

Protective Efficacy of the Killed *Toxoplasma gondii* Vaccine in Nano-alum Adjuvant

Mehdi Ghahary¹,
Ramezan Ali Taheri²,
Mahdi Fasihi-Ramandi³

¹ MSc graduate in Medical Immunology, Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisoning Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisoning Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received August 19, 2018 ; Accepted December 24, 2018)

Abstract

Background and purpose: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) as a causative agent of toxoplasmosis, is an obligate intracellular parasite which is excreted by the cat's feces. Efforts have been made for the development of toxoplasmosis vaccine, but none led to developing a vaccine with protective immune response to the parasite. Adjuvants are essential for vaccine formulation to create strong immune responses. As an adjuvant, nanomaterials such as nano-alum, can stimulate both humoral and cellular immune responses. The present report aimed to investigate the protective effects of the alum-based nano-adjuvant formulated in killed *T. gondii*.

Materials and methods: In this experimental study, the vaccine candidates were separately formulated in alum, complete Freund, and nano-alum adjuvants. The BALB/c mice were immunized three times with two-week intervals. To investigate the type of induced immune response, sera were analyzed by ELISA for total IgG, IgG1, and IgG2a isotypes and also IL-4, IFN- γ , TNF- α , and IL-2 cytokines. To evaluate lymphocyte proliferation, BrdU method was performed.

Results: Immunization of mice with killed *Toxoplasma* vaccine formulated with nano-alum adjuvant increased lymphocyte proliferation, TNF- α , IL-4, IL-2, and IFN- γ cytokine responses, total antibodies, as well as IgG1 and IgG2a subtypes compared with those of other experimental groups.

Conclusion: Compared with alum-based killed *Toxoplasma* vaccine, the nano-alum adjuvant could strongly induce cellular and humoral immune responses.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, nano-alum, adjuvant, ELISA, vaccine

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (171): 11-23 (Persian).

* Corresponding Author: Mahdi Fasihi-Ramandi - Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisoning Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: Fasihi.m@gmail.com)

بررسی اثر ادجوانتی نانو ذرات آلوم در واکسن کشته شده توکسوپلازما گوندی

مهدی قهاری^۱

رمضانعلی طاهری^۲

مهدی فصیحی رامندی^۳

چکیده

سابقه و هدف: توکسوپلازما گوندی (*T. gondii*) یک انگل داخل سلولی اجباری بوده که از طریق مدفوع گربه دفع می گردد. تلاش های زیادی برای توسعه واکسن توکسوپلازما سموزیس صورت گرفته است اما هیچ یک از آنها قادر به ایجاد پاسخ ایمنی حفاظتی نسبت به انگل نبوده اند. ادجوانت ها برای فرمولاسیون واکسن ضروری می باشند تا پاسخ های ایمنی قوی تری ایجاد نمایند و به عنوان یک ادجوانت، نانو موادی چون نانو آلوم می توانند پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی را تحریک کنند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات حفاظتی نانو آلوم فرموله شده در توکسوپلازما گوندی کشته شده انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، کاندید واکسن به طور جداگانه در آلوم، ادجوانت فروند کامل و ادجوانت نانو آلوم تهیه شد. موش های BALB/c سه بار با فواصل دو هفته ای ایمن شدند. برای بررسی نوع واکنش ایمنی القا شده، سرم ها برای اندازه گیری IgG توتال، ایزوتایپ IgG1 و IgG2a و نیز IL-4، IFN- γ ، TNF- α و IL-2 مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی تکثیر لنفوسیت، از روش BrdU استفاده شد.

یافته ها: ایمن زایی موش ها با واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در ادجوانت نانو آلوم باعث افزایش پاسخ تکثیر لنفوسیت، TNF- α ، IL-4، IL-2 و IFN- γ ، IgG توتال و همچنین ایزوتایپ های IgG1 و IgG2a در مقایسه با سایر گروه های تجربی می گردد.

استنتاج: ادجوانت نانو آلوم می تواند سطح بالایی از پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را در مقایسه با گروه دریافت کننده واکسن توکسوپلازما کشته شده و فرموله شده در آلوم القا نماید.

واژه های کلیدی: توکسوپلازما گوندی، نانو آلوم، ادجوانت، الایزا، واکسن

مقدمه

توکسوپلازما گوندی (*T. gondii*) عامل بیماری توکسوپلازما سموزیس، یک انگل اجباری داخل سلولی می باشد که علت یکی از رایج ترین عفونت های انگلی در انسان و سایر حیوانات خون گرم است (۱، ۲). سه روش اصلی انتقال بیماری توکسوپلازما سموزیس در انسان، مصرف گوشت خام حاوی کیست های بافتی، خوردن

E-mail: Fasihi.m@gmail.com

مؤلف مسئول: مهدی فصیحی رامندی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

۱. کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و آسیب شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و آسیب شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۶/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۳

غذا و آب آشامیدنی آلوده به اوو سیست مدفوع گربه آلوده و انتقال از مادر به جنین، می باشد (۳، ۴). عفونت در افراد با سیستم ایمنی سالم معمولاً بدون علامت بوده، اما در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و یا نوزادانی که از طریق جفت آلوده می شوند، غالباً تهدید کننده زندگی می باشد. در بیماران مبتلا به اختلال ایمنی، عفونت ممکن است دوباره فعال شود و باعث ایجاد عوارض شدید و کشنده مانند آنسفالیت، میوکاردیت یا پنومونی گردد (۷-۴). در حال حاضر درمان انتخابی برای توکسوپلاسموزیس، ترکیب سینرژستی از پیری متامین و سولفونامید است که به دلیل ماهیت شیمیایی آن ها، این داروها دارای مشکلات و عوارض فراوانی می باشند. یک چالش عمده با توکسوپلاسموزیس این است که تاکنون هیچ واکسن موثری برای آن وجود ندارد (۱، ۶). استراتژی های فراوانی برای توسعه واکسن علیه توکسوپلاسموزیس مورد ارزیابی قرار گرفته است. نسل اول واکسن بر علیه *T. gondii* با انگل های کشته شده، زنده و زنده ضعیف شده ساخته شد (۸). واکسن های کشته شده نمی توانند در مدل های مختلف عفونت موثر باشند، اما واکسن های زنده ضعیف شده می توانند پاسخ سلولی را تحریک کنند تا عفونت های داخل سلولی ناشی از انگل ها را از بین ببرد. اگر چه واکسن های زنده می توانند ایمنی محافظتی را فراهم کنند اما به دلیل خطرناک بودن قابل استفاده برای انسان نیستند. واکسن های زیر واحدی (subunit) و DNA واکسن ها نیز بر علیه این انگل طراحی شده اند. واکسن های زیر واحدی قدرت ایمنی زایی پایینی دارند، لذا برای افزایش توانایی (potency) آن ها، نیاز به ادجوانت مناسب ضروری به نظر می رسد. DNA واکسن ها می توانند پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال علیه توکسوپلاسمای ایجاد نمایند اما این پاسخ ها در انسان ضعیف است (۹، ۱۰). مطالعات نشان می دهد که استفاده از ادجوانت باعث افزایش کارایی واکسن ها می شود، هر چند برخی از ادجوانت های موثر، که باعث التهاب شدید و عوارض

می شوند، غیر قابل قبول می باشند. ادجوانت ها بر پایه آلومینیوم به شدت باعث القاء پاسخ ایمنی $Th2$ می گردند، اما پاسخ ایمنی $Th1$ را به میزان کم یا ناچیز سبب می شود (۱۱). در سال های اخیر، توسعه واکسن های بر پایه نانو ادجوانت ها با کمترین عوارض و بیشترین اثر بخشی در نظر گرفته شده اند (۱۲). با استفاده از نانو مواد، آنتی ژن ها به سلول های ایمنی با دسترسی بیولوژیک بالا، آزاد شدن پایدار و کنترل شده ارائه می شوند. همچنین، ادجوانت ها بر پایه نانو مواد می توانند سیستم ایمنی سلولی و هومورال را تحریک کنند. بنابراین، این ادجوانت ها می تواند پیشنهاد خوبی برای تقویت واکسن ها باشند (۱۳). مطالعات در مورد نانو ذرات آلوم نشان می دهد که این ذرات از قدرت ایمنی زایی بالاتری برخوردار بوده و حتی قادرند ایمنی خوبی تحریک نمایند که این ویژگی می تواند در افزایش کارایی واکسن های توکسوپلاسموزیس موثر باشد. مطالعه در واکسن مدل هاری نشان می دهد که فرم نانو آلوم نسبت به فرم تجاری آلوم در القاء پاسخ حافظتی بسیار موثر تر می باشد (۱۴). با توجه به کارایی بالاتر فرم نانو آلوم در القاء پاسخ ایمنی و همچنین عدم دسترسی به یک واکسن موثر بر علیه عفونت توکسوپلاسموزیس، بررسی واکسن کشته شده توکسوپلاسموزیس در کنار نانو آلوم ضروری به نظر می رسد. بنابراین این مطالعه با هدف ارزیابی کارایی نانو ادجوانت بر پایه آلوم بر ایمنی زایی واکسن کشته شده توکسوپلاسمای در مقایسه با ادجوانت آلوم در مدل موش انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

تهیه نانوذرات هیدروکسید آلومینیوم

در این مطالعه تجربی، جهت تهیه نانوذره آلومینیومی از روش گزارش شده در مطالعه اخیر استفاده گردید (۱۵). حجم برابری از محلول $ALCL3.6OH2O$ با غلظت $3/6 \text{ mg/ml}$ به محلول (M) $NaOH$ (۰/۴) اضافه گردید و سپس در PH 7 به مدت

۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد، محلول به مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت گردید و در نهایت با سانتریفیوژ محلول NaCl حذف شد. پس از تهیه نانو ذره آلومینیومی، جهت تعیین خصوصیات فیزیکی اندازه و بار ذرات با روش Dynamic light scattering (DLS) تعیین خصوصیت شد. همچنین مورفولوژی ظاهری نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) بررسی شد (۱۵).

تکثیر انگل و تهیه واکسن کشته شده

سویه بیماری زای RH انگل *T. gondii* از گروه انگل شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. تاکی زوئیت این سویه از مایع پریتون موش های BALB/c تزریق شده با ارگانیسیم ها به مدت ۳ روز قبل به دست آمد. نمونه دوبار سانتریفیوژ (در ۱۴۰۰ دور در دقیقه) و سپس شسته شد. در مرحله بعد، برای ۲۵ میلی لیتر سوسپانسیون انگل، محلول تریپسین (۱/۱۰۰۰) اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه، ۳ بار سانتریفیوژ و شستشو انجام شد و برای ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون انگل، ۱ میلی لیتر فرمالین ۰/۵ درصد اضافه و پس از ۳۰ دقیقه، ۳ بار سانتریفیوژ و شستشو انجام گردید. سپس تاکی زوئیت ها با رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش شدند و در آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفتند.

فرمولاسیون واکسن

برای فرمولاسیون واکسن، توکسوپلازما کشته شده به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار گرفت و در آلوم و نانو آلوم به عنوان ادجوانت به طور جداگانه فرموله شد. برای فرمولاسیون واکسن، ۱۰ میلیون توکسوپلازما کشته شده در ۲۰۰ میکرو گرم ادجوانت آلوم و نانو آلوم تهیه شد. به طور خلاصه، ۶۰۰ میلیون توکسوپلازما کشته شده به ۱۲ میلی گرم از هر یک از ادجوانت ها در حضور آب جهت تزریق اضافه شد و به مدت یک ساعت مخلوط گردید. پس از مخلوط شدن و فرمولاسیون، بافر فسفات نمکی (PBS) به مخلوط

اضافه شد. همچنین هر ۱۰ میلیون توکسوپلازما کشته شده در ادجوان کامل و ناقص فروند (Sigma, USA) به صورت ۵۰/۵۰ (حجمی/حجمی) تهیه شد و شدیداً مخلوط گردید تا یک سوسپانسیون هموزن به عنوان کاندید واکسن آماده شود. پس از فرمولاسیون نهایی، هر دوز واکسن ۲۰۰ میکرو لیتر در نظر گرفته شد که حاوی ۱۰ میلیون توکسوپلازما کشته شده بوده است.

ایمن سازی موش ها

در این مطالعه از موش های ماده هم نژاد BALB/c (شش تا هشت هفته) استفاده گردید. موش ها به یک هفته قبل از آزمایش، با دسترسی آزاد به غذا و آب قرار گرفتند و در شرایط دوره ای نور/تاریکی (۱۲ ساعت / ۱۲ ساعت) نگهداری شدند. تمام آزمایش ها مطابق پروتکل مراقبت از حیوانات انستیتو پاستور ایران انجام شد. موش ها به پنج گروه ۱۸ تایی تقسیم شدند. گروه های موشی با ۲۰۰ میکرو لیتر از واکسن ادجوانت شده در آلوم، نانو آلوم و یا ادجوانت فروند ایمن شدند. همچنین، ۲۰۰ میکرو لیتر از واکسن کشته شده و فرموله نشده در ادجوانت نیز استفاده شد. برای گروه کنترل، PBS به موش آزمایشگاهی تزریق شد. موش ها سه بار با فواصل دو هفته به صورت زیر جلدی ایمن شدند. ده روز پس از آخرین تزریق، به منظور جمع آوری سرم، خونگیری از موش ها به عمل آمد. سرم های تهیه شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای آزمایش آنتی بادی نگهداری شد.

تهیه سوسپانسیون سلولی طحال

هشت موش از هر گروه برای جدا سازی طحال انتخاب شدند. طحال ها هموزن شده و سوسپانسیون سلول های طحال در PBS سرد حاوی ۲ درصد سرم جنین گوساله (FBS) تهیه گردید. سپس گلبول های قرمز (RBC) با استفاده از محلول لیز RBC حذف شدند. سوسپانسیون سلولی در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس سلول ها به تعداد $10^7 \times 3$ (در هر میلی لیتر) در محیط کشت RPMI

1640 حاوی ۱۰ درصد FBS، ۰/۵ درصد جنتامایسین، ۴ میلی مولار L-گلوتامین، ۱ میلی مولار پیرووات سدیم، ۱ میلی مولار اسید آمینه غیر ضروری و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر استرپتومایسین و پنی سیلین آماده شدند.

تست تکثیر لنفوسیت

تکثیر لنفوسیت‌ها با روش BrdU انجام شد. سوسپانسیون سلول طحال (۱۰۰ میکرو لیتر) با تراکم 3×10^5 سلول، در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت و با ۱۰۰ میکرو لیتر از توکسوپلازما کشته شده (۱/۲ میلیون انگل در هر میلی لیتر، مقدار بهینه شده در آزمایش اولیه) تحریک شد. فیتوهماگلوتنین به عنوان کنترل مثبت (۵ میکرو گرم در میلی لیتر) و محیط کشت تنها به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از این مدت، ۲۰ میکرو لیتر از محلول $10 \times$ BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) به هر چاهک اضافه شد و کشت به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور $300 \times g$ سانتریفیوژ شدند و محلول سوپرناتانت برداشته و پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۰۰ میکرو لیتر از بافر fix/denaturization نفوذ پذیر شدند و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از آنتی بادی anti-BrdU به مدت ۹۰ دقیقه به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها شش بار با PBS شستشو و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول تترامیل بنزیدین (TMB, Sigma, USA) به هر چاهک اضافه و واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انجام شد. در نهایت، ۱۰۰ میکرو لیتر از H_2SO_4 ۲ نرمال به چاهک‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. جذب نوری واکنش در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

الایزا سایتوکاین

برای این منظور، تعداد 3×10^6 سلول طحال در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای بذر پاشی شدند. این سلول‌ها با

۱۰۰ میکرو لیتر از توکسوپلازما کشته شده (۱/۲ میلیون انگل در هر میلی لیتر) تحریک و در انکوباتور حاوی CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. پس از دوره انکوباسیون، پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور $300 \times g$ سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت‌ها جمع آوری گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد برای تجزیه و تحلیل سایتوکاین‌ها نگهداری شدند. الایزا سایتوکاین برای اندازه گیری مقدار IL-4، IL-2، $TNF-\alpha$ و $IFN-\gamma$ با استفاده از کیت‌های الایزا تجاری (Mabtech, Sewden) انجام شد. هر سایتوکاین به صورت pg/ml بر اساس منحنی استاندارد هر یک ارائه شد.

تعیین آنتی بادی‌ها و زیر کلاس‌ها

IgG توتال اختصاصی با روش الایزا غیر مستقیم بهینه‌سازی شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرو لیتر (از استوک ۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر) آنتی ژن لیغات توکسوپلازما در بافر PBS به پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و سپس پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد و پس از آن به مدت یک شب در دمای $4^\circ C$ انکوبه گردید. چاهک‌ها سه بار با بافر PBST (PBS حاوی ۰/۵ درصد Tween 20) شسته و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در بافر مسدود کننده (PBS حاوی ۳ درصد شیر خشک و ۰/۵ درصد Tween 20) قرار گرفتند. پس از انکوباسیون، پلیت‌ها با PBST شسته و ۱۰۰ میکرو لیتر سرم رقیق شده (۱/۲۰ تا ۱/۲۵۶۰) به هر چاهک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند. این پلیت‌ها پنج بار با PBST شستشو و به مدت ۹۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرو لیتر از anti-mouse HRP conjugated (Sigma, USA) (با رقت ۱/۸۰۰۰) انکوباتور شدند. چاهک‌ها شش بار شسته شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرو لیتر از TMB در تاریکی انکوبه گردیدند و در نهایت واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر از H_2SO_4 ۲ نرمال متوقف شد. جذب نوری واکنش در طول موج ۴۵۰ nm

قرائت شد. تشخیص ایزوتایپ‌های IgG2a, IgG1 اختصاصی با استفاده از آنتی‌بادی‌های ثانویه ضد IgG1 و IgG2a بز (Sigma, USA) با پروتکل مشابه انجام شد.

چالش تجربی و میزان بقاء

به منظور مطالعه اثرات محافظتی واکسن مورد آزمایش، موش‌ها به صورت داخل صفاقی با تعداد ۱۰۴ انگل مورد چالش قرار گرفتند و میزان زنده ماندن موشها به صورت روزانه تا پایان مطالعه ثبت شد.

تحلیل آماری

تمام اطلاعات به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ بیان شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار Graph pad PRISM 6.0 (San Diego, CA, USA) و آزمون Mann Whitney استفاده گردید و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تکثیر لنفوسیت

نتایج حاصل از تکثیر لنفوسیت نشان داد که واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده با یا بدون ادجوانت (نانو آلوم، آلوم و کامل فروند)، افزایش تولید لنفوسیت را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P \leq 0/02$). نمودار افزایش تولید لنفوسیت گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. با توجه به نمودار شماره ۱، واکسن فرموله شده با نانو آلوم ۴۰ درصد افزایش تکثیر لنفوسیت را نسبت به واکسن بر پایه آلوم نشان داد، هر چند از لحاظ آماری اختلاف معنی دار نبود ($P = 0/2019$).

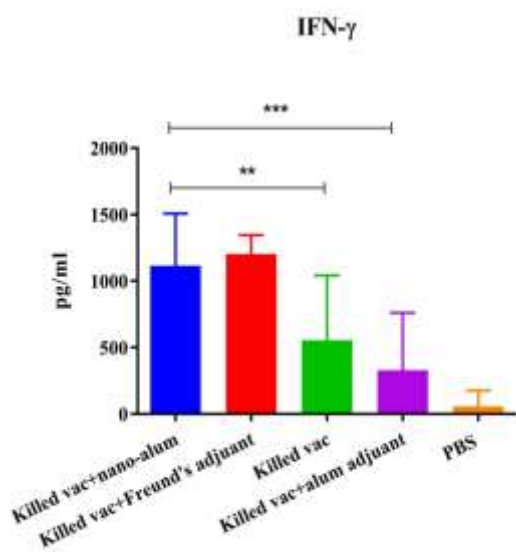
الایزا سایتوکاین های IL-4، IFN-γ و TNF-α

نتیجه آزمایش سایتوکاین IL-4 نشان داد که ایمنی زایی با واکسن توکسوپلازما کشته شده و فرموله شده در ادجوانت های نانو آلوم و آلوم، سبب افزایش

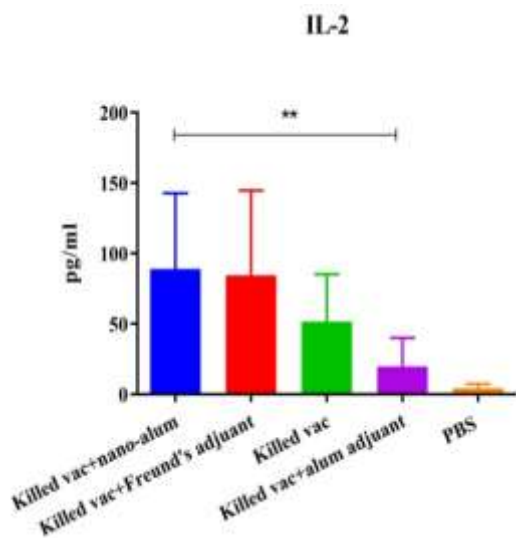
سایتوکاین IL-4 در مقایسه با واکسن کشته شده توکسوپلازما، واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در ادجوانت فروند و همچنین گروه های کنترل شد ($P \leq 0/03$). موش های ایمن شده با واکسن توکسوپلازما کشته شده فرموله شده در آلوم، ترشح IL-4 را در مقایسه با موش هایی که با واکسن کشته شده توکسوپلازما (بدون هیچ ادجوانت) ایمن شده بودند، افزایش داد ($p \leq 0/04$). واکسن کشته شده توکسوپلازما یا واکسن کشته شده توکسوپلازما ادجوانت شده در فروند، پاسخ های IL-4 را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد ($P < 0/003$). همچنین اختلاف معنی داری بین ترشح IL-4 از موش های که با واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در ادجوانت نانو آلوم و آلوم ایمن شده بودند، مشاهده نشد ($P > 0/03$) (نمودار شماره ۲).

نتایج حاصل از سایتوکاین IFN-γ نشان داد که گروه های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در نانو آلوم و فروند افزایش معنی داری از تولید این سایتوکاین را نسبت به گروه های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلازما به تنهایی و فرموله شده در آلوم و گروه های کنترل، نشان دادند ($P \leq 0/01$), هر چند اختلاف معنی داری در پاسخ IFN-γ بین گروه های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در ادجوانت های نانو آلوم و فروند مشاهده نشد ($P > 0/8$). در نمودار شماره ۳، نمودار تولید سایتوکاین IFN-γ در گروه ها نشان داده شده است.

نتایج آزمایش سایتوکاین IL-2 نشان داد که موش های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در ادجوانت های نانو آلوم یا فروند سطح معنی داری از تولید این سایتوکاین را در مقایسه با گروه های کنترل و گروه های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده با و بدون ادجوانت آلوم بیان می کنند ($P < 0/01$). موش های که واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در نانو

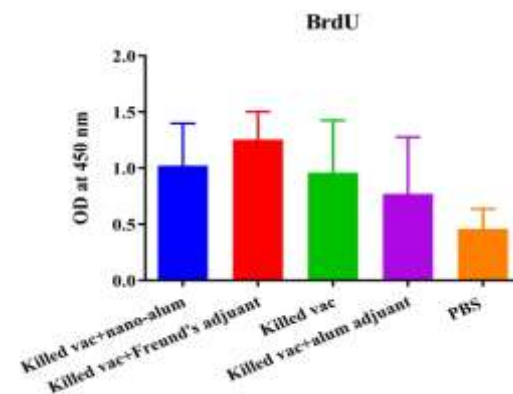


نمودار شماره ۳: نمودار تولید سایتوکاین IFN- γ زمانی که واکسن کشته شده توکسوپلاسما در نانو آلوم و ادجوانت فروند فرموله میشود، می تواند افزایش قابل توجهی در سطح این سایتوکاین در مقایسه با گروه های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما فرموله شده در آلوم، واکسن کشته شده توکسوپلاسما و گروه کنترل نشان دهد ($P \leq 0/01$).

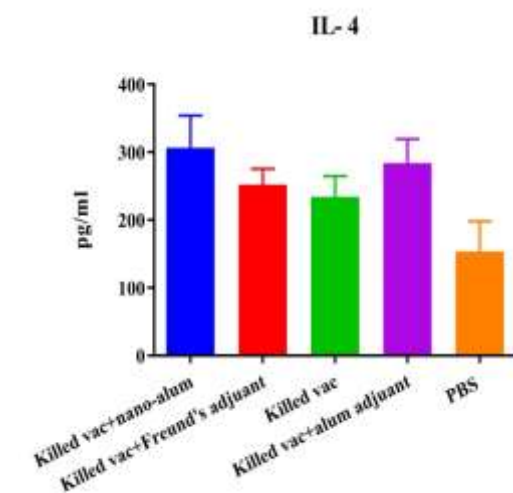


نمودار شماره ۴: نمودار نتایج آزمایش سایتوکاین IL-2، زمانی که کاندید واکسن در ادجوانت نانو آلوم و فروند تهیه می شود، به طور قابل توجهی ترشح این سایتوکاین را در مقایسه با گروه های کنترل و گروه های که کاندید واکسن را با یا بدون ادجوانت آلوم دریافت کرده اند، افزایش داد ($P < 0/01$).

آلوم را دریافت کردند، پاسخ IL-2 بالاتری را نسبت به موش های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلاسما فرموله شده در ادجوانت فروند نشان دادند، هر چند اختلاف معنی داری بین پاسخ IL-2 آن ها مشاهده نشد ($P > 0/8$) (نمودار شماره ۴).

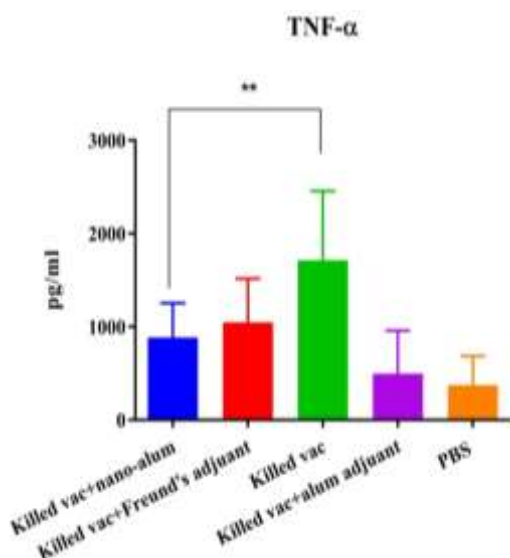


نمودار شماره ۱: نمودار آزمون تکثیر لنفوسیت در گروه های تجربی، کاندید واکسن فرموله شده در نانو آلوم ۴۰ درصد تکثیر لنفوسیت را نسبت به کاندید واکسن بر پایه آلوم افزایش داد هر چند از لحاظ آماری اختلاف معنی دار نبوده است ($P = 0/2019$).

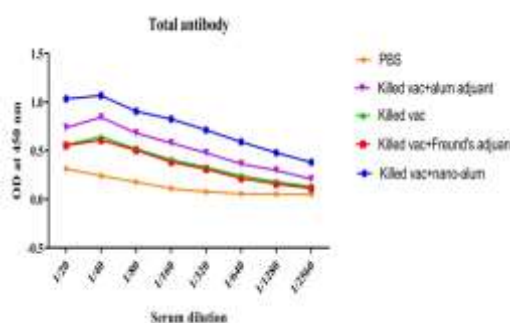


نمودار شماره ۲: نمودار نتایج سایتوکاین IL-4، گروه های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما که با نانو آلوم و آلوم فرموله شده بودند، سطح این سایتوکاین را در مقایسه با سایر گروه های تجربی افزایش دادند ($P \leq 0/03$).

گروه دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلاسما حاوی ادجوانت آلوم افزایش یافت ($P=0/0293$). در نمودار شماره ۷، نمودار پاسخ ایزوتایپ های IgG2a و IgG1 اختصاصی در گروه ها بیان شده است.



نمودار شماره ۵: نمودار نتیجه سایتوکاین TNF-α، موش های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما افزایش معنی داری در ترشح این سایتوکاین در مقایسه با سایر گروه های تجربی نشان دادند ($P<0/04$).



نمودار شماره ۶: نمودار نتایج حاصل از IgG توتال اختصاصی، موش های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما که در نانو آلوم ادجوانت شده بودند (رقت های ۱/۲۰ تا ۱/۲۵۶۰)، افزایشی را در سطح این آنتی بادی نشان دادند که تفاوت معنی داری را نسبت به گروه های ایمنی شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما با یا بدون آلوم، ادجوانت فروند گروه کنترل نشان داد ($P<0/001$).

نتایج حاصل از سایتوکاین TNF-α نشان داد که گروه دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلاسما افزایش قابل توجهی در ترشح سایتوکاین TNF-α در مقایسه با سایر گروه های تجربی داشته است ($P<0/04$). موش های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما ادجوانت شده در نانو آلوم و فروند سطح بالاتری از تولید این سایتوکاین را در مقایسه با گروه های کنترل و گروه دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلاسما فرموله شده در آلوم نشان دادند، هر چند اختلاف معنی داری بین پاسخ TNF-α در این دو گروه مشاهده نشد ($P>0/05$) (نمودار شماره ۵).

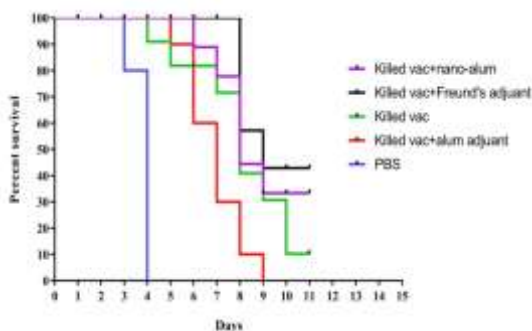
پاسخ ایمنی هومورال

این مطالعه نشان داد که موش های واکسینه شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما فرموله شده در ادجوانت نانو آلوم (رقت های ۱/۲۰ تا ۱/۲۵۶۰)، می توانند سطح بالایی از آنتی بادی های اختصاصی توتال IgG را در مقایسه با گروه های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلاسما فرموله شده با ادجوانت آلوم یا بدون آلوم، فروند و گروه های کنترل القاء نمایند ($P<0/001$) (نمودار شماره ۶).

ایزوتایپ های IgG2a و IgG1 اختصاصی

پاسخ های ایزوتایپ IgG1 نشان داد که ایمن زایی با واکسن کشته شده توکسوپلاسما حاوی ادجوانت نانو آلوم باعث افزایش سطح IgG1 در مقایسه با سایر گروه های آزمایش شد و این افزایش از نظر آماری معنی دار بوده است ($P<0/0001$)، اما پاسخ های ایزوتایپ IgG2a نشان داد که اختلاف معنی داری بین موش های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما با یا بدون ادجوانت (نانو آلوم، آلوم و فروند) در مقایسه با گروه کنترل ($P<0/05$) وجود نداشت. همچنین پاسخ ایزوتایپ IgG2a در موش های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلاسما حاوی ادجوانت فروند به طور معنی داری در مقایسه با

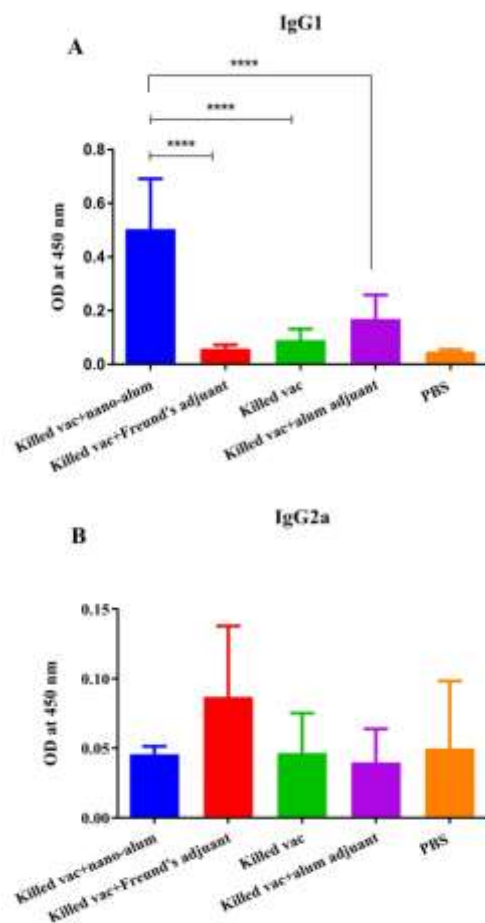
به تنهایی و به صورت فرموله شده در ادجوانت نانو آلوم به ترتیب ۳۳ و ۱۰ درصد مشاهده شد. درصد بقاء موش ها در روز ۹ مطالعه در گروه ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلازما حاوی ادجوانت آلوم ۰ درصد گزارش شد، در حالی که تمام موش های گروه PBS طی ۴ روز اول مردند. نمودار میزان بقاء پس از حدود ۲ هفته در تصویر شماره ۸ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۸: نتایج میزان بقاء پس از حدود ۲ هفته، ایمن زایی با واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در ادجوانت فروند میزان بقاء را در مقایسه با سایر گروه های تجربی افزایش داد (۴۲/۸۵ درصد). درصد بقاء موش ها در روز ۹ مطالعه در گروه ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلازما حاوی ادجوانت آلوم ۰ درصد گزارش شد، در حالی که تمام موش های گروه PBS طی ۴ روز اول مردند.

بحث

توکسوپلازما گوندی یک انگل رایج بین انسان و حیوانات بوده و یک پاتوژن مهم برای انسان محسوب می گردد (۱۶،۳). تاکنون، واکسن های طراحی شده قادر به ایجاد ایمنی حفاظتی علیه این انگل نبودند (۱۷). در سال های اخیر، نانو ذرات به طور فزاینده ای برای واکسن های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته اند و در مقایسه با سیستم های واکسیناسیون سنتی، واکسن های ساخته شده از نانو مواد می توانند از مزایای بسیاری، از جمله تحریک دقیق پاسخ ایمنی، هدف گیری موثر بافت ها یا سلول های خاص و سازگاری زیستی برخوردار باشند (۱۹،۱۸). با توجه به این واقعیت، در این مطالعه اثر



نمودار شماره ۷: A: نمودار پاسخ ایزوتایپ IgG1، ایمن زایی موش ها با واکسن کشته شده توکسوپلازما که در نانو آلوم فرموله می شود، می تواند سطح این ایزوتایپ را در مقایسه با سایر گروه های مورد آزمایش افزایش دهد ($P < 0.0001$). B: نمودار پاسخ ایزوتایپ IgG2a، بین موش هایی ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلازما با یا بدون ادجوانت (نانو آلوم، آلوم و فروند) و گروه کنترل تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0.05$), همچنین پاسخ ایزوتایپ IgG2a در موش های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلازما که در ادجوانت فروند تهیه شده بود نسبت به موش های ایمن شده با واکسن کشته شده توکسوپلازما در همراهی با ادجوانت آلوم به طور معنی داری افزایش نشان داد ($P = 0.0293$).

مطالعه بقاء

نتایج میزان بقاء پس از حدود ۲ هفته نشان داد که ایمن زایی با واکسن کشته شده توکسوپلازما فرموله شده در ادجوانت فروند میزان بقاء را در مقایسه با سایر گروه های تجربی افزایش داد (۴۲/۸۵ درصد). میزان بقاء در گروه های دریافت کننده واکسن کشته شده توکسوپلازما

ادجوانتی نانو آلوم فرموله شده در واکسن کشته شده توکسوپلاسما بر پاسخ ایمنی هومورال و سلولی در موش BALB/c مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که ایمنی زایی با واکسن کشته شده توکسوپلاسما فرموله شده با یا بدون ادجوانت (نانو آلوم، آلوم، فروند) می تواند پاسخ های تکثیر لنفوسیتی را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که ایمن زایی موش ها با واکسن کشته شده به تنهایی و همچنین با ادجوانت های نانو آلوم و فروند، سطح قابل توجهی از سایتوکاین IFN- γ را در مقایسه با واکسن کشته شده حاوی ادجوانت آلوم و گروه کنترل افزایش می دهد. مطالعات نشان می دهد که IFN- γ به عنوان یک سایتوکاین اصلی در از بین بردن عفونت *T. gondii* عمل می کند، که باعث افزایش مکانیسم های درون سلولی مانند افزایش iNOS و مرگ انگل های درون سلولی می شود (۲۲-۲۰). نتایج مطالعات قبلی نشان داد که موش های فاقد IFN- γ یا IL-12 (knockout) قادر به حذف عفونت نیستند، که نشان دهنده عدم توانایی موش ها در کنترل بار انگلی می باشد (۲۵-۲۳). همچنین اثرات حفاظتی واکسن های زیر واحدی GABA2 و GRA5 در برابر توکسوپلاسموزیس حاد نشان داد که ارتباط معنی داری بین افزایش قابل ملاحظه IFN- γ و بقاء موش های آلوده به *T. gondii* وجود دارد (۲۶). در مطالعه سانچز و همکاران نشان داده شد، زمانی که پروتئین های ROP2 و GRA4 با CPG-oligodeoxynucleotides ادجوانت می شوند، سطح بالایی از IFN- γ و میزان بقاء موش ها در هر دو فرمول واکسن در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می شود (۲۷). به نظر می رسد که افزایش سطح IFN- γ برای حذف توکسوپلاسما موثر و حیاتی است. نتایج حاصل از سایتوکاین IL-4 به عنوان الگوی پاسخ ایمنی Th2 نشان داد که ادجوانت نانو آلوم و آلوم فرموله شده در واکسن کشته شده توکسوپلاسما می تواند تولید این سایتوکاین را افزایش دهد. مطالعه اخیر نشان داد که

ایمنی زایی موش های BALB/c با پروتئین Rhoptyr1 توکسوپلاسما گندی می تواند منجر به تولید سطح بالایی از سایتوکاین های IFN- γ و IL-4 در گروه دریافت کننده این کاندید واکسن شود (۲۸). IL-2 توسط سلول های CD4⁺ T تولید می شود که عامل مهمی برای رشد طیف گسترده ای از لوکوسیت ها، از جمله سلول های T و NK است و نقش حفاظتی در مدل های موشی توکسوپلاسموزیس ایفا می کند (۲۹، ۳۰). این مطالعه نشان داد گروهی از موش ها که کاندید واکسن را همراه با نانو آلوم و فروند دریافت کرده اند، در القاء این سایتوکاین بسیار موثر هستند. گزارش قبلی نشان داد که تزریق IL-2 نو ترکیب می تواند منجر به بقای طولانی مدت و کاهش کیست انگلی در مغز شود و همچنین فعالیت کشندگی ماکروفاژ ها و سلول های NK را در برابر توکسوپلاسما در مدل توکسوپلاسموزیس موشی افزایش می دهد (۳۳-۳۱).

TNF- α با افزایش فعال سازی ماکروفاژ ها، همچنین افزایش بیان IFN- γ و iNOS نقش مهمی در مبارزه با توکسوپلاسموزیس ایفا می کند (۳۴). نتایج TNF- α نشان داد که واکسن کشته شده بدون ادجوانت می تواند این سایتوکاین را به میزان قابل توجهی افزایش دهد، به طوری که مطالعات نشان دادند که موش های فاقد این سایتوکاین، در کنترل بار انگل ناتوان هستند (۳۵، ۳۶). در مطالعه قبلی که اثرات حفاظتی پروتئین ESA در ترکیب با ادجوانت آلوم بر علیه *T. gondii* در مدل موشی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد، گروه دریافت کننده ESA فرموله شده در آلوم و گروه عفونت مزمن افزایش قابل توجهی در سطح TNF- α نسبت به گروه کنترل سالم بیان می کنند (۳۷).

نتایج آنتی بادی نشان داد که واکسن کشته شده توکسوپلاسما فرموله شده در ادجوانت نانو آلوم به طور قابل توجهی پاسخ آنتی بادی توتال را افزایش می دهد. همچنین نتایج نشان داد زمانی که واکسن کشته شده

بنابراین، الگوی سایتوکاین و نسبت آن می تواند یک پارامتر دقیق تر برای توصیف نوع پاسخ ایمنی القا شده باشد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، نانو آلوم برای القاء پاسخ ایمنی هومورال و سلولی در مقایسه با ادجوانت آلوم و فروند مؤثرتر است. بنابراین، این ادجوانت می تواند یک جایگزین عالی برای فرمولاسیون واکسن بر پایه آلوم باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و آسیب شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران انجام پذیرفت، لذا از تمامی کسانی که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

References

- Assolini JP, Concato VM, Goncalves MD, Carloto ACM, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, et al. *Parasitol Res* 2017; 116(6): 1603-1615.
- Robert-Gangneux F, Darde ML. *Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev* 2012; 25(2): 264-296.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect* .2002; 8(10): 634-640.
- Verma R, Khanna P. *Development of Toxoplasma gondii vaccine: A global challenge. Hum Vaccin Immunother* 2013; 9(2): 291-293.
- Eza DE, Lucas SB. *Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. HIV Med* .2006; 7(6): 415-420.
- Georgiev VS. *Management of toxoplasmosis. Drugs*. 1994; 48(2): 179-188.
- Rahimi MT, Sarvi S, Sharif M, Abediankenari S, Ahmadvour E, Valadan R, et al. *Immunological evaluation of a DNA cocktail vaccine with co-delivery of calcium phosphate nanoparticles (CaPNs) against the Toxoplasma gondii RH strain in BALB/c mice. Parasitol Res* 2017; 116(2): 609-616.
- Garcia JL. *Vaccination concepts against Toxoplasma gondii. Expert Rev Vaccines* 2009; 8(2): 215-225.
- Liu Q, Singla LD, Zhou H. *Vaccines against Toxoplasma gondii: status, challenges and future directions. Hum Vaccin Immunother*. 2012; 8(9): 1305-1308.
- Taweean W. *Vaccination Against Toxoplasmosis: Immune Responses in Mice Immunised with a Recombinant Toxoplasma Gondii Antigen. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences*; 2004.
- Sun B, Ji Z, Xia T. *Aluminum-Based Nano-adjuvants. Dordrecht, Springer*; 2016.
- El Temsahy MM, El Kerdany ED, Eissa MM, Shalaby TI, Talaat IM, Mogahed NM.

- The effect of chitosan nanospheres on the immunogenicity of Toxoplasma lysate vaccine in mice. *J Parasit Dis* 2016; 40(3): 611-626.
13. Zhu M, Wang R, Nie G. Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(9): 2761-2774.
 14. Shi W, Kou Y, Xiao J, Zhang L, Gao F, Kong W, et al. Comparison of immunogenicity, efficacy and transcriptome changes of inactivated rabies virus vaccine with different adjuvants. *Vaccine* 2018; 36(33): 5020-5029.
 15. Amini Y, Moradi B, Fasihi-Ramandi M. Aluminum hydroxide nanoparticles show strong activity to stimulate Th-1 immune response against tuberculosis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017; 45(7): 1331-1335.
 16. Wyrosdick HM, Schaefer JJ. Toxoplasma gondii: history and diagnostic test development. *Anim Health Res Rev*. 2015; 16(2): 150-162.
 17. Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Forster-Waldl E, Petersen E. Vaccines against Toxoplasma gondii: challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(2): 252-266.
 18. Ducournau C, Nguyen TT, Carpentier R, Lantier I, Germon S, Precausta F, et al. Synthetic parasites: a successful mucosal nanoparticle vaccine against Toxoplasma congenital infection in mice. *Future Microbiol* 2017; 12: 393-405.
 19. Carabineiro SAC. Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines. *Molecules* 2017; 22(5): E857.
 20. Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for Toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 1990; 144(7): 2725-2729.
 21. Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(3): 908-912.
 22. Taylor GA, Collazo CM, Yap GS, Nguyen K, Gregorio TA, Taylor LS, et al. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(2): 751-755.
 23. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii. *J Immunol* 1994; 153(6): 2533-2543.
 24. Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1994; 62(7): 2818-2824.
 25. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii. *Science* 1988; 240(4851): 516-518.
 26. Ching XT, Fong MY, Lau YL. Evaluation of Immunoprotection Conferred by the Subunit Vaccines of GRA2 and GRA5 against Acute Toxoplasmosis in BALB/c Mice. *Front Microbiol* 2016; 7: 609.
 27. Sánchez VR, Pitkowski MN, Fernández Cuppari AV, Rodríguez FM, Fenoy IM, Frank FM, et al. Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against Toxoplasma gondii infection. *Exp Parasitol* 2011; 128(4): 448-453.

28. Sonaimuthu P, Ching XT, Fong MY, Kalyanasundaram R, Lau YL. Induction of Protective Immunity against Toxoplasmosis in BALB/c Mice Vaccinated with Toxoplasma gondii Rhoptry-1. *Front Microbiol* 2016; 7: 808.
29. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(7): 480-490.
30. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(8): 595-601.
31. Denkers EY, Scharton-Kersten T, Barbieri S, Caspar P, Sher A. A role for CD4+ NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp Med* 1996; 184(1): 131-139.
32. Sharma SD, Hofflin JM, Remington JS. In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with Toxoplasma gondii. *J Immunol* 1985; 135(6): 4160-4163.
33. Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse Toxoplasma gondii-infected cells. *J Immunol* 1991; 147(11): 3955-3959.
34. Chang HR, Grau GE, Pechere JC. Role of TNF and IL-1 in infections with Toxoplasma gondii. *Immunology* 1990; 69(1): 33-37.
35. Gazzinelli RT, Eltoun I, Wynn TA, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J Immunol* 1993; 151(7): 3672-3681.
36. Reichmann G, Walker W, Villegas EN, Craig L, Cai G, Alexander J, et al. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. *Infect Immun* 2000; 68(3): 1312-1318.
37. Costa-Silva TA, Borges MM, Galhardo CS, Pereira-Chioccola VL. Immunization with excreted/secreted proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against Toxoplasma gondii infection. *Acta Tropica* 2012; 124(3): 203-209.
38. Hazrati Tappeh K, Khorshidvand Z, Shahabi S, Hajipirloo H. A Novel Adjuvant, Mixture of Alum And Naltrexone, Elicits Humoral Immune Responses for excreted/secreted Antigens of Toxoplasma gondii Tachyzoites Vaccine In Balb/c Murine Model. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2013; 37(2): 92-96.