مقایسه توانایی ایمنی‌زایی آنتی‌ژنهای مختلف رایزوپوس اوریزا در حیوانات تجربی

علی میکائیلی[1] محمد مؤذنی[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۳ ، ۹۵ ـ ۹۳، (۱۳۷۸)

موکور مایکوزیس به عنوان یکی از حادترین بیماریهای قارچی در بیماران مبتلا به دیابت کنترل شده و آنهایی که دچار نوتروپنی شدید می‌باشند، شناخته شده است. در این بررسی جهت ارزیابی و مقایسه توان ایمنی‌زایی آنتی ژنهای مختلف رایزوپوس اوریزا (مهمترین عامل موکور مایکوزیس)، ۱۲ رأس بز را به سه دسته چهارتایی تقسیم نموده و هر گروه، با آنتی‌ژنهای مختلف رایزوپوس، تحت تزریق از راههای مختلف قرار گرفتند. گروه یک، عصاره آنتی‌ژنی کامل (خام) دریافت نمودند، به گروه دو عصاره آنتی‌ژنی سیتوپلاسمی و به گروه سه پروتئینهای ۳۴ و ۴۰ کیلو دالتونی تزریق گردید. پس از خونگیری از حیوانات، آزمایش تغییر شکل لمفوسیتی (LTT) و تست کانترایمونوالکتروفورز به عمل آمد. نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین شاخص تحریک لمفوسیتی در برابر میتوژن کانکاوالین A در سه گروه تحت آزمایش به ترتیب ۶، ۵/۸ و ۶ بود. در حالی که این میانگین در برابر آنتی‌ژن خام رایزوپوس به ترتیب ۷/۹، ۷/۲ و ۷/۷ را نشان داد. همچنین در آزمایش کانترایمونوالکتروفورز (CIE) و با استفاده از عصاره آنتی‌ژنی کامل در همه گروهها خطوط رسوبی ایجاد گردید (بین ۱ تا ۳ خط). با توجه به نتایج حاصله در این تحقیق، به نظر می‌رسد که پروتئینهای ۳۴ و ۴۰ کیلو دالتونی حاصله از این قارچ توانایی تحریک ایمنی سلولی و هومورال را در حد کفایت داشته و در واقع به عنوان آنتی‌ژنهای حدت عمل می‌نماید. بنابر این برای ایجاد مصونیت و جلوگیری از پیشرفت و تهاجم رایزوپوس در آینده به جای کاربرد مجموعه آنتی‌ژنی از این دو می‌توان بهره جست.

واژه‌های کلیدی: رایزوپوس اوریزا، ایمنی زایی، آنتی‌ژن، موکورمایکوزیس

موکور مایکوزیس (Mucormycosis) یکی از عفونتهای فرصت طلب قارچی می‌باشد که در زمانی که عوامل مستعد کننده مثل اسیدوز دیابتیک (Diabetic acidosis) یا نوتروپنی شدید در میزبان تظاهر نماید، این بیماری به شکل حاد و شدیداً کشنده تظاهر می‌نماید (۲ و ۱). یکی از عوامل مهم ایجاد کننده این بیماری رایزوپوس اوریزا (Rhizopus oryzae) می‌باشد. این قارچ توانایی تولید سریع اسپور به میزان زیاد را دارا بوده و به عنوان عامل عفونت‌زا از راه تنفس وارد گردیده و موجب بیماری می‌گردد. براساس مطالعات انجام گرفته قارچ مذکور در بین گونه‌های مختلف موکور دارای بیشترین شاخصهای آنتی‌ژنی بوده و لذا در تحقیقات مرتبط با موکور مایکوزیس از آن استفاده می‌شود (۳ و ۱). زمانی که اسپورهای این قارچ وارد آلوئولهای ریوی می‌گردند، مکانیسمهای دفاع غیر اختصاصی فعال گردیده و در زمانی که قارچ به نحوی به جریان خون راه می‌یابد ایمنی اختصاصی وابسته به سلول و هومورال فعال می‌گردد و از پیشرفت عفونت و ایجاد ضایعات بافتی جلوگیری می‌نمایند (۶، ۵ و ۴). در ارتباط با آنتی‌ژنهای پیکره‌ای یا سیتوپلاسمی این قارچ و نقش هر یک از آنان در برانگیختن پاسخهای ایمنی و بخصوص دفاع غیر اختصاصی مطالعات مختلفی صورت پذیرفته است که نتایج آن نشان می‌دهد، آنتی‌ژنهای سیتوپلاسمیک در روند سیستمیک شدن دارای نقش مهمی باشد (۷، ۶ و ۱).

هدف از این تحقیق ارزیابی دو آنتی‌ژن ۳۴ و ۴۰ کیلو دالتونی سیتوپلاسمیک این قارچ در روند ایمنی‌زایی و مقایسه آن با آنتی‌ژنهای کامل و سیتوپلاسمی رایزوپوس اوریزا می‌باشد.

مواد و روش کار

۱. حیوانات: تعداد ۱۲ رأس بز ۴ ماهه ماده را انتخاب نموده و به مدت دو هفته در بخش حیوانات دانشکده دامپزشکی نگهداری و تحت مراقبت قرار گرفتند. نتایج آزمایشات بالینی و تستهای معمولی خونی نشان داد که این حیوانات سالم بوده و مشکل خاصی ندارند.

۲. تزریقات آنتی‌ژنی: حیوانات به سه دسته چهارتایی تقسیم شده و هر گروه به شرح زیر تحت تزریق آنتی‌ژنهای مختلف رایزوپوس قرار گرفتند. نحوه تهیه این آنتی‌ژنها، قبلاً توضیح داده شده است (۱).

گروه ۱: آنتی‌ژنهای کامل رایزوپوس اوریزا

گروه ۲: آنتی‌ژنهای سیتوپلاسمی رایزوپوس اوریزا

گروه ۳: آنتی‌ژنهای ۳۸ و ۴۰ کیلو دالتونی رایزوپوس اوریزا

این حیوانات در مجموع به مدت ۳۴ روز و ۴ بار از راههای مختلف جلدی، عضلانی و وریدی مورد تزریق قرار گرفتند، همچنین ۴ رأس بز نیز به عنوان شاهد در همان شرایط نگهداری گردیدند و تحت هیچ نوع تزریقی قرار نگرفتند.

۳. خونگیری و انجام آزمایشات LTT و CIE: دو روز پس از آخرین تزریق آنتی‌ژنی، میزان ۵۰ میلی‌لیتر از ورید گردنی هر حیوان خونگیری به عمل آمد. برای جداسازی لمفوسیتها، ۳۰ میلی لیتر از خون هر حیوان به لوله‌های واجد ۳۰۰ واحد هپارین منتقل گردید. نمونه‌های خون هپارینه به نسبت ۱:۱ با RPMI ۱۶۴۰ رقیق شده و مراحل بعدی تست LTT براساس روش استاندارد انجام پذیرفت (۲).

همچنین جهت آزمایش CIE، پس از جداسازی سرم، با استفاده از آنتی‌ژن کامل رایزوپوس اوریزا این آزمایش در ارتباط با سرم هر حیوان انجام شد (۲ و ۱).

نتایج

جدول ۱ نتایج آزمایش LTT را در گروههای مختلف حیوانات نشان می‌دهد. براساس نتایج به دست آمده، اختلاف معنی‌داری بین پاسخهای به دست آمده در بین گروههای ایمن و همچنین در مقایسه با پاسخ حیوانات شاهد وقتی که از میتوژن کانکاوالین A استفاده گردید مشاهده نمی‌شود. اما وقتی که از آنتی‌ژن رایزوپوس اوریزا استفاده شد، این اختلاف بین گروههای ایمن و شاهد معنی‌دار می‌باشد ($P < ۰/۰۵$). یعنی لمفوسیتهای حیوانات ایمن در سه گروه مختلف پاسخ مناسب و قویتری را در این آزمایش نسبت به گروه شاهد نشان دادند. نتایج آزمایش CIE، نشان می‌دهد که سرم تمامی حیوانات در سه گروه نسبت به آنتی‌ژنهای کامل رایزوپوس پاسخگو هستند. حداکثر تعداد خطوط رسوبی سه خط می‌باشد که مربوط به گروه یک بوده و در مجموع اختلاف معنی‌دار بین این پاسخها در سه گروه مشاهده نگردید. اما در گروه شاهد نتیجه این آزمایش منفی بود. یعنی سرم حیوانات شاهد فاقد آنتی بادیهای رسوب دهنده ضد رایزوپوس می‌باشد.

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه - ایران.
۲) گروه آموزشی ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.

جدول ۱- نتایج آزمایش LTT در گروههای مختلف حیوانات

شاخص تحریک	میانگین CPM SD	نـــوع لمفـــوسیت	آنتی‌ژن (محرک)
۷/۹	۸۶۸ ± ۹۴/۱	مربوط به حیوانات گروه ۱	رایزوپوس اوریزا
۶/۹	۷۹۶/۵ ± ۱۵/۳	مربوط به حیوانات گروه ۲	رایزوپوس اوریزا
۷/۱	۸۱۲ ± ۴۲/۱	مربوط به حیوانات گروه ۳	رایزوپوس اوریزا
۶	۷۸۴/۴ ± ۴۲/۵	مربوط به حیوانات گروه ۱	کانکاوالین A
۵/۸	۷۲۵/۴ ± ۱۸۶/۴	مربوط به حیوانات گروه ۲	کانکاوالین A
۵/۶	۷۲۱/۱ ± ۴۹/۳	مربوط به حیوانات گروه ۳	کانکاوالین A
۴/۹	۷۱۷/۹ ± ۱۷۸/۷	مربوط به حیوانات گروه شاهد	رایزوپوس اوریزا
۵/۹	۷۲۸/۴ ± ۱۸۶/۷	مربوط به حیوانات گروه شاهد	کانکاوالین A

بحث

اسپورهای رایزوپوس اوریزا دارای آنتی‌ژنهای متنوع و پیچیده‌ای می‌باشد، بر اساس مطالعات انجام شده ۲۸ آنتی‌ژن پروتئینی از اسپورهای این قارچ استخراج گردیده است (۳ و ۱). این اسپورها در مواجهه با میزبان توانایی برانگیختن پاسخهای ایمنی غیر اختصاصی و اختصاصی را داشته و در شرایطی که عوامل مستعدکننده نوتروپنی و اسیدوز دیابتیک وجود داشته باشد، اسپورها به شکل فعال در آمده و با ایجاد هایف به عروق خونی حمله‌ور شده و ایجاد عفونتهای سیستمیک می‌نماید (۹، ۸، ۶، و ۴).

بر اساس تحقیقات انجام گرفته در مراحل اولیه عفونت، دفاع غیر اختصاصی فاگوسیتوز و در مراحل بعدی ایمنی وابسته به سلول و تا حدی ایمنی هومورال نقش تعیین کننده در جلوگیری از پیشرفت ضایعات را به عهده دارند (۱۱، ۱۰، ۹، ۱).

در ارتباط با آنتی‌ژنهای این قارچ، چندین مطالعه و بررسی انجام یافته است (۷، ۶ و ۱). بر اساس این گزارشات، آنتی ژنهای سیتوپلاسمیک در مراحل پیشرفت و تهاجم قارچی اهمیت زیادی داشته و در صورت ا یجاد پاسخ ایمنی اختصاصی بر علیه این آنتی‌ژنها از پیشرفت بیماری جلوگیری به عمل می‌آید.

در مطالعه و بررسی حاضر، جهت مقایسه ایمنی‌زایی آنتی‌ژنهای مختلف رایزوپوس اورایزا، از سه نوع آنتی‌ژن کامل، سیتوپلاسمی و پروتئینهای ۳۶ و ۴۰ کیلو دالتونی استفاده گردید. نتایج حاصله گویای آن است که پروتئینهای ۳۶ و ۴۰ کیلو دالتونی به تنهایی توانایی برانگیختن پاسخ ایمنی سلولی را در حد آنتی‌ژنهای کامل دارا می‌باشند و از نظر پاسخ LTT بین سه گروه حیوان ایمن، اختلافاتی مشاهده نگردید. با توجه به اینکه در زمینه دو پروتئین فوق مطالعه مستقلی تا به حال صورت نپذیرفته است، لذا این بررسی برای اولین بار نشان می‌دهد که جهت ایمن سازی حیوانات بر علیه موکور مایکوزیس، نیازی به استفاده از آنتی‌ژن خام یا سیتوپلاسمیک نمی‌باشد، زیرا نقش این مجموعه آنتی‌ژنی به طور کامل شناسایی نگردیده و چه بسا ایجاد عوارض و مشکلاتی برای میزبان نماید.

در مطالعات آینده، با ایمن کردن حیوانات توسط آنتی‌ژنهای مذکور و تزریق سوش فعال و زنده به حیوانات می‌توان نقش این پروتئینها را در جلوگیری از ضایعات حاصل از موکور مایکوزیس مورد ارزیابی دقیقتری قرار داد.

در این بررسی، همچنین در سه گروه حیوانات ایمن، آنتی‌بادیهای نشان رسوب‌دهنده بر علیه آنتی ژنهای رایزوپوس ایجاد شد که با تست شد. CIE داده اما در حیوانات شاهد هیچ آنتی‌بادی قابل جستجو با این روش دیده نشد. بنابراین برای ارزیابیهای پاسخ ایمنی سلولی، هومورال و احتمالاً فاگوسیتوز در آینده می‌توان از دو پروتئین مورد بحث به نحو مطلوبتری بهره برد.

References

1 . Cox, R.A., Immunology of the fungal diseases, 29 - 50, CRC Press, (1993).

2 . Waldorf, A.R., Ruderman, N. and Diamond, R.D., Specific susceptibility to mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar macrophage defense against Rhizopus, J., Clin, Invest., 74, 150, (1984).

3 . Elder, T.D. and Baker, R.D., Pulmonary mucormycosis in rabbits with alloxan diabetes Arch. Pathol., 61, 159, (1956).

4 . Bauer, H., F. and Sheldon, W.H., Experimental cerebral mucormycosis in alloxan - diabetic rabbits, Yale J.Biol Med. 28, (1955).

5 . Sheldon, W.H. and Baure, W., Tisue mast cells and caute infammation in experimental cutaneous mucormycosis of normal 48/80 treated and diabetic rats, J. Exp. Med., 112- 1069, (1960).

6 . Lundborg, M. and Holma, B. In vitro phagocytosis of fungal spores by rabbit lung macroplages, Sabouraudia, 10 - 152, (1972).

7 . Waldorf, A.R. and Pelosi, C.A., Defects of bronchoalveolar macrophages and deficient defenses against fungi in diabetic mice , in press.

8 . Levitz, S.M. and Diamond, R.D. Killing of Aspergillus fumigatus spores and Candida albicans yeast phase by the iron - hydrogen peroxide- iodide cytotoxic system: Comparison with the myeloperoxidase - hy - drogen peroxide - halide system, Infect. Immun., 43 - 1100, (1984).

9 . Diamond, R.D., Haudenschild, C.C. and Erickson, N.F., III, Monocyte - mediated damage to Rhizopus oryzae in vitro, Infect. Immun., 38, 292, (1982).

10 . Chinn, r. Y.W. and Diamond, R.D., Generatikon of chemotacitic factors by Rhizopus oryzae in the presence and absence of serum: relationship to hyphal damage mediated by human neutrophils and effects of hyperglycemia and ketoacidosis, Infect. Immun. 38 , 1123, (1982).

11 . Chinn, R.Y.V.and Diamond, R.D., Generatikon of chemotacitic factors by Rhizopus oryzae in the presence and absence of serum: relationship to hyphal damage mediated by human neutrophils and effects of hyperglycemia and ketoacidosis, Infect. Immun. 381-1123, (1982).

Comparison of the ability of immunization of different Rhizopus oryzae antigens in experimental animals

Mickaeli A.[1], Mozzeni M.[2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah Medical Sciences University, Kermanshah - Iran.* [2]*Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences , Tarbiat Moddares University, Tehran - Iran.*

Mucormycosis has known as one of the acute form of fungal diseases individuals with diabetes mellitus and patients suffering from neutropenia. In this study, in order to evalutation & comparison of the immunization activity of different antigens of R. oryaz, 12 goats were chosen & divided in to 3 group. Then, every groups were injected by different antigens. Group 1 injected by crude antigens, group 2 by cytoplasmic antigens, & group 3 recieved 2 different protein of R. oryzae extract. In this study , lymphocyte transformation test and C.I.E were carried out. The results of this study showed that the mean of lymphocyte stimulation index against con A were 6 , 5.8 and 6, resperctively. But, the results against crude antigens were 7.9, 7.2 and 7.7, as well. Also, in CIE , by using the sera of the animals the percipitin anitbodies were appeared in the all groups. Regarding to the results of this study, it seems that the 2 proteins (34 and 40 KD) of this fungus, can stimulate of cell mediated and humoral immunity on high level and they act as virulance antigens. Thus, in order to immunization and prevention from growing of R. oryzae and control the lesions progress, the 2 antigens should be used instead of the crude or cytoplasmic antigens.

Key words: Rhizopus oryzae, Antigen, Immunization.