective immunity elicited by adenovirus 5 expressing the surface antigen 1 from Toxoplasma gondii is mediated by CD8(+) T lymphocytes. ***Vaccine*** 2011; 29(27): 4476-84.
[21] Schwartzman JD. Toxoplasmosis. ***Curr Infect Dis Rep*** 2001; 3(1): 85-9.
[22] Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, et al. DNA vaccination with genes encoding Toxoplasma gondii antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. ***Infect Immun*** 2000; 68(1): 38-45.
[23] Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie R, et al. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against Toxoplasma chronic infection in mice. ***Vaccine*** 2007; 25(21): 4301-11.
[24] Doskaya M, Kalantari-Dehaghi M, Walsh CM, Hiszczynska-Sawicka E, Davies DH, Felgner PL, et al. GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine. ***Vaccine*** 2007; 25(10): 1824-37.
[25] Hiszczynska-Sawicka E, Oledzka G, Holec-Gasior L, Li H, Xu JB, Sedcole R, et al. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of Toxoplasma gondii. ***Vet Parasitol*** 2011; 177(3-4): 281-9.
[26] Cuppari AF, Sanchez V, Ledesma B, Frank FM, Goldman A, Angel SO, et al. Toxoplasma gondii protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. ***Vaccine*** 2008; 26(39): 5040-5.
[27] Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Machado RZ, Navarro IT, Vidotto O, et al. Toxoplasma gondii: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. ***Exp Parasitol*** 2008; 118(3): 386-92.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]