DOI: 10.22092/vj.2017.109877
شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر لیپوپلی ساکارید باکتری *اشرشیا کولی* بر پاسخ ایمنی هومورال ماکیان

• **محمد خسروی (نویسنده مسئول)**
گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
• **منصور میاحی**
گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
• **نغمه موری بختیاری**
• **فرنوش کاویانی**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
تاریخ دریافت: ۳۰-۰۵-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۴-۰۷-۱۳۹۵
Email: m.khosravi@scu.ac.ir

چکیده

در این مطالعه جداسازی، خالص‌سازی و غیرفعال نمودن پلی‌ساکارید باکتری *اشرشیا کولی* با هدف بررسی اثر لیپوپلی‌ساکارید (LPS) فعال و غیرفعال در تحریک پاسخ هومورال ماکیان انجام شده است. همچنین امکان استفاده از این قسمت دیواره خارجی در تحریک اختصاصی سیستم ایمنی هومورال نسبت به باکتری منبع آن ارزیابی شده است. جداسازی لیپوپلی ساکارید با استفاده از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) انجام شد. چهار دوز از LPS فعال و غیر فعال شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از گلبول قرمز گوسفند (SRBC) ۲۰ درصد به هشت گروه شامل چهار قطعه مرغ تزریق شد. پاسخ ایمنی هومورال در روزهای ۵ و ۱۰ پس از تیمار، با روش معمول هماگلوتیناسیون بررسی شد. اثر LPS در ایجاد پاسخ ایمنی هومورال نسبت به باکتری منبع با روش الیزای خانگی ارزیابی شد. تزریق دوزهای ۱۰ و ۲۵ میکروگرم از لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشرشیا کولی* به صورت معناداری ($p < ۰/۰۵$) سبب تحریک پاسخ ایمنی هومورال شد. لیپوپلی‌ساکارید غیر فعال ۱۰ روز پس از تزریق میزان ۱۰۰ میکروگرم، سبب افزایش غیر معنادار عیار آنتی بادی شد. همچنین تفاوت معناداری ($p < ۰/۰۵$) در تغییر عیار آنتی‌بادی نسبت به باکتری *اشرشیا کولی* در گروه‌های مختلف وجود نداشت. امکان بهره‌مندی از لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشرشیا کولی* در ایمن‌سازی ماکیان وجود دارد؛ همچنین بررسی اثرات جانبی و تغییر روش‌های غیرفعال‌سازی می‌تواند زمینه استفاده از LPS را در ایمن‌سازی حیوانات فراهم کند. علاوه بر این استفاده از LPS اشریشیا کولی قادر به تحریک سیستم ایمنی علیه این باکتری نبود.

کلمات کلیدي: لیپوپلی‌ساکارید، *اشرشیا کولی*، ماکیان، ایمنی هومورال

Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 71-77

Effects of ***Escherichia coli*** Lipopolysaccharide on Chicken Humoral Immune Response

By: Khosravi, M., (Corresponding Author), Department of Pathobiology, Veterinary Faculty of Shahid Chamran University. Ahvaz, Iran. Mayahi, M., Department Clinical Science, Veterinary Faculty of Shahid Chamran University. Ahvaz, Iran. Moory Bakhtiari, N., Department of Pathobiology, Veterinary Faculty of Shahid Chamran University. Ahvaz, Iran and Kaviani, F., Student of Veterinary faculty of ShahidChamran University of Ahvaz, Iran.

Received: 2016-08-20 Accepted: 2016-10-15

Email: m.khosravi@scu.ac.ir

In this research, extraction, purification and inactivation of *Escherichia coli (E. coli)* lipopolysaccharide (LPS) were performed with the aim of investigating the effects of inactivated and intact form of LPS on chicken humoral immune response stimulation. Also, the possibility of application of this outer part of cell wall for specific induction of humoral immune response to its reference bacteria was evaluated. The LPS was extracted using Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Four doses (10, 25, 50 and 100 µg) of inactivated and intact form of LPS and 100 µL of %20 sheep red blood cell (SRBC) were injected to eight groups of broiler chickens (N=4). The humoral immune responses were evaluated five and 10 days after treatment by haemagglutination assay. The effects of LPS on induction of humoral immune response to the reference bacteria were measured using in-house ELISA. Injection of 10 and 25 µg of LPS significantly ($P<0.05$) induced the humoral immune response. The inactivated LPS only induced immune responses 10 days after the injection of 100 µg. No significant difference existed between the various groups in antibody titer against *E. coli* ($P<0.05$). It is possible to take advantage from Escherichia coli lipopolysaccharide in poultry immunization. Also, evaluation of the side effects and changes of inactivation methods may show the capability of LPS application in animal immunization. In addition, using LPS as a vaccine for *E. coli* is not suggested.

Key words: Lipopolysaccharide, *Escherichia coli*, Chicken, Humoral Immunity

مقدمه

لیپوپلی‌ساکارید یا اندوتوکسین از اجزای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی است که در حفظ ساختار و پایداری آن نقش دارد. در دیواره هر باکتری *اشرشیا کولی* حدود دو میلیون مولکول لیپوپلی ساکارید (LPS) وجود دارد که آزاد شدن آن از دیواره سلولی در مراحل مرگ سلول‌ها، رشد و تقسیم سلولی انجام می‌شود. لیپوپلی‌ساکارید ۵ تا ۱۰ درصد کل وزن خشک باکتری را شامل می‌شود و از سه قسمت تشکیل شده است: ناحیه لیپید A و یا آندوتوکسین که دارای ساختار دی‌ساکارید فسفاتی متصل به اسید چرب است و ترکیب مهم آن بتاهیدروکسی میریستیک اسید است، این قسمت در باکتری‌های گرم منفی مشابه است و یا دارای تغییرات اندک است؛ پلی‌ساکارید مرکزی که الیگوساکاریدی فسفریله شده است و در محافظت از باکتری‌ها در برابر ترکیبات سمی نقش دارد و در طیف وسیعی از باکتری‌ها مشابه است و در مواردی دارای تفاوت‌های جزئی می‌باشد؛ زنجیره جانبی یا آنتی‌ژن O که سبب خواص آنتی‌ژنی لیپوپلی‌ساکارید می‌شود و از واحدهای قندی تکراری تشکیل شده است که سطح هسته مرکزی را می‌پوشاند و در گونه و سویه‌های مختلف باکتری متفاوت است. شرایط محیطی مانند ترکیب هیدروکربنی محیط کشت، کشت مکرر باکتری، دما و فضای رشد بر بروز LPS اثرگذار هستند (۲۵). در شرایطی که بدن با میزان زیاد LPS مواجه شود و یا به صورت عمومی (مانند زمانی که میزان کم LPS وارد جریان خون شود) واکنش التهابی عمومی ایجاد می‌شود و عوارض چندگانه پاتوفیزیولوژیک از قبیل شوک آندوتوکسین، آسیب بافتی و مرگ ممکن است رخ دهد (۴). واکنش‌های پیروژنیک و شوک متعاقب تجویز داخل وریدی میزان‌های اندک LPS (یک نانوگرم در میلی‌لیتر) در پستانداران ایجاد می‌شود (۷).

شناسایی LPS توسط اجزای ایمنی ذاتی پیامی برای پاسخ به عفونت با باکتری‌های گرم منفی است (۲۲). اثرات لیپوپلی - ساکارید در تحریک سیستم ایمنی از طریق واکنش با گیرنده‌های شبه تول ۴ (Toll like receptor 4) تمایز رده سلولی T کمک‌کننده (Th) شناخته شده می‌باشد (۱۲). تحریک تکثیر غیراختصاصی لنفوسیت‌های B، ترشح سایتوکاین‌هایی از قبیل فاکتور نکروزکننده تومور (TNF)، اینترلوکین یک، اینترلوکین شش و تولید نیتریک اکسید در ماکروفاژها و سایر بیگانه‌خوارهای تک هسته‌ای، از دیگر اثرات قابل ذکر LPS بر سیستم ایمنی می‌باشد (۱، ۷). با توجه به نیاز به ایجاد ایمنی کافی در استفاده از واکسن‌ها و پیشگیری مناسب از بروز بیماری‌ها، مطالعات گسترده ای در زمینه مواد محرک سیستم ایمنی صورت گرفته است. مواد محرك ايمني با تقويت سيستم دفاع غيراختصاصي و اختصاصي قادر به افزايش مقاومت در برخورد با

بيماري‌هاي عفوني مي‌باشد. مواد محرك ايمني را مي‌توان همراه واكسن‌ها (مانند توكسين باكتري‌ها، نمك‌هاي آلومينيومي، پلي نوكلئوتيدها) قبل از واكسن‌ها، بعد از تجويز واكسن (گلوكان‌ها) و يا به تنهايي استفاده كرد (۱۶). ايجاد پاسخ مناسب در مواردی نیازمند تکرار واکسیناسیون و صرف وقت و هزینه‌های اضافی می‌باشد. در مورد واکسن‌های کشته این مطلب مصداق بیشتری دارد. ایجاد پاسخ مناسب ایمنی هومورال نیازمند تحریک مناسب ایمنی ذاتی و ایجاد سلول‌های فعال فاگوسیت‌کننده و عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌باشد. تحریک سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی به‌وسیله LPS سبب فعال‌سازی چندین آبشار انتقال سیگنال شامل سیتوکاین‌های التهابی وابسته به فاکتور هسته‌ای کاپا (NF- kB) می‌شود. مولکول CD۱۴ (مونوسیت‌ها) به عنوان گیرنده LPS در سطح سلول است ولی توانایی انتقال سیگنال را ندارد، این انتقال سیگنال توسط ملکول‌های گیرنده‌ی شبه تول (TLR)های ۲ و ۴ انجام می‌شود (۲۲).

در این مطالعه با جداسازی، خالص‌سازی و غیرفعال نمودن پلی‌ساکارید باکتری *اشرشیا کولی*، بررسی امکان استفاده از LPS فعال و غیرفعال به عنوان ادجوانت در تحریک پاسخ هومورال ماکیان انجام شده است. همچنین امکان استفاده از این قسمت دیواره خارجی در تحریک اختصاصی سیستم ایمنی نسبت به باکتری منبع آن ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

جدایه باکتریایی

در این مطالعه از سویه استاندارد *اشرشیا کولی* سروتایپ Hv:O۱۵۷ با شماره‌ي ۴۳۸۹۴ (*اشرشیا کولی* ۱) و سویه جداسازی و تاییدشده با PCR در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (*اشرشیا کولی*۲) استفاده شد.

جداسازی پلی ساکارید

جداسازی پلی‌ساکارید دیواره سلولی سویه O۱۵۷Hv باکتری *اشرشیا کولی* با استفاده از EDTA (۳) و به اختصار به شرح ذیل انجام شد. ابتدا باكتري‌هاي مورد مطالعه در محيط كشت آبگوشت مغز و قلب (BHI) حاوي يک درصد سوكروز كشت و به مدت يك شب در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد انكوبه شدند. پس از آن، سه بار شست و شوی نمونه‌های حاوی باکتری، سانتریفیوژ در سرعت g ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۰/۱۵ M NaCl انجام شد. جداسازی دیواره پلی‌ساکاریدی با مجاور نمودن باکتری‌ها با بافر فوق به اضافه EDTA ۰/۰۵مولار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جداسازی باقیمانده پروتئین با تغییراتی در روش لیو و همکاران (۹) و با استفاده از گرادیان سوکروز کوشین خالص‌سازی شد. در این روش محلول شش درصدی سوکروز در محلول NaCl ۰/۱۵ مولار تهیه شد و به میزان ۰/۰۶ مولار تریتون-۱۱۴ و ۰/۰۱ مولار تریس به بافر اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سانتیریفیوژ در g ۸۰۰۰ قسمت رویی جدا شد و به باقیمانده آن به میزان نه برابر حجم استون سرد اضافه شد و ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پروتئین‌های نمونه به کمک سانتریفیوژ رسوب داده شدند و قسمت رویی به عنوان محلول حاوی کربوهیدرات خالص برداشت شد. غیرفعال‌سازی LPS با دو ساعت مجاورت در NaOH ۰/۱ مولار انجام شد (۱۵). نمونه‌ها در کیسه دیالیز با حد MWCO ۱۰۰۰۰ و در آب دوبار تقطیر و به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شدند.

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات و پروتئین

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات نمونه‌ها با روش فنل- اسید سولفوریک و پروتئین با روش برادفورد انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات، ۲۵ میکرولیتر از نمونه به ۷۵ میکرولیتر از اسیدسولفوریک خالص مخلوط شد و بلافاصله ۱۵ میکرولیتر فنل پنج درصد به آن اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه قرار دادن در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم، جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (۱۱). براي تهيه منحني استاندارد جهت محاسبه مقدار کربوهیدرات، از گلوکز استفاده شد. جهت تهیه معرف برادفورد ۱۰ ميلي‌گرم كوماسي بريليانت بلو در پنج ميلي ليتر اتانول ۹۵ درصد حل شد و ۱۰ ميلي‌ليتر اسيد ارتوفسفريك ۸۵ درصد به آن اضافه شد حجم با آب مقطر به ۱۰۰ ميلي‌ليتر رسانده شد و با كاغذ واتمن صاف شد. جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین، ۲۰ میکرولیتر از نمونه به محلول حاوی ۱۴۰ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر و ۴۰ میکرولیتر از محلول استاندارد برادفورد اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ با اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. از آلبومین سرم گاو در تهیه نمودار استاندارد استفاده شد (۲۴).

مراحل انجام Urea SDS-PAGE و SDS-PAGE

جهت بررسی الگوی پروتئینی و خلوص LPS جداسازی شده الکتروفورز با روش لائملی و همکاران (۸) با استفاده از ژل متراکم‌کننده‌ی چهار درصد و جداکننده ۱۰ درصد و به صورت معمول انجام شد. آزمون Urea SDS-PAGE مشابه با این روش و مطابق با پورکایاسدا و دیسون (۱۷) جهت بررسی پروفایل پلی‌ساکاریدی انجام شد. در این روش به هر دو ژل جداسازی‌کننده و متراکم‌کننده، به میزان هشت مولار اوره اضافه شد. الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ صورت گرفت. رنگ‌آمیزی ساختارهای پروتئین با استفاده از کوماسی بلو و رنگ‌بری با ترکیب متانول - اسیداستیک در ادامه انجام شد. رنگ‌آمیزی ترکیبات پلی‌ساکاریدی با روش پریودیک اسید شیف (Periodic acid schiff) و به شرح ذیل انجام شد: بعد از شستشو با آب مقطر و یک ساعت ثابت نمودن ژل در محلول هفت درصد اسید استیک گلاسیال، ژل به مدت یک ساعت در محلول ۰/۳ درصد از پریودیک اسید منتقل شد. در ادامه سه مرحله شست و شوی ژل با آب دوبار تقطیر و ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی با محلول رنگ فوشین بازی انجام شد. رنگ‌بری در محلول ۰/۱ درصد تیوسولفات سدیم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

بررسی اثر LPS در تحریک ایمنی هومورال

سی و شش قطعه از ماکیان نژاد راس ۳۰۸ در سن سه هفتگی به صورت تصادفي در ۹ گروه مساوي شامل چهار قطعه تقسيم شدند. چهار دوز از LPS فعال و غیرفعال شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در حجم ۵۰ میکرولیتر به صورت داخل عضله سینه در هر گروه تزریق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از گلبول قرمز گوسفند ۲۰ درصد در سمت مقابل تزریق شد. در گروه کنترل، بافر فسفات سالین استریل و در حجم و روش مشابه

گروه‌های مورد آزمون تزریق شد. در روزهای ۵ و ۱۰ پس از تیمار، خون‌گیری از ورید بال، جداسازی سرم و بررسی عیار آنتی‌بادی ضد گلبول قرمز گوسفند با روش معمول هماگلوتیناسیون انجام شد.

بررسی اثر LPS در ایجاد پاسخ ایمنی نسبت به باکتری منبع با روش الیزا و به شرح زیر انجام شد: پوشانیدن کف حفره‌های میکروپلیت با سه میکروگرم از باکتری سونیکه‌شده اشرشیا کولی به عنوان منبع LPS در بافر کربنات- بی‌کربنات با pH برابر با ۹/۶ و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن پلیت سه بار با بافر فسفات حاوی توئین ۲۰، شستشو شد. نواحی آزاد حفره‌های پلیت با شیر پس از چرخ چهار درصد در حجم ۲۵۰ میکرولیتر و به مدت یک ساعت پوشانیده شد و مشابه قبل شستشو انجام شد. هر نمونه سرم از گروه‌های مورد تزریق با LPS فعال با رقت ۱/۲۰۰ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر و با دو بار تکرار اضافه شد و پس از یک ساعت، شست و شو انجام شد. آنتی IgG ماکیان کنژوگه با آنزیم پراکسیداز محصول شرکت Abcam (ab۹۷۱۳۵) با رقت ۱:۲۰۰۰۰ و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر گوده اضافه شد و پس از یک ساعت شستشو انجام شد. سپس سوبسترای TMB در حجم ۷۰ میکرولیتر به هر گوده اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه محلول اسید سولفوریک یک نرمال به میزان ۷۰ میکرولیتر جهت توقف واکنش اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده پلیت (Accu Reader, Serial No: ۹۶۵۰۱۵۷۵) اندازه‌گیری شد.

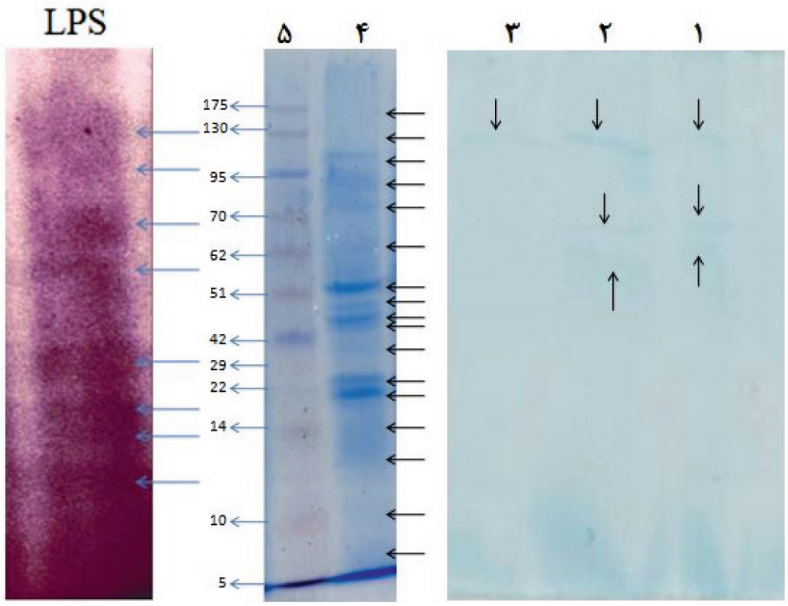
روش آماری

جهت مقایسه نتایج گروه‌های مورد آزمون از روش‌های آمار توصیفی و آزمون t نرم افزار SPSS V ۲۳ استفاده شد. سطح معنی‌دار بودن نتایج با فرض (P<۰/۰۵) درنظر گرفته شد.

نتایج

جداسازی و تخلیص LPS

با توجه به اندازه‌گیری میزان پروتئین و پلی‌ساکارید و بررسی با SDS-PAGE در جداسازی با روش EDTA میزان اندکی پروتئین وجود داشت که در ادامه با استفاده از سانتریفیوژ در گرادیان سوکروز کوشین و رسوب با استون حذف شد. ترکیب این دو روش باهم می‌تواند LPS با خلوص بسیار بالا را فراهم آورد. در شکل ۱ ژل الکتروفرز پلی‌ساکارید



شکل ۱- رنگ آمیزی با کوماسی بلو و پریودیک اسید شیف جهت بررسی الگوی پروتئینی و پلی‌ساکاریدی سویه استاندارد اشریشیا کولی سروتایپ O157:H7. در ژل سمت راست ردیف‌های یک، دو و سه: LPS استخراج شده با روش EDTA در سه تکرار با رنگ آمیزی کوماسی بلو نشان داده شده است. باندهای پروتئینی *اشرشیا کولی* در ژل مرکزی ردیف شماره چهار با رنگ آمیزی کوماسی بلو و باندهای موجود در LPS باکتری *اشرشیا کولی* با روش رنگ آمیزی PAS در ژل سمت چپ نشان داده شده است؛ باندها با نشانگر مشخص شده‌اند. همان‌گونه که در ژل سمت راست مشخص شده است، استخراج LPS با روش ETDA دارای مقداری ناخالصی پروتئینی است که در ادامه با استفاده از سانتریفیوژ در گرادیان سوکروز کوشین و رسوب با استون این باندها حذف شدند. ردیف پنجم وزن ملکولی باندهای پروتئینی مارکر را نشان می‌دهد.

و پروتئین سویه استاندارد *اشرشیا کولی* سروتایپ HV:O۱۵۷ نشان داده شده است.

بررسی اثر بر پاسخ ایمنی هومورال

همان‌گونه که در جداول یک و دو نشان داده شده است، تزریق دوزهای ۱۰ و ۲۵ میکروگرم از لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشرشیا کولی* به صورت معناداری ($p < ۰/۰۵$) سبب افزایش عیار آنتی بادی نسبت به گلبول قرمز گوسفند شد. لیپوپلی‌ساکارید غیر فعال ۱۰ روز پس از تزریق میزان ۱۰۰ میکروگرم، سبب افزایش غیر معنادار عیار آنتی بادی شده است.

بحث

در این مطالعه استفاده از دوزهای ۱۰ و ۲۵ میکروگرم از لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشرشیا کولی* سبب افزایش معنادار پاسخ ایمنی هومورال ماکیان شد؛ درحالی که تجویز ۱۰۰ میکروگرم از LPS منجر به سرکوب این پاسخ نسبت به گلبول قرمز گوسفند شد. در مطالعات پیشین تحریک سیستم ایمنی سایر موجودات با به کار بردن لیپوپلی ساکارید باکتری‌های مختلف و آنتی‌ژن‌های متنوع مورد بررسی قرار گرفته است که موافق با نتایج حاصل از مطالعه کنونی است. از جمله

جدول ۱- عیار آزمون هماگلوتیناسیون در بررسی اثر LPS فعال بر تحریک پاسخ ایمنی هومورال ماکیان نسبت به گلبول قرمز گوسفند. تغییرات معنادار با حروف متفاوت نشان داده شده است ($p < ۰/۰۵$). در مقادیر ۱۰ و ۲۵ میکروگرم تغییر معنادار در پاسخ ایمنی هومورال وجود دارد. با افزایش میزان LPS تجویز شده اثر تحریکی کاهش یافت و در گروه مورد تجویز با ۱۰۰ میکروگرم اثر ممانعتی مشاهده شد.

میزان LPS	۰	۱۰	۲۵	۵۰	۱۰۰
عیار ۵ روزگی	۱۰a	۸۰b	۲۰a	۱۵a	۱۰a
عیار ۱۰ روزگی	۲۰a	۲۴۰ c	۸۰b	۲۰a	۱۰a

جدول ۲- عیار آزمون هماگلوتیناسیون در بررسی اثر LPS غیرفعال بر تحریک پاسخ ایمنی هومورال ماکیان نسبت به گلبول قرمز گوسفند. تغییرات معنادار با حروف متفاوت نشان داده شده است ($p < ۰/۰۵$). تغییر معناداری در پاسخ ایمنی هومورال گروه‌های مختلف وجود ندارد؛ هرچند در گروه مورد تجویز با ۱۰۰ میکروگرم افزایش مشخص پاسخ مشاهده شد.

میزان LPS	۰	۱۰	۲۵	۵۰	۱۰۰
عیار ۵ روزگی	۱۰a	۱۰a	۱۰a	۱۰a	۱۵a
عیار ۱۰ روزگی	۲۰a	۲۰ a	a ۱۵	۲۵a	۴۰a

تفاوت معناداری ($p < ۰/۰۵$) در تغییر عیار آنتی‌بادی نسبت به باکتری *اشرشیا کولی* در گروه‌های دریافت کننده میزان متفاوت از لیپوپلی‌ساکارید فعال مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین میزان جذب نوری آزمون الیزا جهت عیار سنجی آنتی بادی نسبت به باکتری *اشرشیا کولی* در ماکیان تیمار شده با چهار دوز از لیپوپلی‌ساکارید فعال. تفاوت معناداری در گروه‌های مختلف وجود ندارد؛ هرچند عیار طبیعی آنتی‌بادی ضد *اشرشیا کولی* در همه گروه‌ها وجود دارد.

میزان LPS	۰	۱۰	۲۵	۵۰	۱۰۰
عیار ۵ روزگی	۰/۶a	۰/۶۹a	۰/۵۶a	۰/۶۴a	۰/۵۹a

این موارد می‌توان به استفاده از LPS در واکسن‌های مالاریا و لیشمانیای انسان اشاره کرد که منجر به بهبود پاسخ ایمنی شده است (۲۰، ۲۳). همچنین استفاده از LPS باکتری *بروسلا ابورتوس* سبب ایجاد تیتر بالاتر نسبت به توکسوئید کزاز شده است (۱۳). در تحقیقی دیگر، استفاده از لیپوپلی‌ساکارید سبب افزایش معنادار تیتر آنتی‌بادی نسبت به پروتئین L۱ پاپیلوما ویروس انسانی-۱۶ شده است (۱۹). کنژوگه کردن LPS باکتری نایسریا مننژایتیدیس با توکسوئید کزاز منجر به افزایش معنادار پاسخ ایمنی هومورال شده است (۲). تزریق LPSباکتری سالمونلا همراه با گاماگلبولین مرغ به موش سبب تحریک بیشتر ایمنی هومورال و تولید آنتی‌بادی‌های حساس و مقاوم به مرکاپتواتانول می‌شود (۱۸). تحریک تولید سایتوکاین‌های محرک سیستم ایمنی را می‌توان مهم‌ترین دلیل این اثر تحریکی دانست (۵). در تحقیق‌های پیشین داخلی نیز به افزایش معنادار اینترفرون گاما (IFNy) متعاقب تجویز LPS به موش اشاره شده است (۶).

در این مطالعه، تجویز LPS غیرفعال اثر ناچیزی در تحریک پاسخ ایمنی ماکیان داشته است که در موافقت با نتایج برخی از تحقیق‌های پیشین است که از جمله اثر ماندگارتر LPS در تحریک لنفوسیت‌های T، نسبت به مشتقات آن گزارش شده است (۲۱). تجویز ۳۰ میکروگرم از لیپوپلی‌ساکارید فعال و غیرفعال شده بروسلا آبورتوس منجر به افزایش معنادار پاسخ ایمنی نسبت به این باکتری در موش شده است که این افزایش تیتر در گروه تیمار شده با LPS فعال بیشتر بوده است (۱۵). تفاوت نتایج این تحقیق با مطالعه کنونی را می‌توان در منبع متفاوت LPS و شرایط جداسازی و تخلیص جست‌وجو نمود. همان‌گونه که گزارش شده است که لیپوپلی - ساکارید استخراج شده با روش فنل-کلروفرم-اترپترلیوم (Phenol-Chloroform-Petroleum Ether Extraction) دارای اثر میتوژنی بیشتری نسبت به LPS استخراج شده با روش متانول-کلروفرم بوده است (۲۰). از بین رفتن و یا کاهش قدرت آنتی‌ژنی لیپید A در طی مراحل فرآوری و غیرفعال‌سازی را می‌توان مهم‌ترین دلیل این مشاهده دانست. تغییر در روش‌های غیرفعال‌سازی می‌تواند منجر به شناخت راهکارهایی جهت حفظ قدرت آنتی‌ژنی LPS در حین این فرایند شود. با توجه به این‌که استفاده از لیپوپلی‌ساکارید فعال به عنوان تحریک‌کننده پاسخ ایمنی در سطح مزرعه نیازمند بررسی اثرات بالقوه مضر و جانبی است؛ در برخی مطالعات به اثرات تب‌زایی آن اشاره شده است (۱۰).

در مطالعه کنونی، تزریق LPS باکتری اشرشیا کولی تغییری در عیار آنتی‌بادی نسبت به این باکتری ایجاد نکرده است، هر چند تجویز سه دوز ۱۰ میکروگرمی از لیپوپلی‌ساکارید باکتری لژیونلا پنوموفیلا با فاصله دو هفته منجر به محافظت در برابر دوز کشنده این باکتری شده است (۱۴). تفاوت در تعداد دفعات تزریق را می‌توان مهم‌ترین دلیل این تفاوت دانست؛ هرچند تفاوت در باکتری منبع، گونه حیوانی مورد آزمون و شرایط آزمایش نیز در این امر تاثیرگذار است.

در این مطالعه کمترین میزان استفاده‌شده از LPS باکتری اشریشیا کولی ۱۰ میکروگرم بود، که با توجه به نتایج حاصل‌شده دارای بیشترین اثر تحریکی در ماکیان بود. با توجه به یک‌بار تجویز دوزهای ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم از LPS فعال و عدم مشاهده تغییر در عیار آنتی‌بادی باکتری منبع، استفاده از LPS به عنوان واکسن اشرشیا کولی پیشنهاد نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از حوزه‌ی پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که از این مطالعه در قالب تسهیلات پژوهشی حمایت نمودند.

منابع مورد استفاده

1- Abbas, A.K., A.H. Lichtman and J.S. Pober. 2000. Cellular and Molecular immunology. Philadelphia London New York. W B Saunders company 204-205.

2- Balboa, J.A., M. Cuello., O. Cabrera., J. Del Campo., M. Lastre., D. Gil., C. Taboada., M. Frinas., M. Hernandez. and O. Perez. 2006. Adjuvant properties of lipopolysaccharide from Neisseria meningitides serogroup B detoxified and conjugated with tetanus toxoid. *Vaccine* 24: 63–64.

3- Brimacombe, C.A. and J.T. Beatty. 2013. Surface Polysaccharide Extraction and Quantification. *Bio Protocol*, 3(20), http://www.bio-protocol.org/e934.

4- Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis, *Nature* 420: 885-891.

5- Dobrovolskaia, M.A. and S.N. Vogel. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection* 4: 903–914.

6- Esmaeili, D., M.A. Mobarez., H.A. Salmanian., A. Zavaran. and M. Mahdavi. 2010. Synergistic effect of rCagA and LPS of H. pylori O2 serotype in induction of proper immune response against H. pylori. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 8 (1): 1-5 [Persian].

7- Fiske, J.M., A. Ross., R.K. VanDerMeid. and J.C. McMichael. 2001. Arumugham. Method for reducing endotoxin in Moraxella catarrhalis UspA2 protein preparations. *Journal of Chromatography* 753: 269-278.

8- Laemmli, K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

9- Liu, X., H, Nie., Y, Zhang., Y, Yao., A, Maitikabili., Y, Qu., S, Shi., C, Chen. and Y, Li. 2013. Cell Surface-Specific N-Glycan Profiling in Breast Cancer. *Plos One* 8, e72704.

10- Malekpour, A., M. Hedayati., H.R. Ahmadi Ashtiani., M. Rahbar. and H. Rastegar. 2001. Extraction and purification of *Salmonella enteritidis* lipopolysaccharide and evaluation of the pyrogenic effects in rabbit. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 5(7): 7-13 [Persian].

11- Masuko, T., A. Minami., N. Iwasaki., T. Majima., S. Nishimura. and Y.C. Lee. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* 339: 69–72.

12- Maxwell, J.R., C. Ruby., N.I. Kerkvliet. and A.T. Vella. 2002. Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity. *Journal of Immunology* 168: 4372–4381.

13- Mohammadi, M., Z. Kianmehr., S. Kaboudanian-Ardestan. and B. Gharegozlou. 2014. Improved immunogenicity of tetanus toxoid by *Brucella abortus* S19 LPS adjuvant. *Iranian Journal of Immunology* 11: 189-199.

14- Motahari Nia, U., R. Shapouri., M. Rahnama., M. Ali Ramaei. and M.A. Rezaei. 2001. Evaluation of the immune protection of lipopolysaccharide and protein fraction of *Legionella pneumophila* bacteria in mice exposed to lethal doses of this bactria. *Kordestan Journal of Medical Sciences* 16: 20-30 [Persian].

15- Pakzad, A., A. Rezaei., M.J. Rasaei., A. Zavaran-Hosseini., A. Kazemnejad., B. Tabaraei. and S. Rivandi.. 2007. Evaluation of the biological and immunological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharide. *Journal of Ilam University of Medical Sciences* 15(2): 14-19 [Persian].

16- Petrovsky, N. and J.C. Aguilar. 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and Cell Biology* 82: 488-96.

17- Purkayastha, R.R. and R. Dyson. 1965. Location of the carbohydrate-containing fraction of κ-Casein after gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science* 48: 1419-1422.

18- Seppala, I.J.T. and O. Makela. 1984. Adjuvant effect of bacterial LPS and/or alum precipitation in responses to polysaccharide and protein antigens. *Immunology* 53: 827-836.

19- Soleimanjahi, H., S. Kaboudanian Ardestani., Z. Kianmehr. and F. Fotouhi. 2014. International Conference on Chemical, Agricultural, and Biological Sciences (ICCABS). Antalya, Turkey 9 -10.

20- Tavakol Afshari, J., A. Sadeghian. and M. Khalili. 2001. Lipopolysaccharide extraction from *E. coli* cell wall and assess the mitogenic capabilities on B lymphocyte by MTT evaluation. *Modares Journal of Medical Sciences* 7(1): 39-48 [Persian].

21- Thompson, B.S., P.M. Chilton., J.R. Ward., J.T. Evans. and T.C. Mitchell. 2005. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4T cells. *Journal of Leukocyte Biolog*y 78: 1273-1280.

22- Ulevitch. R.J. and P.S. Tobias. 1999. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Current Opinion in Immunology* 11: 19–22.

23- Velez, I.D., K. Gilchrist., S. Martinez., J.R. Ramirez-Pineda., J.A. Ashman., F.P. Alves., R.N. Coler., L.Y. Bogatzki., S.J. Kahn., A.M. Beckmann., K.D. Cowgill., S.G. Reed. and F.M. Piazza. 2009. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 28: 329-337.

24- Walker, J.M. 2002. The protein protocols handbook. 2nd ed. New Jersey, Humana Press 15-21.

25- Wang, X. and P.J. Quinn. 2010. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research* 49: 97–107.