ORIGINAL ARTICLE

Effect of interleukin-22 on immunogenicity of DNA vaccine encoding TSA gene of Leishmania major in BALB/c mice

Hajar Ziaei-Hezarjaribi[1],
Fatemeh Ghaffarifar[2],
Abdolhossein Dalimi-Asl[2],
Zohreh Sharifi[3],
Oghol Niaz-Jorjani[4]

[1] PhD, Assistant Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD, Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] PhD, Professor, Department of Virology, Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran
[4] PhD, Assistant Professor, Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

(Received July 21, 2013; Accepted December 26, 2013)

Abstract

Background and purpose: Previous Research shows the use of plasmids containing genes TSA to be useful as vaccines for Leishmania major. Recently, the role of interleukin-22 (IL-22) in tissue repair has been demonstrated. In this research, the effect of IL-22 on encoding TSA gene of Leishmania major in BALB/c mice was assessed.

Materials and methods: pcDNA3 plasmid containing the gene encoding TSA protein (pcTSA) of Leishmania major, along with the cytokine IL-22 was used. 60 BALB/c mice were divided to 4 groups of 15. Control groups received pcDNA3 and PBS and a group was vaccinated intramuscularly with the TSA gene containing plasmid. Fourth group received plasmid containing the gene for the TSA and IL-22 protein. IL-4 and interferon gamma (IFN-γ) levels (MTT test) were used to evaluate the cellular immunity and IgG2a, IgG1 and Total IgG levels [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method] to evaluate the humoral immunity. Measuring the diameter of the lesions and the age and weight of the mice was performed.

Results: The simultaneous use of plasmid containing the gene encoding protein TSA and IL-22 significantly increased the mean level of IFN-γ and reduced the mean level of IL-4 compared to the other groups. While the mortality rate at 27th week after intervention was 100 % in the control group, the surveillance rates of pcTSA and pcTSA + IL-22 groups were 80%. pcTSA + IL-22 group had the highest weight in 30th week. pcTSA + IL-22 group had significantly smaller lesions compared to control and pcTSA groups.

Conclusion: Results show the efficacy of pcTSA + IL-22 in improving the vaccination of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Interleukin-22, TSA gene, Leishmania major, BALB/c mice

J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(110): 25-36 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۱۰ اسفند سال ۱۳۹۲ (۳۶-۲۵)

بررسی اثر اینترلوکین-۲۲ در افزایش ایمنی‌زایی DNA واکسن کد کننده ژن TSA لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

هاجر ضیایی هزار جریبی[۱]
فاطمه غفاری‌فر[۲]
عبدالحسین دلیمی اصل[۲]
زهره شریفی[۳]
اوغل نیاز جرجانی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات قبلی، پلاسمید حاوی ژن TSA (Thiol-specific antioxidant) را به عنوان واکسن مفید در لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور پیشنهاد داده بود. به تازگی نقش اینترلوکین-۲۲ (IL۲۲) در ترمیم بافت ثابت شده است. در این تحقیق اثر سیتوکین IL۲۲ به همراه پلاسمید کد کننده پروتئین TSA لیشمانیا ماژور در موش BALB/c بررسی شد.

مواد و روش‌ها: از پلاسمید نوترکیب pcDNA۳ حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA (pcTSA) لیشمانیا ماژور، همراه با سیتوکین IL۲۲ استفاده شد. ۶۰ سر موش ماده BALB/c به ۴ گروه ۱۵تایی تقسیم شدند. گروه‌های شاهد PBS و pcDNA۳ دریافت کردند و یک گروه از موش‌ها در سه نوبت با پلاسمید حاوی ژن TSA به صورت IM (Intramuscular) واکسینه شدند. گروه چهارم موش‌ها علاوه بر پلاسمید حاوی ژن TSA، پروتئین IL۲۲ را نیز دریافت نمودند. سنجش ایمنی سلولار با اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL۴ و گاما‌اینترفرون و تست MTT و بررسی ایمنی هومورال با اندازه‌گیری IgG۱، IgG۲a و IgG total با روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) انجام گرفت. اندازه‌گیری قطر زخم، طول عمر و وزن موش‌ها نیز انجام شد.

یافته‌ها: استفاده توأم از پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA همراه با IL۲۲ به صورت معنی‌داری باعث افزایش میانگین گاما‌اینترفرون و کاهش میانگین IL-۴ نسبت به سایر گروه‌ها شد؛ در حالی که میزان مرگ و میر در هفته ۲۷ بعد از چالش برای گروه‌های شاهد ۱۰۰ درصد و میزان بقا برای گروه‌های pcTSA + IL۲۲ و pcTSA به میزان ۸۰ درصد بود. گروه pcTSA + IL۲۲ بالاترین وزن را در هفته ۳۰ داشت. pcTSA + IL۲۲ با داشتن زخم کوچک‌تر نسبت به pcTSA و گروه‌های شاهد دارای اختلاف معنی‌داری با گروه‌های فوق بود.

استنتاج: نتایج به دست آمده کارایی pcTSA توأم با IL۲۲ را در بهبود اثر واکسیناسیون لیشمانیوز جلدی نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: اینترلوکین-۲۲، ژن کد کننده پروتئین TSA، لیشمانیا ماژور، موش BALB/c

مقدمه

لیشمانیوزیس (Leishmaniasis) یکی از بیماری‌های تک یاخته‌ای مشترک میان انسان و دام است که به اشکال جلدی، جلدی مخاطی و احشایی دیده می شود. شکل روستایی این بیماری در دنیا رو به افزایش می‌باشد و درمان قطعی هم برای آن وجود ندارد و گزارش‌های متعددی در خصوص عود، عدم بهبودی و تأثیر نامناسب درمان وجود دارد (۲، ۱). تحقیقات اخیر نشان داده است که ادجوانت‌ها (Adjuvant) و سیتوکین‌ها نقش مهمی در توسعه ساخت واکسن‌های لیشمانیا دارند (۷-۳).

TSA (Thiol-specific antioxidant) آنتی‌ژن

مولف مسئول: هاجر ضیایی هزار جریبی- ساری: میدان خزر، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص). E-mail: ziaei2000@yahoo.com

۱. استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استاد، گروه ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۶/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۰/۵

ایمونوژنیک قوی در هر دو مرحله پروماستیگوت و آماستیگوت انگل لیشمانیا می‌باشد. این پروتئین ۲۲/۱ کیلو دالتون است و طول آن ۶۰۰ جفت باز (Base pairs یا BP) و ۲۰۰ اسید آمینه دارد و در کروموزوم ۱۵ قرار گرفته است. ژن کد کننده پروتئین TSA هیچ اینترونی ندارد و کپی‌های زیادی از این ژن در همه گونه‌ها و انواع لیشمانیا جدا می‌شود و حداقل سه کپی از ژن در ژنوم لیشمانیا ماژور وجود دارد (۹، ۸). پروتئین TSA لیشمانیا در هر دو سیستم انسانی و موشی، آنتی‌ژنیک است. این آنتی‌ژن ایمنی ویژه و بالایی بر علیه تعداد زیادی اپی‌توپ‌های (Epitope) انگل تولید می‌کند.

TSA یکی از کاندیداهای اصلی واکسن می‌باشد که تولید بالایی در لیشمانیا دارد و همچنین تیتر بالایی از IgG۲a، IGG۱ و پاسخ‌های مشخص از TH۱، گامااینترفرون (IFN-γ) و IL-۲ CTL (CD۸+) را القا می‌کند (۱۰، ۶). این پروتئین هر دو کلاس پاسخ‌های ایمنی را القا کرده، در نتیجه پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار را به خوبی بر علیه بیماری و در جهت کنترل آن تحریک می‌کند. پروتئین مذکور در مقایسه با پروتئین‌های دیگر حفاظت کامل‌تری ایجاد می‌کند و به عنوان یک پروتئین بااهمیت برای ایجاد توسعه مقاومت اکتسابی بر علیه لیشمانیازیس مطرح است (۱۲، ۱۱).

تحقیقاتی روی واکسن پروتئینی نوترکیب TSA لیشمانیا ماژور همراه با اینترلوکین ۱۲ به عنوان ادجوانت انجام شده است (۱۴، ۱۳). نتایج این تحقیق نشان دهنده توسعه پاسخ‌های ایمنی سلولی قوی و محافظتی بر علیه لیشمانیوزیس بود. در تحقیق دیگری پروماستیگوت‌های با حرارت کشته شده لیشمانیا همراه با اینترلوکین ۱۲ و آلوم به عنوان واکسن به کار برده شد. گره‌ای در محل واکسن فوق مشاهده شد. دوام این گره‌ها از زمانی که از دو پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین LmSTI۱ و TSA همراه با اینترلوکین ۱۲ استفاده شد، بیشتر بود. مطالعات بیشتر روی انگل‌های کشته شده با حرارت (به ویژه آنتی‌ژن‌ها) به طور کامل انجام شد که دوام و بقای گره به مقدار آنتی‌ژن به کار برده شده به عنوان واکسن بستگی دارد (۱۶، ۱۵).

تحقیقاتی بر روی ژن‌های LACK، LmSTI۱ و TSA همراه با هم به عنوان DNA Vaccine انجام شد و نتایج آن با واکسنی به صورت پروماستیگوت‌های کشته شده همراه با اینترلوکین ۱۲ که در سال ۱۹۹۹ توسط محققین کشف شد، مقایسه گردید. نتایج نشان داد که حفاظت ایجاد شده در DNA Vaccine طولانی‌تر بود (۱۷). با این حال TSA تاکنون ایمنی صددرصد بر علیه لیشمانیا ایجاد نکرده است.

اینترلوکین ۲۲ (IL۲۲) یک سیتوکین عضو خانواده IL-۱۰ است که توسط سلول‌های Th۱، Th۱۷، Th۲۲، Dendriticcells و NK (Natural killer) تولید می‌شود و سایر اعضای این خانواده سیتوکینی شامل IL-۱۰، IL-۱۹، IL-۲۰، IL-۲۴) MDA۷، (TIF) IL، IL۲۲ و IL-۲۶ می‌باشند (۱۸). گرچه اعضای این خانواده مشترکات ساختمانی بسیار زیادی دارند، اما از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمنولوژیک تفاوت‌های فاحشی بین آن‌ها وجود دارد.

IL۲۲ از معدود سیتوکین‌هایی است که وجودش حتی در غیر از پستانداران مانند ماهی‌ها به اثبات رسیده است (۲۰، ۱۹). IL۲۲ باعث فعال‌سازی JAK۱، TYK۲، STAT۱، STAT۳، STAT۵ و مسیر MAP (Mitogen-activated protein) کیناز می‌شود (۲۱، ۱۹، ۱۸). امروزه ثابت شده است که سلول‌های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سیتوکین هستند (۲۳، ۲۲). IL۲۲ در پوست سبب القای پپتیدهای ضد میکروبی شده، تکثیر کراتینوسیت‌ها را افزایش و تمایز آن‌ها را مهار می‌کند و نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد (۲۳). IL۲۲ تولید شده به وسیله سلول‌های NK با فعال کردن ماکروفاژها و افزایش فعالیت فاگولیزوم، رشد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را مهار می‌کند (۲۴).

مطالعه‌ای در یک منطقه بومی نشان داد که میزان سیتوکین IL۲۲ افراد مقاوم به کالاآزار انسانی نسبت به افراد حساس بالاتر است. از طرفی انگل لیشمانیا دونووانی (Leishmania donovani) تمایز سلول‌های Th-۱۷ را برای تولید IL۲۲ و گامااینترفرون تحریک می‌کند (۲۲). با توجه به این‌که گزارش‌های متعددی در خصوص عود، عدم بهبودی و تأثیر نامناسب درمان لیشمانیوز وجود دارد و به تازگی نیز نقش IL۲۲ به عنوان یک سیتوکین در پاسخ‌های التهابی و ایجاد

حفاظت در ایمنی ذاتی و کنترل عفونت‌های مختلف و هموستازی و بهبود سلول‌های اپی‌تلیال صدمه دیده ثابت شده است؛ بنابراین هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر سیتوکین IL۲۲ همراه با پلاسمید کد کننده پروتئین TSA لیشمانیا ماژور در درمان لیشمانیوز جلدی در موش‌های Balb/c بود.

مواد و روش‌ها

پلاسمید

پلاسمید نوترکیب بیانی pcDNA۳ حاوی ژن TSA با طول ۶۰۰ جفت باز که پروتئین نوترکیب TSA با وزن مولکولی در حدود ۲۲/۱ کیلودالتون تولید می‌کند، در بخش انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس ساخته و بیان آن توسط طباطبایی و همکاران (۲۵) و فاطمه و همکاران (۲۶) ارزیابی شد، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. کشت اولیه و انبوه پلاسمید حاوی ژن TSA و پلاسمید pcDNA۳ در باکتری TG۱ با استفاده از محیط کشت L.B Broth شرکت Merck انجام شد. در مرحله بعد استخراج پلاسمید با استفاده از کیت EndoFree Plasmid Mega Kit شرکت کیاژن انجام گرفت. سپس غلظت پلاسمیدهای استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد و رقت‌سازی بر اساس میزان تزریق ۵۰ میکروگرم به ۱۵ سر موش انجام گرفت.

آماده‌سازی موش‌ها

۶۰ سر موش سفید ماده خالص Balb/c inbred به دلیل حساس بودن به پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در سن ۸ هفتگی از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی حصارک کرج به عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی در این تحقیق انتخاب و خریداری و تحت شرایط استاندارد از لحاظ آب و غذا نگهداری شدند. گروه‌بندی موش‌ها بر اساس نوع ماده تزریقی انجام گرفت. ۶۰ موش ماده Balb/c به ۴ گروه ۱۵تایی تقسیم شدند که شامل گروه‌های دریافت کننده pcDNA۳ و PBS (Phosphate buffered saline) به عنوان گروه‌های شاهد و یک گروه با ۱۵ موش دریافت کننده pcTSA و یک گروه هم شامل ۱۵ موش دریافت کننده pcTSA + IL۲۲ بودند. در هر یک از گروه‌ها نیز موش‌ها به سه دسته ۵تایی تقسیم شدند.

یک دسته ۵تایی فقط واکسینه می‌شدند، بدون این‌که به انگل آلوده شوند و دسته دوم و سوم بعد از واکسینه شدن با انگل چالش می‌شدند. سنجش ایمنی سلولار و هومورال در گروه‌های شاهد و ایمن شده در دسته‌های اول و دوم صورت گرفت و بررسی‌های بالینی در موش‌های دسته سوم انجام شد.

ایمنی‌زایی (واکسیناسیون)

در این مطالعه جهت واکسیناسیون یک گروه ۱۵تایی از موش‌ها، بافر PBS را (۱۰۰ میکرولیتر) و گروه دیگر پلاسمید pcDNA۳ را به عنوان گروه شاهد (با غلظت ۵۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر) و ۳۰ موش دیگر پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA را به میزان ۵۰ میکروگرم در حجم ۱۰۰ میکرولیتر (رقیق شده با PBS) و در سه نوبت به فاصله سه هفته دریافت نمودند. به یک گروه ۱۵تایی از موش‌های دریافت کننده پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA، سیتوکین IL۲۲ که از شرکت R&D با Cat.number 582-ML بر اساس دستور پروتکل شرکت سازنده در PBS استریل حاوی ۱ درصد از BSA آماده شده بود، قبل از چالش موش‌ها با انگل لیشمانیا به میزان ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر به صورت تک دوز در عضله چهار سرران (Quadriceps) در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سرنگ انسولین با سر سوزن اندازه ۳۰ (Gauge۳۰) تزریق گردید (۲۷).

چالش

۳ هفته بعد از آخرین ایمنی‌زایی، آلوده‌سازی موش‌های Balb/c با انگل لیشمانیا ماژور صورت گرفت و موش‌ها با تعداد حداقل ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور (L.major) سویه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا (Stationary) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از طریق تلقیح زیرجلدی در قاعده دم چالش شدند که بعد از ۴-۳ هفته بعد از تزریق در لمس ناحیه تزریق برجستگی و گره احساس شد و سپس زخم حاصل از رشد انگل در قاعده دم موش تشکیل گردید.

بررسی ایمنی هومورال

برای بررسی ایمنی هومورال، خون‌گیری از موش‌ها در سه نوبت انجام شد. خون‌گیری اول سه هفته پس از واکسیناسیون دوم و خون‌گیری دوم سه هفته پس از واکسیناسیون سوم و خون‌گیری سوم ۷ هفته پس از چالش با انگل، به کمک لوله‌های مویینه غیر هپارینه از گوشه چشم موش‌ها انجام شد. سرم خون موش‌ها برای بررسی ایمنی هومورال، جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بررسی ایمنی هومورال بر روی سرم موش‌های ایمن شده و گروه‌های شاهد با اندازه‌گیری مقدار مجموع IgG با استفاده از آزمایش ELISA انجام شد. علاوه بر این، زیرگروه‌های آنتی‌بادی شامل IgG۱ و IgG۲a نیز با استفاده از کیت Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents شرکت Sigma مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی ایمنی سلولی

برای بررسی ایمنی سلولی از دو روش سنجش سیتوکین و روش MTT استفاده شد.

در روش اول برای وجود سیتوکین‌های IFN-γ و IL-۴ (Cytokine assay) از سوپ سلولی لنفوسیت‌های طحالی موش ایمن شده و شاهد (چالش نشده و چالش شده) استفاده شد. ۷ هفته پس از تزریق یادآور سوم (قبل از چالش با انگل) و ۷ هفته پس از چالش با انگل، استخراج لنفوسیت از طحال در شرایط استریل صورت گرفت. طحال موش‌های کشته شده در محلول PBS استریل سرد له و به سوسپانسیون سلولی تبدیل شد.

با توجه به تعداد سلول‌های جدا شده از هر طحال، به دلیل این‌که تعداد سلول‌های لنفوسیت در هر چاهک کشت پلیت ۲۴ خانه‌ای، باید ۲×۱۰^{۶} باشد، مقداری از سلول برای کشت در چاهک (با انجام محاسبات) برداشته شد. سپس به هر چاهک مقدار ۵۰ میکروگرم آنتی‌ژن اضافه گردید (لنفوسیت‌ها توسط آنتی‌ژن انگل تحریک می‌شوند). بعد از آن حجم سوسپانسیون هر چاهک توسط محیط RPMI-۱۶۴۰ که حاوی FCS (Fetal calf serum) ۱۰ درصد بود، به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای دی‌اکسیدکربن ۵ درصد انکوبه شدند. پس از این مدت، محتویات رویی سلول‌ها به آرامی در ۷۲ ساعت جمع‌آوری و در ویال اپندورف جمع شد و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی در مقادیر ۳۰۰ میکرولیتر در ویال‌ها تقسیم گردید و تا زمان سنجش سیتوکین در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۸).

جهت بررسی وجود سیتوکین‌های گامااینترفرون و اینترلوکین ۴ با روش ELISA و با استفاده از کیت U-cytech-biosciences کشور هلند، از سوپ سلولی لنفوسیت‌های طحال موش‌های ایمن و شاهد که در ۷۰- نگهداری شده بود، استفاده گردید و با استفاده از استاندارد موجود در کیت، منحنی استاندارد رسم شد و نمونه‌های مورد آزمایش بر این اساس ارزیابی شدند.

آزمون MTT

از روش MTT [(4,5- dimethyl thiazoyl-2)-2,5-diphenyle tertrazolium(3- bromide)] برای بررسی پرولیفراسیون لنفوسیت‌ها به صورت زیر استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لنفوسیتی استخراج شده به هر چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول اضافه شد (یعنی ۳×۱۰^{۵} سلول به ازای هر چاهک). سوسپانسیون سلولی حاصل از طحال هر موش در ۳ چاهک کشت داده شد. به دو چاهک از هر گروه، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌ژن انگل لیشمانیا ماژور افزوده شد. به یک چاهک دیگر همان گروه هیچ آنتی‌ژنی اضافه نگردید. حجم نهایی هر چاهک با استفاده از RPMI + FBS (Fetal bovine serum) (۱۰ درصد) به ۲۰۰ میکرولیتر رسید.

پلیت‌های کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار گرفت. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر لنفوسیت، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT

(غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید. پلیت مذکور دوباره به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای دی‌اکسیدکربن ۵ درصد انکوبه شد (تا بلورهای فورمازان نمایان شوند). سوپ سلولی به آرامی بدون هم زدن محتویات چاهک‌ها سانتریفوژ شد و محتویات رویی به طور کامل خارج شد. به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه Elisa Reader خوانده شد. نتایج آزمایش به صورت شاخص تحریک (Stimulation index یا SI) محاسبه گردید (۲۹).

اندازه‌گیری قطر زخم و وزن موش‌ها

پس از انجام چالش با انگل و ظاهر شدن زخم در قاعده دم موش، اندازه‌گیری قطر زخم با استفاده از کولیس دیجیتال به طور هفتگی صورت گرفت؛ به طوری که حاصل جمع طول و عرض قطر زخم بر عدد ۲ تقسیم و به عنوان عدد مربوط به قطر زخم در نظر گرفته می‌شد. وزن موش‌ها طی درمان به صورت هفتگی با ترازو اندازه‌گیری و یادداشت گردید.

بررسی طول عمر موش‌ها

پس از چالش با انگل موش‌های گروه‌های واکسینه شده و شاهد، طول عمر و بقای آن‌ها نیز به طور هفتگی پیگیری شد.

تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده از اندازه‌گیری گاما‌اینترفرون، IL۴، IgGa Total، IgG و IgG۲a و MTT و بررسی قطر زخم و بقای موش‌ها در گروه‌های شاهد و مورد به نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) وارد شد و جهت توصیف داده‌ها و محاسبه شاخص‌های مرکزی و پراکندگی آن‌ها (میانگین وانحراف معیار) محاسبه گردید. در راستای مقایسه گروه‌های مستقل غیر پارامتریک از آزمون Mann–Whitney U، جهت بررسی آزمون‌های تعقیبی آشکارسازی اختلاف بین گروه‌های مستقل غیر پارامتریک از آزمون Kruskal–Wallis، برای مقایسه اثر گذشت زمان از آزمون Friedman و جهت مقایسه گروه‌های وابسته غیر پارامتریک با یکدیگر از آزمون‌های تعقیبی Wilcoxon استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی ایمنی سلولی

سنجش سیتوکین‌ها

۱- گاما‌اینترفرون (IFN-γ): با انجام آزمون Mann-Whitney U میانگین میزان گاما‌اینترفرون، ۷۲ ساعت قبل و بعد از چالش همه گروه‌های ایمن نسبت به گروه‌های شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود. pcTSA + IL۲۲ با داشتن میانگین بالاتر در میزان گاما‌اینترفرون (۷۲ ساعت بعد از چالش) نسبت به pcTSA اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (جدول شماره ۱).

۲- اینترلوکین ۴: با انجام آزمون Mann-Whitney U و مقایسه میانگین IL-۴ گروه‌های شاهد PBS با pcDNA۳، اختلاف معنی‌داری قبل و بعد از چالش مشاهده نشد. همچنین گروه‌های ایمن pcTSA با pcTSA + IL۲۲ اختلاف معنی‌داری در میانگین IL-۴ قبل و بعد از چالش نداشتند ($P < ۰/۰۵$)، اما در مورد کاهش میانگین IL-۴ گروه pcTSA + IL۲۲ و pcTSA اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد PBS و pcDNA۳ ۷۲ ساعت بعد از چالش مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$) (جدول شماره ۱).

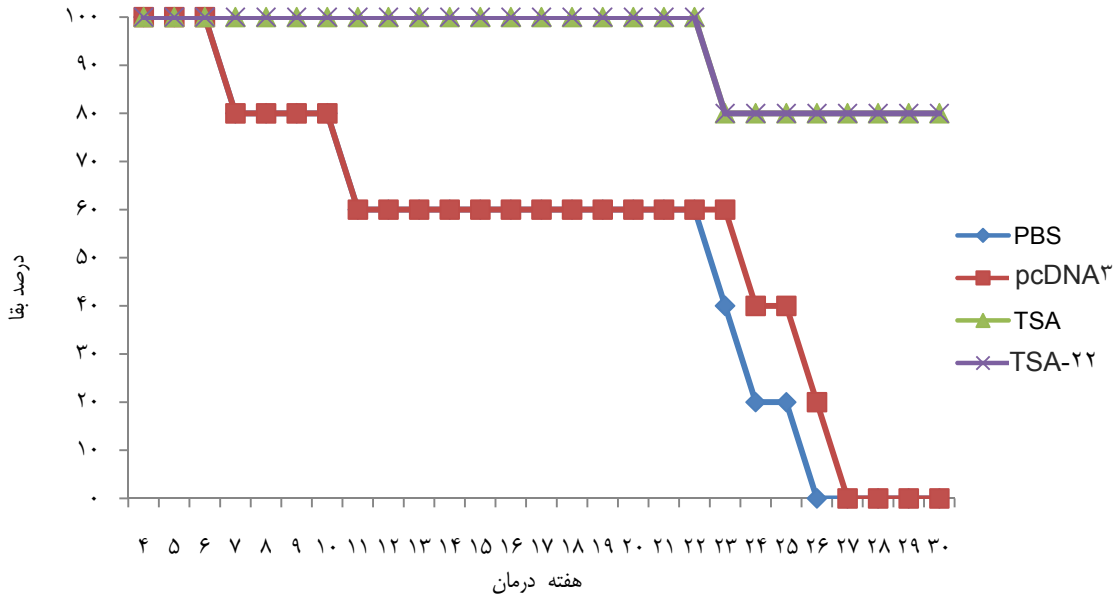
میزان بقا

میزان بقا در همه گروه‌های ایمن و شاهد با یا بدون دریافت IL۲۲ تا هفته ۶ بعد از چالش ۱۰۰ درصد بود. مرگ و میر گروه‌های شاهد از هفته هفتم بعد از چالش اتفاق افتاد (۲۰ درصد مرگ و میر و ۸۰ درصد بقا) که نرخ فوق برای گروه‌های TSA + IL۲۲ و TSA در هفته بیست و سوم روی داد. با وجود این که نرخ مرگ و میر ۱۰۰ درصد برای گروه‌های شاهد pcDNA۳ و PBS در هفته ۲۶ و ۲۷ بود، اما در این مقطع برای گروه pcTSA + IL۲۲ و pcTSA بقای ۸۰ درصد اتفاق افتاد (نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین غلظت IL-۴ و گامااینترفرون ۷۲ ساعت قبل و بعد از چالش در موش‌های شاهد و ایمن با یا بدون دریافت سیتوکین

گروه		گامااینترفرون (۷۲ ساعت قبل از چالش)	گامااینترفرون (۷۲ ساعت بعد از چالش)	IL-۴ (۷۲ ساعت قبل از چالش)	IL-۴ (۷۲ ساعت بعد از چالش)
PBS	میانگین	۲۷۴/۰۰۰	۱۷۶/۲۵۰	۱۵۳/۷۵۰	۲۰۳/۷۵۰
	انحراف معیار	۲۴/۰۹۷	۳۴/۴۹۰	۳۳/۲۶۰	۱۴/۳۳۸
pcDNA۳	میانگین	۱۲۸/۲۵۰	۱۲۳/۷۵۰	۱۸۶/۲۵۰	۲۲۹/۷۵۰
	انحراف معیار	۲۰/۱۳۹	۲۰/۵۶۴	۳۲/۵۰۰	۳۳/۶۶۹
pcTSA	میانگین	۶۷۶/۲۵۰	۵۶۲/۵۰۰	۱۵۲/۲۵۰	۵۵/۵۰۰
	انحراف معیار	۹۷/۰۷۲	۸۱/۴۹۶	۲۴/۵۰۰	۱۹/۱۵۷
pcTSA + IL۲۲	میانگین	۷۰۳/۰۰۰	۹۱۲/۰۰۰	۱۳۴/۲۵۰	۳۷/۵۰۰
	انحراف معیار	۱۹۸/۸۶۰	۵۲/۹۳۴	۱۲/۰۶۶	۱۲/۵۰۳

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin



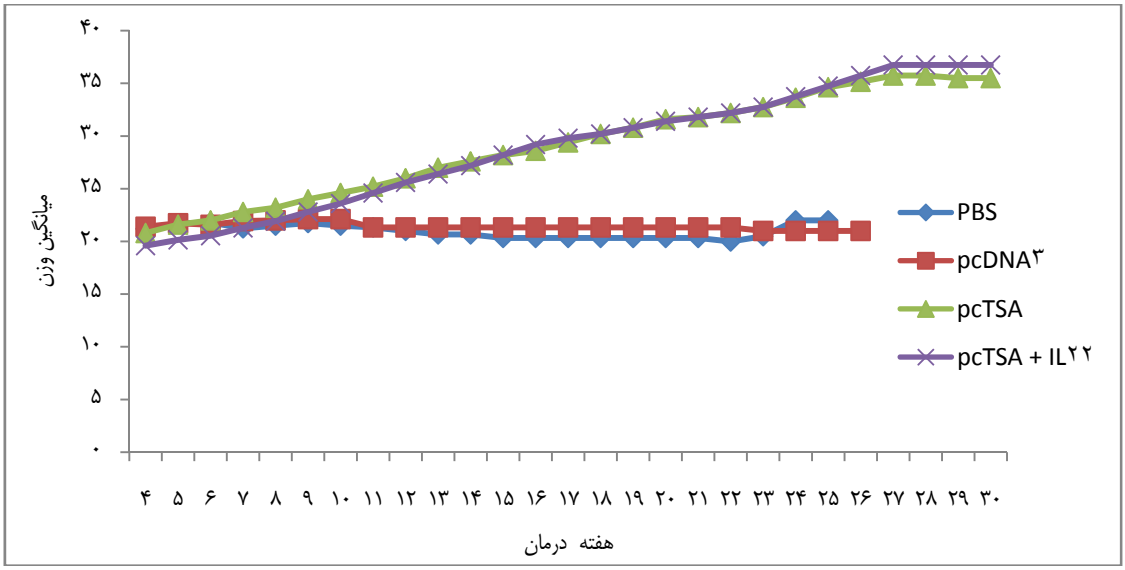
نمودار شماره ۱: درصد مرگ و میر و بقا در موش‌های دریافت کننده TSA و IL۲۲ + TSA و مقایسه با گروه‌های شاهد طی بررسی در ۳۰ هفته
PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant

وزن

در هفته ۳۰، گروه pcTSA + IL۲۲ وزن بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت. میانگین وزن موش‌های گروه‌های مختلف دریافت کننده pcTSA + IL۲۲ و pcTSA در طی ۲۷ هفته بعد از بروز زخم و یا ۳۰ هفته بعد از چالش افزایش منظمی را نسبت به گروه‌های شاهد نشان دادند. با انجام آزمون Mann-Whitney U، میانگین وزنی گروه pcTSA + IL۲۲ و pcTSA از افزایش بالاتری نسبت به PcDNA۳ و PBS برخوردار بود و این اختلاف با گروه‌های شاهد فوق معنی‌دار می‌باشد ($P < ۰/۰۵$) (نمودار شماره ۲).

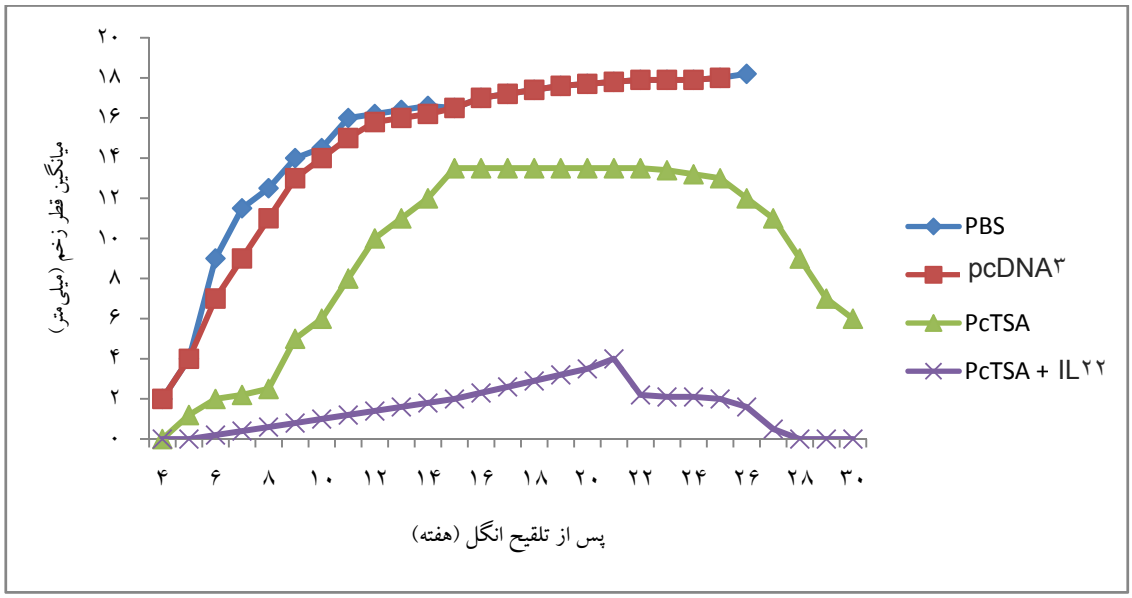
وضعیت زخم

pcTSA + IL۲۲ با داشتن زخم کوچک‌تر نسبت به pcTSA و گروه‌های شاهد با انجام آزمون تعقیبی Mann-Whitney U در طی تمام هفته‌ها اختلاف معنی‌داری با گروه‌های فوق داشت ($P < ۰/۰۵$). بروز زخم با میانگین ۰/۶۶ میلی‌متر در گروه گیرنده pcTSA + IL۲۲ در روز ۴۴ بعد از چالش اتفاق افتاد؛ در صورتی که اندازه زخم در روز ۳۰ پس از چالش در گروه pcDNA۳ برابر با ۲/۵۶، در گروه PBS برابر با ۲/۸۲ و در گروه pcTSA به میزان ۱/۳۰ میلی‌متر بود (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۲: میانگین وزن در موش‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA۲۲ + IL و مقایسه با گروه‌های شاهد طی بررسی در ۳۰ هفته

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-۲۲



نمودار شماره ۳: میانگین اندازه زخم در موش‌های دریافت کننده pcTSA و TSA + IL۲۲ و مقایسه با گروه‌های شاهد طی بررسی در ۳۰ هفته

آزمون MTT

میانگین آزمون MTT بعد از چالش در همه گروه‌ها با وجود معنی‌دار نشدن بیشتر از قبل چالش بود (جدول شماره ۲) (نمودار شماره ۴).

نتایج بررسی ایمنی هومورال

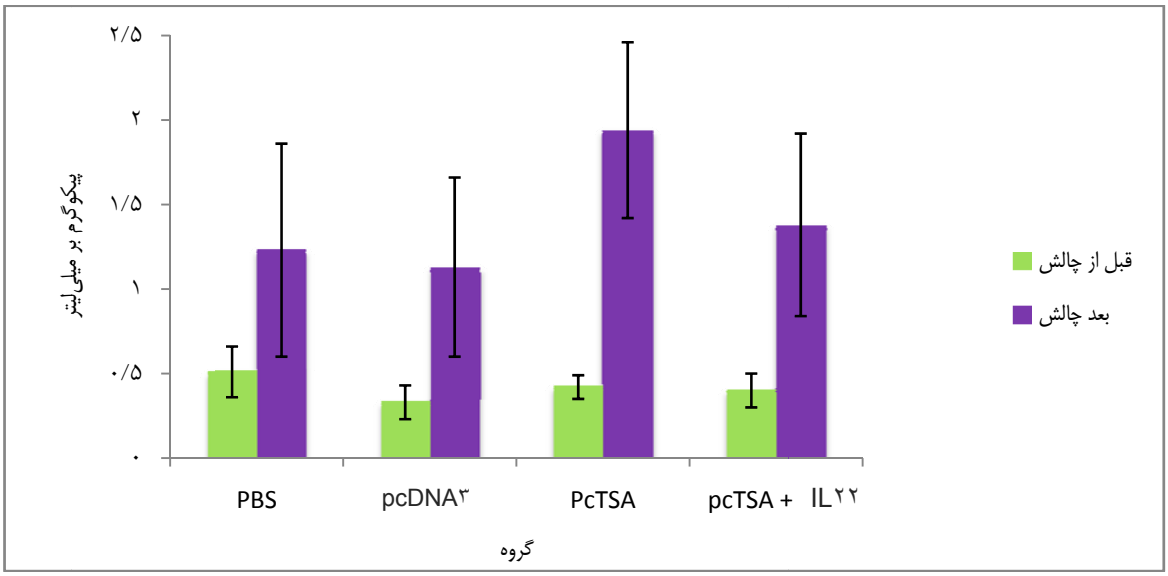
بررسی میانگین و انحراف معیار IgG total، IgG۱ و IgG۲a در گروه‌های مختلف ایمن و شاهد در سه مرحله بعد از واکسیناسیون دوم و سوم و قبل از چالش با انجام آزمون تعقیبی Mann-Whitney U نشان داده شده است (نمودارهای شماره ۷-۵) (جدول شماره ۳).

گروه pcTSA و pcTSA + IL۲۲ در مرحله دوم و سوم با گروه‌های شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین، گروه TSA-۲۲ در مرحله اول نیز با همه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$) (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار MTT قبل و بعد از چالش گروه‌های شاهد و ایمن با یا بدون دریافت سیتوکین

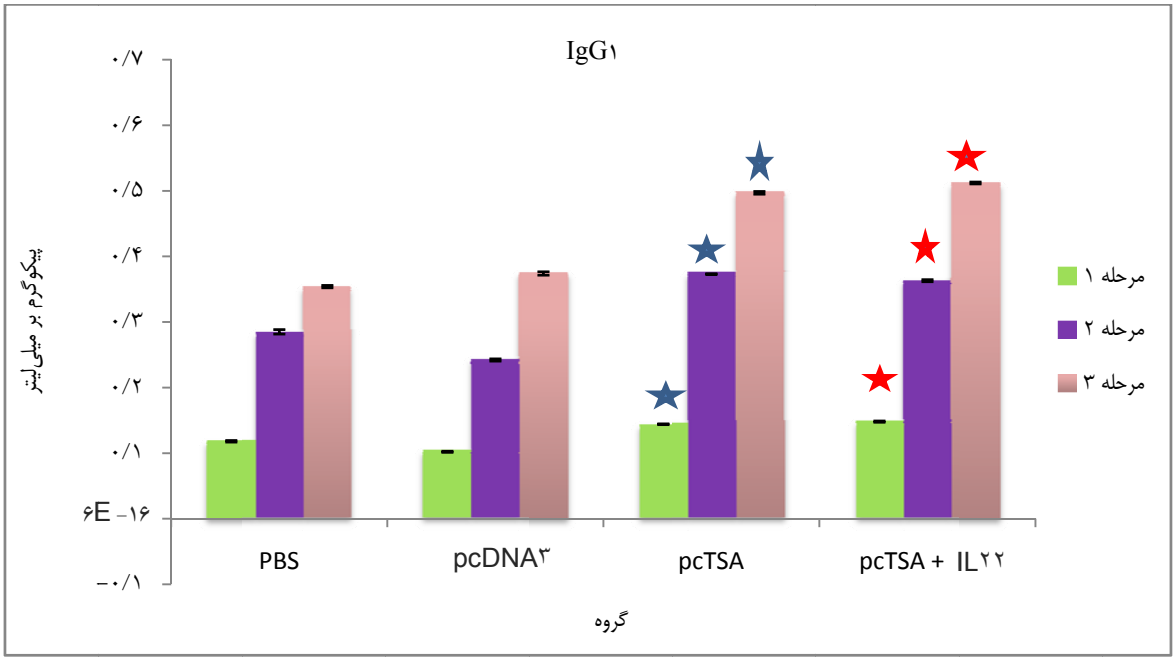
گروه تحت مطالعه	OD MTT		سطح معنی‌داری
	مرحله ۱	مرحله ۲	
PBS	۰/۱۴۸ ± ۰/۵۰۸	۰/۶۳۲ ± ۱/۲۲۶	۰/۰۴۶
pcDNA۳	۰/۰۹۹ ± ۰/۳۲۶	۰/۵۳۰ ± ۱/۱۳۱	۰/۰۲۸
TSA	۰/۰۷۳ ± ۰/۴۲۳	۰/۵۱۷ ± ۱/۹۴۴	۰/۰۲۸
TSA-۲۲	۰/۱۰۴ ± ۰/۳۹۶	۰/۵۳۶ ± ۱/۳۷۷	۰/۰۲۸

OD: Absorbance; MTT: (4,5- dimethyl thiazoyl-2)-2,5-diphenyle tertrazolium(3- bromide); PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant



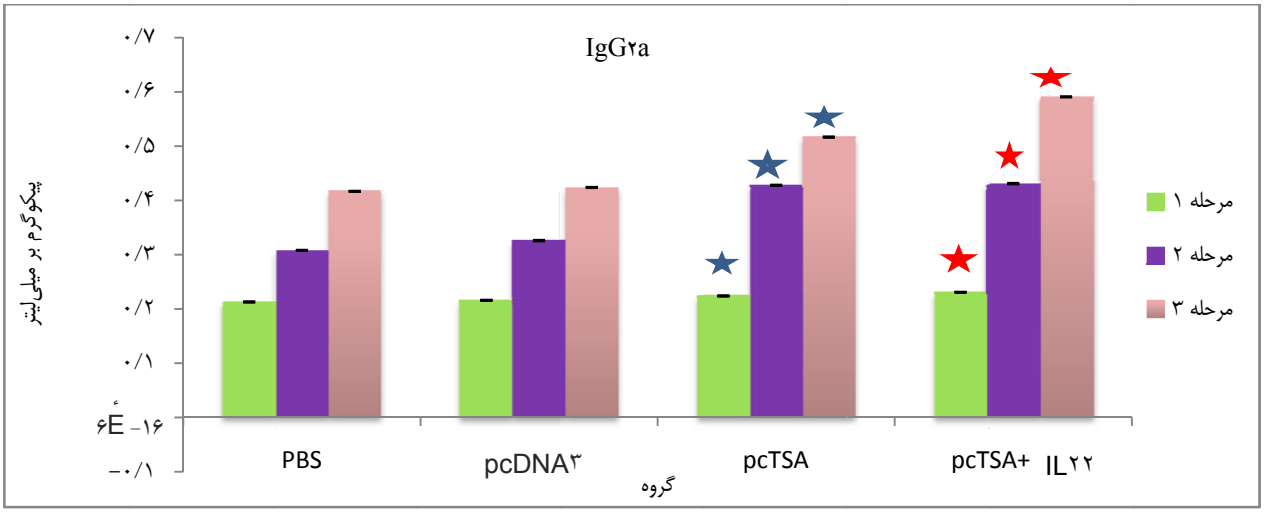
نمودار شماره ۴: میانگین میزان MTT در موش‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA + IL-۲۲ و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش

MTT: (4,5- dimethyl thiazoyl-2)-2,5-diphenyle tertrazolium(3- bromide); PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin



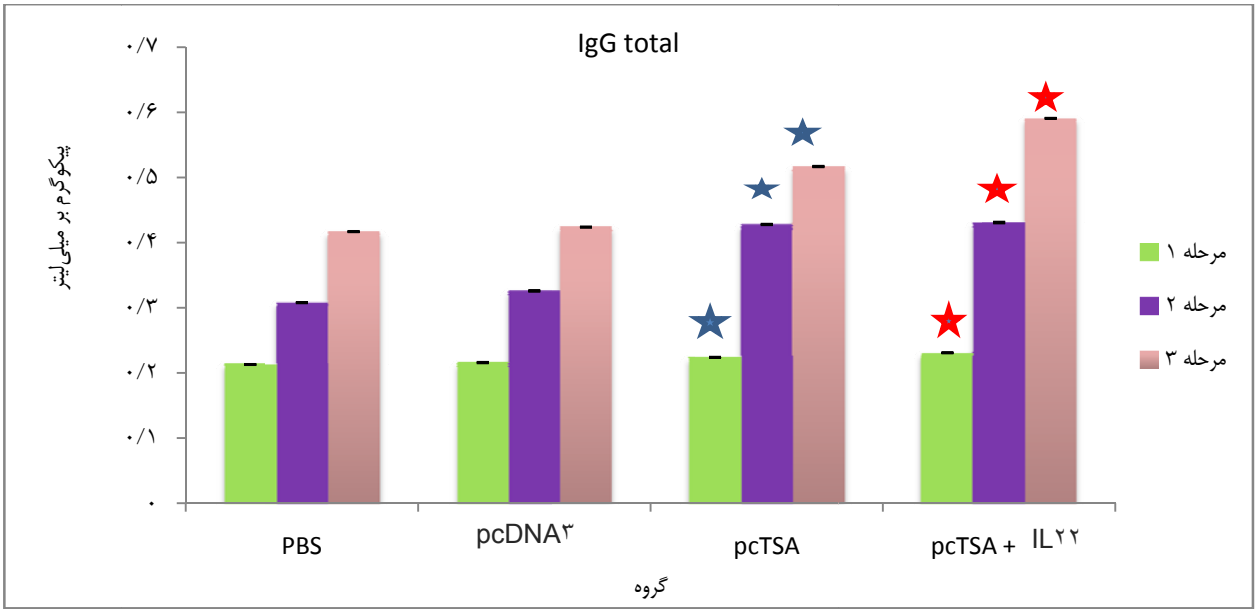
نمودار شماره ۵: میانگین میزان در موش‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA + IL۲۲ و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-۲۲



نمودار شماره ۶: میانگین میزان IgG۲a در موش‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA+ IL۲۲ و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-۲۲



نمودار شماره ۷: میانگین میزان IGg Total در موش‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA+ IL-۲۲ و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-۲۲

جدول شماره ۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار IgG total، IgG۱ و IgG۲a در گروه‌های شاهد و دریافت کننده سیتوکین در سه مرحله

گروه تحت مطالعه	IgG۱ (میانگین ± انحراف معیار)			IgG۲a (میانگین ± انحراف معیار)			IgG Total (میانگین ± انحراف معیار)		
	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
PBS	۰/۱۱۸ ± ۰/۰۰۱۳	۰/۲۸۵ ± ۰/۰۰۳۴	۰/۳۵۴ ± ۰/۰۰۱۹	۰/۳۹۳ ± ۰/۰۰۱۰	۰/۴۱۴ ± ۰/۰۰۸	۰/۴۲۲ ± ۰/۰۰۸	۰/۲۳۱ ± ۰/۰۰۳	۰/۳۰۸ ± ۰/۰۰۵	۰/۴۱۷ ± ۰/۰۰۴
pcDNA۳	۰/۱۰۲ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۱۷ ± ۰/۲۴۲	۰/۳۷۴ ± ۰/۰۲۶	۰/۳۹۵ ± ۰/۰۰۱	۰/۴۱۲ ± ۰/۰۰۸	۰/۴۴۱ ± ۰/۰۰۵	/۲۱۶ ± ۰/۰۰۵	۰/۳۲۶ ± ۰/۰۰۸	۰/۴۲۴ ± ۰/۰۰۵
pcTSA	۰/۱۴۴ ± ۰/۰۰۶	۰/۳۷۳ ± ۰/۰۰۶	۰/۴۹۷ ± ۰/۰۲۱	۰/۴۲۷ ± ۰/۰۰۹	۰/۵۹۱ ± ۰/۰۰۱	۰/۷۲۷ ± ۰/۰۰۳	۰/۲۲۴ ± ۰/۰۰۵	۰/۴۲۸ ± ۰/۰۰۶	۰/۵۱۷ ± ۰/۰۰۵
pcTSA + IL۲۲	۰/۱۴۸ ± ۰/۰۱۰	۰/۳۶۳ ± ۰/۰۱۷	۰/۵۱۲ ± ۰/۰۰۱	۰/۴۳۷ ± ۰/۰۲۴	۰/۵۸۱ ± ۰/۰۰۶	۰/۷۹۲ ± ۰/۰۰۶	۰/۲۳۱ ± ۰/۰۰۴	۰/۴۳۱ ± ۰/۰۰۸	۰/۵۹۱ ± ۰/۰۰۱

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-۲۲

مرحله ۱: بعداز واکسیناسیون دوم مرحله ۲: بعد از واکسیناسیون سوم مرحله ۳: قبل از چالش

بحث

در مورد لیشمانیا ماژور، انتخاب آنتی‌ژنی که به وسیله واکسن DNA کد گردد و از طریق ژنتیکی به مولکول‌های MHC (Major histocompatibility complex) سطح سلول متصل شود، سیستم ایمنی را تحریک نماید و استفاده از استراتژی مناسب برای واکسیناسیون که باعث افزایش ایمنوژنیسیته سلول T و ایجاد پاسخ ایمنی سلولی محافظت کننده بر علیه پاتوژن داخل سلولی شود، از اهمیت زیادی برخوردار است (۸، ۷، ۲).

در این تحقیق از پلاسمید کد کننده پروتئین TSA لیشمانیا ماژور استفاده شد (۲۶، ۲۵). امروزه استفاده از ادجوانت‌ها و سیتوکین‌های مختلف برای بهبود و اصلاح پاسخ ایمنی القا شده به وسیله DNA واکسن‌های لیشمانیا به خصوص استفاده از سیتوکین‌های IL۱۲ در فرمولاسیون DNA واکسن‌ها به منظور افزایش پاسخ‌های پروتکتیو زیرمجموعه سلول T، انجام می‌شود (۷). نتایج این پژوهش درصد بقای بالا و کاهش مرگ و میر، افزایش چشمگیر وزن، کاهش قطر زخم و نتایج بررسی‌های ایمنی سلولار و هومورال را نشان می‌دهد که در موش‌های دریافت کننده توأم IL۲۲ با ژن TSA به طور مشخص، افزایش تولید گامااینترفرون و کاهش تولید IL۴ ایجاد می‌شود و باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی Th۱ می‌گردد. در نتیجه سبب افزایش کارایی این سیستم در بهبود لیشمانیوز جلدی می‌شود.

در این مطالعه از سیتوکین IL۲۲ برای اولین باردر دوز ۵ نانوگرم استفاده شد؛ چرا که در ارزیابی دو دوز مختلف ۵ و ۱۰ نانوگرم سیتوکین IL۲۲ محققین پیش تر به این نتیجه رسیده بودند که دوز ۵ نانوگرم این سیتوکین کارایی بهتری نسبت به ۱۰ نانوگرم دارد و بر اساس بعضی تحقیقات از بعضی دوزهای مورد استفاده IL۲۲ عوارض جانبی گزارش شد (۳۱، ۳۰). به منظور افزایش تولید این سیتوکین و گران بودن پروتئین نوترکیب IL۲۲، در آینده می‌توان از ژن‌های کد کننده سیتوکین IL۲۲ به ژن آنتی‌ژن اضافه کرد تا قدرت ایمنی‌زایی واکسن افزایش یابد.

یکی از ملاک‌های بررسی روند بالینی موش‌های ایمن و شاهد در این تحقیق وضعیت زخم بود.

اندازه زخم گروه‌های دریافت کننده pcDNA۳، pcTSA و PBS روند صعودی داشت. کاهش میانگین اندازه زخم و مدت زمانی که اندازه زخم به حداکثر رسید در گروه دریافت کننده pcTSA + IL۲۲ نسبت به گروه‌های شاهد و ایمن دارای اختلاف معنی‌داری بود که احتمال دارد IL۲۲ توأم با pcTSA به صورت موضعی در پوست در لیشمانیوز جلدی برای کاهش رشد و بهبودی زخم بهتر از pcTSA عمل نموده باشد (۳۲، ۲۳).

از آن‌جایی که عامل زمان تأثیر قاطعی بر روند بیماری، وزن موش‌ها و اندازه قطر زخم دارد، بدیهی است که با گذشت زمان عفونت در حیوان تثبیت شده و بیماری بروز می‌کند. این مسأله منجر به بروز علایم در حیوان، کم‌خوراکی و از سویی تحلیل رفتن آن و در مجموع کاهش وزن حیوان می‌شود و در موش‌های گروه شاهد PBS یا pcDNA۳، روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بود. میانگین وزن موش‌های گروه‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA + IL۲۲ افزایش منظمی را در طول بررسی نسبت به گروه‌های شاهد PBS و pcDNA۳ نشان داد که این اختلاف با $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار شده بود. همچنین در مقایسه وزن گروه های ایمن pcTSA و pcTSA + IL۲۲ مشاهده شد که pcTSA بیشتر منجر به کاهش وزن واحدهای نمونه‌ای می‌شود یا به عبارتی pcTSA + IL۲۲ در بهبود وزن موش‌ها نسبت به pcTSA مؤثرتر عمل نمود؛ بنابراین می‌توان گفت که سیتوکین IL۲۲ در بهبود وزن موش‌های واکسینه در گروه دریافت کننده آن بهتر عمل نموده است.

از آن‌جایی که ارزیابی عمده در محیط طبیعی (داخلی)، تعیین الگوی Th۲ و Th۱ است؛ به همین دلیل IL-۴ و گامااینترفرون سنجیده شد (۱۱). pcTSA + IL۲۲ در افزایش تولید گامااینترفرون ۷۲ ساعت بعد از چالش نسبت به pcTSA اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$) و نمایانگر آن است که موش‌های دریافت کننده IL۲۲ سبب ایجاد پاسخ‌های سیتوکین Th۱ می‌شوند. تحقیقات قبلی نیز نشان داده است که IL۲۲ یک اثر حفاظتی در برابر بیماری کالاآزار انسانی دارد و لیشمانیا دونووانی تمایز سلول‌های Th-۱۷ را برای تولید IL-۱۷، IL۲۲ و گامااینترفرون تحریک می‌کند (۲۲).

هزارجریبی و همکاران در تحقیق دیگری دریافتند که اثر سیتوکین IL۲۲ روی پلاسمید کد کننده ژن LACK با افزایش گامااینترفرون و کاهش اینترلوکین ۴ همراه می‌باشد و سبب ایجاد پاسخ‌های سیتوکین Th۱ می‌شود (۳۳).

از طرف دیگر، عفونت لیشمانیایی بستگی به فعال شدن یکی از دو زیرگروه‌های سلولی CD+۴ (یعنی Th۲ و Th۱) دارد و پاسخ Th۱ با ترشح سیتوکین‌هایی مانند IFN-γ۲ و IL-TNF-ß واسطه بهبودی می‌باشند و گامااینترفرون حاصل از این سلول‌ها به عنوان قوی‌ترین سیتوکین فعال کننده ماکروفاژها است و فعال شدن ماکروفاژها منجر به تولید نیتریک اکسید (NO) و سرانجام منجر به مرگ انگل می‌شود (۳۵، ۳۴).

میانگین اینترلوکین ۴ گروه‌های ایمن نسبت به گروه‌های شاهد روند کاهشی دارد و از رتبه کمتری برخوردار است و این کاهش با گروه‌های شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود، اما این اختلاف در کاهش میانگین IL۴ گروه‌های ایمن معنی‌دار نیست ($P < ۰/۰۵$). با این حال اثر توأم پلاسمید کد کننده ژن pcTSA با سیتوکین IL۲۲ در تولید IL۴ و اثر آن روی ماکروفاژها نیاز به بررسی بیشتری دارد؛ چرا که با وجود این‌که IL۲۲ یک سیتوکین عضو خانواده IL۱۰ است و IL۱۰ به عنوان سردسته این خانواده سیتوکین، یک مهار کننده مؤثر ایمنی سلولی و تقویت کننده قوی ایمنی هومورال است؛ اما با وجود داشتن مشترکات ساختمانی بسیار زیاد این دو از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمنولوژیک تفاوت‌های فاحشی دارند (۱۹، ۱۸).

بررسی میانگین IgG۱، IgG۲a و IgG total در گروه‌های مختلف ایمن و شاهد در سه مرحله بعد از واکسیناسیون دوم و سوم و قبل از چالش نشان داد که گروه دریافت کننده pcTSA + IL۲۲ نسبت به گروه شاهد در مرحله دوم و سوم بهتر از گروه pcTSA عمل نموده است که شاید علت تفاوت موجود این باشد که مرحله سوم جمع آوری سرم موش‌ها برای اندازه‌گیری IgG total، IgG۲a و IgG۱ بعد از تزریق سیتوکین IL۲۲ صورت گرفت؛ در صورتی که جمع‌آوری سرم موش‌ها برای اندازه‌گیری مرحله اول و دوم IgG total، IgG۲a و IgG۱ قبل از تزریق سیتوکین IL۲۲ بود که این امر کارایی و نقش سیتوکین IL۲۲ را در تحریک سیستم ایمنی هومورال گروه‌های با یا بدون ژن نشان می‌دهد. میانگین MTT بعد از چالش کلیه گروه‌ها بیشتر از قبل چالش است.

به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده تأثیر بالای سیتوکین IL۲۲ همراه با ژن کد کننده پروتئین TSA در تحریک هر دو سیستم ایمنی سلولی و هومورال در مدل موشی و بهبود زخم‌های لیشمانیایی ناشی از لیشمانیا ماژور بود.

References

1. Launois P, Tacchini-Cottier F, Kieny MP. Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. Expert Rev Vaccines 2008; 7(8): 1277-87.
2. den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. Clin Microbiol Infect 2011; 17(10): 1471-7.
3. Rohrig E, Hamel D, Pfister K. Retrospective evaluation of laboratory data on canine vector-borne infections from the years 2004-2008. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2011; 124(9-10): 411-8.
4. Dumonteil E, McMahon-Pratt D, Price VL. Report of the fourth tdr/idri meeting on second-generation vaccines against leishmaniasis. Geneva, Switzerland: World Health Organization p. 53-58; 2001.
5. Mutiso JM, Macharia JC, Gicheru MM. A review of adjuvants for Leishmania vaccine candidates. J Biomed Res 2010; 24(1): 16-25.
6. Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against Leishmania major infection in susceptible BALB/c mice. Infect Immun 2002; 70(6): 2828-36.
7. Coelho EA, Tavares CA, Lima KM, Silva CL, Rodrigues JM, Fernandes AP. Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against Leishmania (Leishmania) major infection. Parasitol Res 2006; 98(6): 568-75.
8. Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of Leishmania major that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. J Immunol 1996; 157(11): 5034-41.
9. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. Infect Immun 1998; 66(7): 3279-89.
10. Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler

RN, Webb JR, Seiky YA, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. Infect Immun 2001; 69(6): 4103-8.
11. Mauel J. Vaccination against Leishmania infections. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2002; 2(3): 201-26.
12. Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. J Immunol 1999; 163(8): 4481-8.
13. Mendez S, Belkaid Y, Seder RA, Sacks D. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. Vaccine 2002; 20(31-32): 3702-8.
14. Kwissa M, Lindblad EB, Schirmbeck R, Reimann J. Codelivery of a DNA vaccine and a protein vaccine with aluminum phosphate stimulates a potent and multivalent immune response. J Mol Med (Berl) 2003; 81(8): 502-10.
15. Carvalho JA, Azzoni AR, Prazeres DM, Monteiro GA. Comparative analysis of antigen-targeting sequences used in DNA vaccines. Mol Biotechnol 2010; 44(3): 204-12.
16. Ahmed SB, Touihri L, Chtourou Y, Dellagi K, Bahloul C. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant Leishmania (Leishmania) major antigens confers full protection in BALB/c mice. Vaccine 2009; 27(1): 99-106.
17. Ahmed SB, Bahloul C, Robbana C, Askri S, Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to L. major. Vaccine 2004; 22(13-14): 1631-9.
18. Aujla SJ, Kolls JK. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. J Mol Med (Berl) 2009; 87(5): 451-4.
19. Conti P, Kempuraj D, Frydas S, Kandere K, Boucher W, Letourneau R, et al. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. Immunol Lett 2003; 88(3): 171-4.
20. Igawa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. Mol Immunol 2006; 43(7): 999-1009.
21. Dumoutier L, Van RE, Ameye G, Michaux L, Renauld JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. Genes Immun 2000; 1(8): 488-94.
22. Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani. J Clin Invest 2009; 119(8): 2379-87.
23. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol 2005; 174(6): 3695-702.
24. Dhiman R, Indramohan M, Barnes PF, Nayak RC, Paidipally P, Rao LV, et al. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion. J Immunol 2009; 183(10): 6639-45.
25. Tabatabaie F, Ghaffari far F, Dalimi A, Sharifi Z, Hoseini A. Cloning and sequencing of Leishmania major Thiol-Specific-Antioxidant Antigen (TSA) Gene. Iranian J Parasitol 2007; 2(4): 30-41.
26. Fatemeh G, Fatemeh T, Zohreh S, Abdolhosein D, Mohammad ZH, Mehdi M. Cloning of a Recombinant Plasmid Encoding Thiol-Specific Antioxidant Antigen (TSA) Gene of Leishmania majorand Expression in the Chinese Hamster Ovary Cell Line. Malays J Med Sci 2012; 19(1): 15-9.
27. Sasaki S, Takeshita F, Xin KQ, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. Methods 2003; 31(3): 243-54.
28. Fernandez-Botran R, Vetvicka V. Methods in Cellular Immunology. 2nd ed. New York, NY: CRC Press; 2001.
29. Verma A, Prasad KN, Singh AK, Nyati KK, Gupta RK, Paliwal VK. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. J Microbiol Methods 2010; 81(2): 175-8.
30. Ziaee Hezarjaribi H, Ghafari far F, Dalimi Asl, Sharifi Z. The survey of the effect of cytokine IL22 on the ulcer originated from L- Major in BALB/c mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2011; 21(86): 282-92. (Persian).
31. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. Clin Exp Immunol 2007; 150(3): 407-15.
32. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. J Clin Invest 2009; 119(12): 3573-85.
33. Hezarjaribi HZ, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z, Jorjani O. Effect of IL-22 on DNA vaccine encoding LACK gene of Leishmania major in BALB/c mice. Exp Parasitol 2013; 134(3): 341-8.
34. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. J Immunol 1998; 160(11): 5347-54.
35. Rodriguez F, Whitton JL. Enhancing DNA immunization. Virology 2000; 268(2): 233-8.