مجله دانشکدهٔ دامپزشکی ،دانشگاه‌تهران ، دورهٔ (۴۶) شمارهٔ (۱) تهران (۱۳۷۰)

اثرات تیموزین وتافسین کنژوگه برسیستم ایمنی بدن گاو

دکتر نعمت اللهخوانساری* ; دکتر محمدعلی راد** ; پرویز جعفری***

خلاصه فارسی:

بنظرمی‌رسد که‌اتصال مولکول‌های‌تافسین‌وتیموزین آلفا بصورت کنژوگه (آمیخته) نیز فعالیت بیولوژیکی مواد تشکیل‌دهنده خودراحفظ می‌کند . ترکیب جدید ، آمیخته ای از تیموزین ـ آلفا و تافسین می‌باشد که اثرات تقویت کننده را هم برروی لمفوسیت های T و هم روی مونوسیت ها دارا می‌باشد . بنابراین ترکیب جدید (#IMP-1) می‌تواند به‌عنوان‌یک‌ماده فعال کننده وتنظیم کننده سیستم ایمنی در افراد ویا حیواناتی که دچار تضعیف سیستم ایمنی بدن شده‌اند موثر واقع شود . اثرات کنژوگه تافسین و تیموزین آلفا که هم در INVITRO و هم در INVIVO موردبررسی‌ومطالعات تجربی قرار گرفته است به تفصیل طی این مقاله گزارش وارائه می‌شود .

مقدمه:

بسیاری ازبیماریهای‌عفونی‌در گاوهای گوشتی‌وشیری دراثر عوامل متعدد بیماریزا ایجادمی‌گردد .عموما "حیواناتی‌که‌تحت تاثیراسترس های فیزیکی‌ویامحیطی واقع می‌شوند بیش از سایرین مستعد ابتلاء به عفونتهای ویروسی ویا باکتریائی می‌باشند . این‌موضوع بویژه درارتباط بابیماری تنفسی پیچیده‌گاوها (BRD+) بیشترمصداق داردواین بیماری در برخی از کشورها خسارات اقتصادی زیادی ازنظر کاهش تولیدات دامی (شیر وگوشت) ایجاد می‌نماید (۲۱) .میزان خسارات‌وارده ازاین بیماری را تنها در ایالات متحده‌امریکا

---

* دپارتمان علوم دامپزشکی ومیکروبیولوژی ـ دانشگاه ایالتی داکوتای شمالی ایالات متحده امریکا .

** گروه آموزشی علوم درمانگاهی ـ دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران .

*** آزمایشگاه ایمونوبیولوژیک ـ نیویورک

#IMMUNOPOTENTIATOR-1

+Bovine Respiratory Disease Complex

سالانه بالغ برپانصد ملیون دلار برآورد نمونه‌اند (۲۱).

بیماری تنفسی پیچیده گاوها که‌عموما" تحت عنوان "تب حمل ونقل *" نیز معروف‌است اختصاصا" در بین گوساله‌هائی که تازه از شیر گرفته شده‌اندو بالافاصله برای چرای در مراتع باکامیون‌به‌نقاط دیگری منتقل می‌شوند بروزمی‌نماید .علیرغم تهیه وتولید واکسن های‌گوناگون برای مقابله با بیماری BRD ویا پیشگیری از آن که معمولا" متعاقب نقل مکان دامهابروز می‌کند وبا وجود استفاده از آنتی‌بیوتیک های مختلف بمنظور درمان BRD تاکنون استراتژی‌موفقیت‌آمیزی‌ازنظر نحوه کنترل بیماری مذکور طراحی نشده‌است .

علائم بالینی ، جراحات آسیب شناسی و میزان مرگ و میر ناشی از تب حمل و نقل گاوها وگوساله‌ها عموما" به ذات الریه (پنومونی**) باکتریائی ارتباط دارد که این نوع ذات‌الریه در اثر باکتریهائی نظیر پاستور لاهمولی تیکا***، پاستولامولتوسیدا (P. multocida) ویا هموفیلوس‌سامنوس (H.Somnus)و چندین‌عامل ویروسی‌ایجاد می‌شود (۱۷) .عوامل فوق‌الذکر معمولا" چنانچه سیستم دفاعی بدن دامها تضعیف نشده باشد چندان‌بیماریزانیستند (۱۳)و همانطور که برخی‌از محققین پیشنهاد می‌کنند تضعیف سیستم ایمنی بدن (Immunosuppression) یکی از عوامل مهم در بیماریزائی و بروز علائم بالینی بیماری حمل ونقل گاو می‌باشد (۵) .

شواهد علمی بسیاری وجود دارد که‌حاکی از نقش مهم استرس در بروز بیماری BRD می‌باشد . استرس های فیزیکی وعوامل محیطی استرس آفرین در چگونگی تضعیف سیستم ایمنی بدن دخالت موثر دارند وحساسیت میزبان را در مقابل عوامل عفونی افزایش می‌دهند (۸) .

عفونتها را می‌توان هم از طریق تجویز مستقیم دارو وهم از طریق استفاده از عوامل اختصاصی وغیر اختصاصی تقویت کننده های سیستم ایمنی که بدن میزبان‌به آنها پاسخ می‌دهد ، تحت کنترل قرار داد .

بسیاری‌ازدانشمندان ومحققین طی‌سالهای‌اخیر کوششهای مستمری بعمل‌آورده‌اند

---

* Shipping Fever ** Pneumonia

*** Pasteurella hemolytica

تا با استفاده از تقویت‌کننده های جدید سیستم ایمنی (که از طریق مهندسی ژنتیک تهیه می‌شوند)مکانیزم تضعیف‌کننده سیستم ایمنی‌بدن را از بین برده ومانع از بروز بیماریهای توام با استرس شوند . این تلاشها نتایج امید بخشی را به همراه داشته است (۱ و ۱۳ و ۱۷) . این مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از تقویت کننده‌های سیستم ایمنی ممکن است درآینده نزدیکی استراتژی موثری را در پیشگیری ودرمان "تب حمل‌ونقل" گاوها یاBRD نوید دهد .

برای استفاده ازاین استراتژی لازم است قسمت های عمده سیستم ایمنی که‌نقش آنهابرای دفاع بدن در مقابل عوامل بیماریزا ضروری می‌باشد بخوبی شناخته شوند .این قسمت ها همان نواحی تقویت کننده‌های سیستم ایمنی هستند . با شناخت این عوامل اساسی می‌توان بین عناصر تشکیل دهنده شبکه سیستم ایمنی وتقویت کننده های سیستم ایمنی ارتباط بسیار زیادی ایجاد کرد . البته همه قسمتهای شبکه سیستم ایمنی بدن‌بطور مستقیم باعوامل بیماریزا مقابله می‌کنند .این موضوع در مواقعی که روی اثر مستقیم عوامل بیماریزا کار می‌شود بایستی مورد توجه خاص قرار گیرد . در برخی از بیماریها نظیر تب حمل ونقل گاو، عوامل استرس آفرین ممکن است بصورت یک‌چکاننده عمل کرده و اثرات بیماریزای باکتریهاویاویروسهائی راکه‌درحالت عادی عفونت زا نیستند تشدید کنند .لذا میزان تحریک شبکه تنظیم‌کننده وتقویت‌کننده سیستم‌ایمنی‌بدن بویژه‌قسمتهای پاسخهای غیراختصاصی سیستم‌ایمنی‌بدن بایستی بطورمتناسب وبادقت خاص مورد توجه قرارگیرد .

در عفونت های دستگاه تنفس، در بین عوامل موثر غیر اختصاصی که خط مقدم سیستم‌دفاعی بدن راتشکیل می‌دهندلازم است ازنوتروفیل ها وماکروفاژها نام برد .وقتی این سلولهای دفاعی تحریک و فعال شوند هر نوع آنتی‌ژن را بلعیده ونابود می‌کنند (پدیده فاگوسیتوز یا بیگانه خواری) .

لمفوسیت های $_T$ و مواد مترشحه از آنها نقش حیاتی وعمده‌ای‌را در فعال کردن ماکروفاژها ایفا می‌نمایند (لمفوسیت های $_T$در اینجا به عنوان اثر کننده ها یا Effector cells عمل می‌کنند) .این‌نوع لمفوسیت ها قادرند که هم واکنش‌های اختصاصی‌راکه توسط سلولهای‌حافظه‌ای‌سیستم ایمنی(B. cells) عمل می‌کنند تحریک کنند و هم‌اینکه‌باایجاد واکنشهای غیر اختصاصی از قبیل ایجاد پادتن های چند بنیانی (Polyclonal) عمل دفاعی بدن را شروع کرده وعامل را از بین ببرند . از این نوع

ارتباط که در شبکه سیستم ایمنی بدن‌وجود دارد می‌توان استفاده کرد و هم سلولهای بیگانه خوار (ماکروفاژها) و هم لمفوسیت هایT رافعال نمود . برای مثال اینترلوکین ـ ۲ (IL - 2 *) که بوسیله سلولهای کمک کننده (T- helper cells ترشح می‌شود سلولهای بیگانه خوار را فعال می‌کند . این عمل یا بطور غیر مستقیم با تولید عامل فعال کننده ماکروفاژها (MAF **) و یا بازهم بطور غیرمستقیم با تولید عامل مهار کننده مهاجرت لوکوسیت ها (MIF ***) وگاهی بوسیله هردو مکانیزم صورت می‌گیرد و موجب فعالیت سیستم دفاعی بدن می‌شود . از طرفی انترفرون گامـــا ـ (Interferonγ) می‌تواندبطور مستقیم سلولهای بیگانه خوار را فعال نماید . بسیاری از تنظیم کننده‌های پاسخ ایمنی که در حال حاضر برای جلوگیری ودرمان‌تضعیف سیستم ایمنی بدن بکار می‌روند به دودسته فوق الذکر طبقه بندی می‌شوند . طی چند ساله اخیر هم در پزشکی وهم‌در دامپزشکی دوماده اینترلوکین ـ ۲ وانترفرون ـگاما بیشترین توجه دانشمندان و محققین ایمونولوژی را به عنوان‌تنظیم کننده های پاســخ بیولوژیکـــی (BRM ****) جلب نموده‌اند مهمترین محدودیت کاربردی این تنظیم کننده هـــا سمیت سلولی وگران بودن آنهاست . اگرچه‌با پیشرفت علم مهندسی ژنتیک وتکنولوژی وابسته به‌این‌علم عیب دوم‌تاحدودی رفع شده است ولی مشکل سمی بودن آنها برای سلولها بویژه در مواقعی که ممکن است با دوزاژ بالا مورد استفاده قرار گیرند همچنان لاینحل باقی مانده است . بروز عوارض جانبی شدید که متعاقب تجویز این دو ماده در طولانی مدت پیش می‌آید موجب‌شده است تا برای کشف مواد دیگری تحقیقات وتلاشهای زیادی بکار گرفته شود . پروتئین های هیبرید مصنوعی با توجه به اختصاصی بودن سنتز و ترکیب هورمون ها ، پادتن ها وتوکسین های دیفتری توسط مولتن وهمکاران (۱۶) ، چانگ ونویل (۲) ویول‌ونویل (۲۲)به ترتیب در سالهای ۱۹۷۰، ۱۹۷۷ و ۱۹۸۰میلادی معرفی و گزارش‌شده‌اند . براساس این تحقیقات اخیرا" در آزمایشگاههای ایمونوبیولوژی

---

* INTERLEUKIN - 2 (IL - 2)

** Macrophage Activating Factor

*** Migration Inhibition Factor

**** Biological Response Modifier(BRM)

\+ Maleimido Benzoy - N - Hydroxy Succinimide(MBS)

دانشگاه یالتی داکوتای شمالی و نیویورک از ترکیب تافسین وتیموزین ـ آلفا و بااستفاده از MBS+ به‌عنوان کنژوگه ماده جدیدی بدست آمده است که دراینجا اثرات آن برسیستم ایمنی بدن گاو مورد مطالعه و بررسی قرار می‌گیرد .

این ماده البته یک تقویت کننده غیر اختصاصی سیستم ایمنی می‌باشد . نتایج مطالعات اخیرنشان داده است که این مخلوط هم در محیط آزمایشگاهی (IN VITRO) و هم در حیوان زنده (IN VIVO) می‌تواند ماکروفاژها ولمفوسیت های T را تقویت کند . طی مقاله حاضر اثرات تیموزین آلفا وتافسین کـــه بطور کنژوگه درآزمایشگاه بدست آمده برسیستم ایمنی بدن گاو بشرح زیر مورد مطالعه وبحث قرار می‌گیرد .

اول ـ مواد و روشهای کار در آزمایشگاه (INVITRO)

الف ـ روش تهیه آمیخته نهائی: تیموزین ـ آلفا* و دی متی‌فورمامید** از شرکت سیگما*** خریداری شد .تافسین درآزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه ایالتی داکوتای شمالی (N D S U) و براساس روش Gottlieb و همکاران سنتز وخالص شد (۷) . معرف MBS که به‌عنوان Cross-linker بکاررفت ازشرکت شیمیائی پیرس **** خریداری شد . سفادکس از سوئد***** خریداری شد . معرفهای الکتروفوروز آکریلامیـــد ، از آزمایشگاههای بیوراد+ تهیه و خریداری شد . مقدار چهار میلی‌گرم از ماده خالص شده تیموزین آلفاکه توسط دستگاه HPLC+++ تصفیه وخالص شده بود در ۳ میلی لیتر محلول فسفات سدیم ده میلی مول (NA2Po4/10mM) با pH برابر با ۷/۵ و با استفـــاده از Vortex (بهمزن الکتریکی) با چهارصد میکرولیتر (400 µ l.) دی متافورمامیـــد

+ Maleimido Benzoy - N - Hydroxy Succinimide(MBS)

* THYMOSION -a ** DIMETHY FORMAMIDE

***SIGMA CHEMICAL CO, ST. LOUIS, MO., USA.

****PIERCE CHEMICAL CO., ROCKFORD, ILL., USA

*****PHARMACIA-FINE CHEMICAL CO., UPPSALA, SWDEN

++BIO - RAD LABORATORIES, RICHMOND, CALIFORNIA, USA

+++HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

محتوی MBS باغلظت ۲/۵ میکروگرم در 2.5µg.1ml. مخلوط شد . مخلوط بدست آمده برای مدت‌نیم ساعت درگرمخانه ۲۱ درجه سانتیگراد قرارگرفت و سپس از ستون سفادکس G-25 برای تصفیه قسمت اضافی MBS عبور داده شد . کیفیت MALEIMIDE براساس روش Liu (۱۵) وO'Sullivan (۱۹) تعیین گردید مقدارششصد میکروگرم تافسین باچهار صدمیکرولیتر محلول نمکی فسفات بافر + مخلوط گردید ودرحالیکه‌از Vortex استفاده می‌شد مقدار ۱۳ میکرولیتر محلول MBS به آن اضافه شدو برای مدت دو ساعت درگرمخانه ۲۱ درجه سانتیگراد قرار گرفت . پس از اتمام زمان‌انکوباسیون‌این مخلوط به مخلوط تغییر یافته ، تیموزین آلفا اضافه شد و برای مدت سه ساعت درگرمخانه ۲۱ درجه سانتیگراد قرار گرفت . پس از اتمام‌زمان انکوباسیون‌مخلوط حاصله به کمک PBS ودر دمای ۴ درجه سانتیگراد از کیسه دیالیز سه هزار دالتونی برای مدت یک شب (۱۲ ساعت)تصفیه ودیالیز شد . ترکیب آمیخته تیموزین آلفا وتافسین بادستگاههای HPLC و G-C (گازکروماتوگرافی) مورد ارزشیابی قرارگرفت تا ازنظر کیفی برای انجام آزمایشات بعدی روی محیط کشت سلولی ولمفوسیت های Tومونوسیت‌ها اطمینان لازم‌حاصل شود . به ترکیب نهائی حاصله بمنظور سهولت از این پس IMP-1 اطلاق می‌شود که معادل فارسی آن را می‌توان "ماده فعال کننده وتنظیم کننده سیستم ایمنی" نامگذاری نمود .

ب ــ روش تعیین اثر IMP-1 برمونوسیت ها :

خون محیطی از یک راس گاو هوشتاین به ظاهر سالم با حضور هپارین جمع‌آوری شد . مونوسیت‌ها ازلمفوسیت‌ها مطابق باروشی که‌توسط خوانساری وهمکاران گزارش شده است‌وبا استفاده‌ازروش خاص سانتریفوژ ELUTRIATION ازخون‌هپارینه‌جداشدند (۱۲) . میزان خلوص مونوسیت‌های‌جداشده‌بیش از ۹۷ درصد بارنگ آمیزی غیر اختصاصی استراز (ESTERASE)تعیین گردید .با این روش فعالیت بیولوژیکی مخلوط تافسین و تیموزین آلفا روی ایمونوسیت‌های گاوی‌مشخص شد که‌نتایج آن در جدول شماره (۱) ارائه‌شده‌است .

۱ ــ روش کار آزمایش Chemotaxis :

+ PHOSPHATE BUFFER SALINE

آزمایش جاذبه شیمیائی (Chemotaxis) ترکیب IMP - 1 با استفاده از Blind well chamber و با روش Pike وSynderman انجام شده (۲۰). مونوسیت‌هادر سطح فوقانی محفظه‌قرار گرفتند . در حالیکه IMP-1 و محیط فعال‌کننده جاذبه شیمیائی ویا محیط‌کشت سلولی به‌تنهائی (کنترل) در سطح تحتانی محفظه قرار داده شد .بعداز ۹۰ دقیقه انکوباسیون درگرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد ، فیلترها ثابت و رنگ‌آمیزی شدند وپس ازمشاهده‌میکروسکوپی‌تعداد متوسط سلولها در هر حوزه میکروسکپی شمارش و ثبت گردید . نتایج این آزمایش در جدول شماره (۱)گزارش شده‌است .

۲ ــ روش تعیین فعالیت فاگوسیتیک (بیگانه خواری) :

فعالیت‌بیگانه‌خواری مونوسیت‌ها با حضور IMP-1 بوسیله افزودن مونوسیت‌ها برمحیط تنها (کنترل)ویابرمحیط حاوی IMP-1 مورد ارزیابی قرار گرفت . سوسپانسیون زنده استافیلوکوک طلائی (Staphylococcus aureus) به مخلوط اضافه شد و محیط‌کشت به‌مدت ۳۰ دقیقه ،درگرمخانه ۳۷درجه‌سانتیگراد قرار گرفت .پس ازانکوباسیون ، باکتریهای زنده‌ای‌که‌باقیمانده بودند شمارش ومیزان درصدباکتریهای زنده برطبق فرمول زیر تعیین و محاسبه و ثبت گردید :

$$\frac{\text{باکتریهای زنده انکوباته بامونوسیت ها}}{\text{باکتریهای زنده انکوباته بدون مونوسیتها}} = \text{درصد باکتریهای زنده مانده}$$

نتایج این آزمایش درجدول شماره (۱)منکس است .

۳ ــ روش تولید اینترلوکین ها :

تولید اینترلوکین (IL-1) توسط مونوسیت‌ها در پاسخ به‌لیپوپلی ساکاریدها باحضورویابدون حضور (LPS) در این طرح‌براساس روشی‌که خوانساری‌و همکاران درسال ۱۹۸۵ شرح داده‌اند انجام گرفت (۱۱) . برای تعیین مقدارIMP-1تولید شده از روش Conlon استفاده شد (۴ و ۳) .

ج روش تعیین اثر IMP-1 برلمفوسیت‌های T :

از آنجا که یکی‌ازاجزاء مولکولIMP-1 تیموزین آلفا ــ ۱ می‌باشد ، در این

طرح با توجه به اینکه تیموزین آلفا خود یک فعال کننده T-cell است ، اثر ترکیب جدید نیز برفونکسیون لمفوسیت های T بشرح زیر مورد مطالعه قرار گرفت :

۴ – BT** ASSAY – لمفوسیت های جدا شده از مونوسیت‌ها با حضور فیتوهماگلوتینین* (P H A) که یک میتوژن (MITOGEN) با منشاء گیاهی و فعال کننده T-Cell است کشت داده شدند . سپس‌مطابق با روشی که درجای دیگر شرح داده شده است Thymidine- (3-H) را که‌درواقع یک نوکلئوتید رادیواکتیو شده است به محیط کشت اضافه شد (۱۰ و ۹) . مکانیزم اثر این آزمایش بطور خلاصه آنست که تیمیدین در سنتز DNA لمفوسیت‌ها شرکت نموده و DNA سلول‌جدیدنشاندار می‌شود . مقدار DNA نشاندار نسبت مستقیم با تعداد سلولهای T.Blast خواهد داشت که توسط دستگاه بتاکانترتعیین‌می‌شود وبصورت‌شمارش‌رادیوایزوتوپ‌در هر دقیقه(cell per minute) ثبت می‌گردد .

۵ – MLC*** -Assay مطالعه‌سنجش‌واکنش‌کشت لمفوسیت‌های مخلوط غیر همگن (لمفوسیت‌های افراد غیرهمخون که‌از نظرژنتیکی Allogenic گفته می‌شوند) به نحو گسترده‌ای در انسان وحیوانات به منظور سنجش واکنش ایمنی سلولی (CMI#) توسط Ling وهمکاران‌درسال ۱۹۸۱ شرح‌داده شده است (۱۴) .دراین آزمایش معمولا" سلولهای سیتوتوکسیک تحریک وتکثیرمی‌شوند .این سلولها ،سلولهای توموری یاسلولهای حاوی ویروس ها را نابود می‌کنند . میزان تکثیر این لمفوسیت‌ها را می‌توان توسط Thymidine- (3-H) در پاسخ به لمفوسیت های T غیر همگن (Allogenic) و با استفاده از دستگاه بتاکانتر طبق روشی که توسط خوانساری و همکاران در سال ۱۹۸۳ شرح داده شده است تعیین نمود (۹) .

۶ – سنجش تولید لمفوکین ها – لمفوسیت‌های خون محیطی‌با حضور ۲ میکرو گرم PHA در هر میلی لیتر به‌تنهائی ویا با حضور IMP-1 کشت داده شدند . بعداز ۴۸ ساعت‌انکوباسیون ، سلولها‌ازمحیط کشت‌بوسیله‌سانتریفوژجدا شدند محیط کشت جداشده .

---

* PHYTO HEMAGGLUTININ (PHA) ** BLAST TRANSFORMATION ASSAY

CELL MEDIATED IMMUNITY ***'MIXED LYMPHOCYTE CULTURE ASSAY

برای سنجش میزان اینترلوکین - ۲ (IL-2) با روش Gillis و همکاران اندازه‌گیری شد (۶) . میزان تولید انترفرون در محیط کشت که بعداز کشت از سلولها جدا شده بود با سانتریفوژ وبا روش Radio Immuno assay تعیین گردید .

دوم ـ مواد و روشهای کار در داخل بدن (INVIVO) :

مطالعه اثراین‌ماده تقویت‌کننده ایمنی (IMP-1)، روی گاوهائی که‌با تزریق دارو سیستم‌ایمنی‌آنان‌تضعیف شد ،اخیرا " در دپارتمان علوم دامپزشکی و میکروبیولوژی دانشگاه ایالتی داکوتای شمالی شروع شده است . در مطالعات تجربی مقدماتی تعداد ۱۸ راس گاو نژاد هوشتاین (Holstein) به سه‌گروه هر گروه ۶ راس تقسیم ودر محیط های جداگانه‌ای‌نگهداری‌شدند .به‌گروههای اول و دوم داروی دگزامتازون (Dexamethason) بمقدار چهل میکروگرم به ازاء هر کیلو وزن زنده‌دام‌روزانه‌به مدت سه‌روزاز طریق عضلانی تزریق شد .به گاوهای گروه سوم فقط محلول سرم نمکی استریل (۹ در هزار) تزریق شد و به عنوان گروه شاهد (Control) نگهداری شدند . در روز چهارم از تمام ۱۸ راس گاومذکور خونگیری بعمل آمد و سپس ماده تقویت کننده ایمنی (IMP-1) بمقدار ده میکروگرم به‌ازاء هرکیلووزن‌زنده، دام روزانه به مدت ۲ روز از طریق داخل عضلانی تزریق شد .لمفوسیت‌های‌خون محیطی‌گاوهاکه روز چهارم (قبل از تزریق دگزامتازون) خونگیری شده بودند جدا شده و فعالیت ایمونولوژیک آنها براساس روش Roth و همکاران مورد مطالعه و سنجش ایمنی قرار گرفت (۱۸) . در روز هفتم از تمام گاوها مجددا " خونگیری بعمل آمد و لمفوسیت‌های خون محیطی آنان جدا شده و فعالیت ایمونولوژیک آنان مورد مطالعه و سنجش قرار گرفت . نتایج این آزمایشات در جدول شماره (۲) منعکس است .

نتایج مطالعات :

نتایج مطالعات انجام شده در این طرح در دو بخش INVITRO و INVIVO گزارش می‌شود .نتایج‌مربوط به‌اثر IMP-1 برمونوسیت‌ها ،کموتاکسی ،فعالیت‌فاگوسیتیک ، تولید لمفوکین‌ها ، تحریک وتکثیر لمفوسیت‌ها بامیتوژن وکشت‌لمفوسیت‌های مخلوط ، و تولید IL-2 وانترفرون گامادرجدول شماره ۱و نتایج مطالعات اثر IMP-1 درگاوهای

تزریق شده بادگزامتازون ویا بادگزامتازون به اضافه IMP-1 و همچنین در گاوهای‌گروه شاهد در جدول شماره ۲ بشرح زیر ارائه می‌شود:

الف ــ نتایج در آزمایشگاه (INVITRO):

۱ ــ همانطورکه در جدول شماره ۱ ارائه شده است ، هم تافسین وهم آمیخته جدید تافسین ــ تیموزین IMP - 1) فعالیت انهدامی باکتریسیدال (Bactericidal) مونوسیت‌ها راافزایش می‌دهند . فعالیت باکتریسیدال مونوسیت ها متعاقب پدیده بیگانه خواری آنها از طریق تولید یون‌های اکتیو اکسیژن (O^{-2} Superoxide) و احیاء NBT مشخص می‌گردد .میزان‌تولید یون‌های اکسیژن (O^{-2}) مونوسیت‌هامتعاقب اضافه نمودن تافسین یا IMP-1 به محیط کشت مونوسیت‌ها افزایش‌می‌یابد .این‌افزایش نسبت مستقیم با انهدام باکتریهای استافیلوکوک طلائی (اضافه شده به محیط کشت) دارد .

۲ ــ همانطورکه‌درجدول‌شماره ۱ منعکس می‌باشد ماده IMP-1 هم به همان‌اندازه تافسین‌برتولید مقدار اینترلوکین ــ ۱ (IL-1)توسط مونوسیت‌ها موثر بوده است (ردیف ۴ جدول شماره ۱) .

یافته های فوق الذکر پیشنهاد می‌نماید که آمیخته‌تافسین ــ تیموزین(IMP-1) در واقع مشابه‌هرکدام ازموادفوق الذکر به‌تنهائی می‌تواند به عنوان یک ماده فعال کننده مونوسیت‌ها (Monocyte Activator Factor) درمحیط کشت‌لمفوسیت‌هاموثر باشد .

۳ ــ هرآینه IMP-1 تاثیر قابل ملاحظه‌ای برتکثیر سلولهای لمفوبلاست (Blast Transformation) نداشته است (بامقایسه با تیموزین آلفا به‌تنهائی) .البته‌تافسین‌هم به‌تنهائی‌هیچگونه اثری که نشان دهنده تقویت لمفوبلاست‌ها در پاسخ به PHA باشد نداشته است (جدول شماره ۱ ــ ردیف ۱ ــ ۵) . از این نتایج چنین برمیآید که‌ترکیب کنژوگه جدید اثر فعال کننده روی سلولهای T هم دارد .

۴ ــ یافته‌های آزمایش کشت لمفوسیت‌های‌غیر همگن (MLC) که از لمفوسیت ها تحریک کننده (Stimulator cells) و پاسخ دهنده (Responsor Cells) طحال موش های‌نژادمختلف‌استفاده شده است نشان می‌دهد که هر دو ماده تیموزین‌آلفاو

جدول شماره (۱) ـ نتایج اثر تافسین، تیموزین آلفا و IMP - 1 برفونکسیون مونوسیت‌ها ولمفوسیت‌ها در INVITRO

شماره	نوع سنجش ایمنی	با حضور تافسین	با حضور تیموزین	با حضور IMP-1	شاهد (Control)	توضیحات مربوط به هر کدام از سیستمهای آزمایش
۱	کموتاکسی	۲۸ ± ۳	۱۱ ± ۲	۳۱ ± ۵	۱۰ ± ۲	جاذبه شیمیائی مونوسیت ها (تعداد متوسط مونوسیت‌ها درهرحوزه میکروسکپی) ـ مقدار IMP- 1 مصرف شده برابر با 1μg./ml.
۲	فاگوسیتوز	۵۱% ± ۱۸	۸۷ %	۵۵% ± ۱۱	۸۹% ± ۴	درصد باکتریهای زنده باقی مانده (هر چه بیشتر باشد نشاندهنده فعالیت کمتر میکروب خواری مونوسیت ها است) ـ مقدار IMP-1 برابر با 100 μg./ml. به محیط اضافه شد
۳	احیاء سیتوکرم — c (مقدارتولیداکسیژن (10^{-6}-M)	۱۲/۳	۹/۵	۱۰/۵	۸/۸	بستگی به مقدار تولید یون اکسیژن احیاء کننده دارد (تست مستقیم با آزمین رفتن (Cytochrome-c Reduction) x (10^{-6}M)
۴	تولید IL-1 (C P M)	۶۱۹۱ ± ۵۸۱	۴۸۴۵ ± ۹۰۱	۵۸۰۱ ± ۶۹۱	۴۳۳۲ ± ۶۷۵	تعداد سلولهای شمارش شده در دقیقه (c p m) با دستگاه سالتر
۵	میزان تکثیرلمفوبلاستها (B. T.-A)					
۵ — ۱	با حضور P H A	۱۶/۵	۳۸/۸	۲۷/۷	۱۸/۳	محیط درحضورمقدار 2μg./ml.-P H A میتوژن و مقدار لیپوپلی ساکاریـد (L P S) 15 μg./ml. برای ۴۸ ساعت کشت داده شد.
۵ — ۲	کشت لمفوسیت‌های غیرهمگن	۱۵/۲	۲۳/۰	۲۰/۷	۱۲/۲	
۶	تولید لمفوکین ها.					
۶ — ۱	اینترلوکین — ۲ (IL-2)	۳/۸ واحد	۶/۳ واحد	۵/۸ واحد	۲/۳ واحد	واحد بطور اختیاری تعیین و ثبت شد
۶ — ۲	انترفرون گاما (INF-γ)	" ۴/۲	" ۸/۱	" ۷/۰	" ۳/۵	لمفوسیت‌ها با P.HA-2 g./ml. تحریک شدند و ۴۸ ساعت بعد ازکوباکتون تعیین شد. مقدار IMP-1 ۲ میکروگرم درهزار عدد میکرولیتر مصرف شد.

جدول شماره (۲) نتایج اثر IMP - 1 روی فونکسیون ایمونوسیت ها متعاقب تزریق دگزامتازون درگاو (a) (INVIVO)

شماره ردیف	مواد تزریق شده Treatment	فونکسیون لمفوسیت ها IgG (mg./ml.)	IL-2 (cpm.)	PHA (cpm.)	MLC (cpm.)	ملاحظات
۱	سرم نمکی ۹ درهزار استریل (SALINE)	۱۸ ± ۳	۸۱۱۶ ± ۷۶۵	۱۷۲۲۷۱ ± ۸۳۲۱	۴۴۸۶۱ ± ۵۰۱۴	
۲	دگزامتازون تزریقی (40mg./ Kg./day, IM	۱۶ ± ۴	۵۲۳۸ ± ۴۵	۹۰۴۴۱ ± ۱۶۰۷۸	۲۸۵۱۱ ± ۷۱۱۸	
۳	دگزامتازون به اضافه IMP - 1 (c) (10 µg./K./D.I.M.)	۲۴ ± ۳	۷۶۶۲ ± ۹۸۱	۱۲۳۸۶۵ ± ۱۸۴۳۳	۳۶۰۹۹ ± ۸۳۱۷	IMP-1 تضعیف سیستم ایمنی را تا حدی جبران کرده است در فونکسیون لمفوسیت

a) Three injections of 40 ug./Kg./day, IM.

b) Six calves for each experiment

c) Ten ug./Kg./day, IM.

IMP-1 فعالیت تکثیر سیتوکین‌های T را افزایش می‌دهند ودرحالیکه تافسین‌به تنهائی اثر بسیارکمی برسلولهای مورد آزمایش دراین تست دارد (جدول شماره ۱ ردیف ۲ ــ ۵) .

۵ ــ تولید اینترلوکین ــ ۲(IL-2) وانترفرون گاما (INE-α) در مواقعی که تیموزین آلفابه‌تنهائی یا به‌صورت IMP-1 در سیستم آزمایش حضور داشتند افزایش یافته است (جدول شماره ۱ ــ ردیف ۱ ــ ۶) . البته تافسین هم به تنهائی می‌تواند تولید اینترلوکین ــ ۲ وانترفرون گاما را افزایش دهد ولی نه به مقداری که در اثر اضافه شدن آمیخته‌تیموزین ــ تافسین (IMP -1) افزایش داده‌است (جدول شماره ۱ ــ مقایسه شاهد تافسین ــ ردیف ۱ ــ ۶) .

بطورکلی نتایج مطالعات کاربرد آزمایشگاهی نشان می‌دهد که محصول آمیخته (کنژوگه) تافسین وتیموزین آلفا اثر تقویت‌کننده قابل ملاحظه‌ای بر روی لمفوسیت های T ومونوسیت ها دارد .

ب ــ نتایج در داخل بدن (INVIVO)

نتایج مطالعات انجام شده در اثر تزریق به‌حیوان زنده نشان داد که سیستم ایمنی گاوهائی که به آنها دگزامتازون تزریق شده بود تضعیف ویا سرکوب (Suppressed) شده است ولی‌تزریق آمیخته تافسین ــ تیموزین تاحدی این تضعیف را جبران کرده و سیستم‌ایمنی را تقویت می‌نماید ، حتی در برخی‌موارد آن را به حالت اول برمی‌گرداند (جدول شماره ۲) . هرآینه مطالعات و تجارب دیگری نیز لازم است انجام شود تا میزان دوزاژ و فارماکوکینتیک این ماده تقویت کننده سیستم ایمنی (IMP-1) تعیین گردد .

سوم ــ بحث‌ونتیجه گیری :

استرس های‌فیزیکی‌ومحیطی معمولا " منجر به‌تضعیف وسرکوب سیستم ایمنی بدن می‌شوند .انسان یاحیوانی‌که‌سیستم‌ایمنی‌بدن‌آن‌تحت تاثیراین نوع استرس ها قرار گرفته نسبت‌به‌انواع‌عفونت ها که در اثر میکروارگانیزمهائی که در شرایط عادی بیماریزا نیستند فوق‌العاده حساس می‌شود .تحقیقات‌در آزمایشگاههای متعدد نشان داده است که تافسین

سلولهای بیگانه‌خوار سیستم ایمنی را فعال می‌کند . تیموزین ــ آلفا اثر تقویت کننده‌روی سلولهای بالغ وتیموسیت‌هادارد .اخیرا " آزمایشگاه تحقیقاتی ایمونولوژی دانشگاه‌ایالتی داکوتای‌شمالی (NDSU) ترکیبی را ازمخلوط دو ماده‌که‌بطور طبیعی فعال کننده سیستم ایمنی می‌باشند سنتز نموده ودر INVITRO و INVIVO مورد مطالعه قرار داده است . این ترکیب جدیدکه‌در واقع آمیخته ای از تافسین وتیموزین آلفا می‌باشد دو نقش اساسی روی‌فعال‌کردن‌سیستم ایمنی ایفامی‌نماید که طی دو مقاله در جای دیگری به تفصیل بیان شده‌است . (مجله‌دارو ودرمان ــ زیر چاپ) اجمالا " یادآور می‌شود که یکی‌از نقش های فعال این دو ماده روی سلولهای بیگانه خوار ودیگری روی سلولهای T می‌باشد .

مطالعات INVITRO نشان داد که‌ترکیب جدید در تحریک‌وفعال‌کردن‌سلولهای T وماکروفاژها بسیار موثر است . تجارب INVIVO در این مطالعات چندان قطعی نبود ولی مطالعات مقدماتی نشان داد که می‌توان امیدوار بود که IMP-1 می‌تواند اثرات مفیدی در احیای فونکسیون های ایمونولوژیک حیواناتی که به‌عللی تحت تاثیر استرس قرارگرفته‌اند وسیستم ایمنی بدن‌آنان تضعیف‌ویاسرکوب شده است ، داشته باشد . طی‌این پروژه یک‌سری‌تحقیقات‌بمنظور ارزیابی اثر آمیخته تافسین ــ تیموزین (IMP - 1) روی مونوسیت‌های‌گاوی انجام گرفته است . این تحقیقات در زمینه ارزیابی کموتاکسی ، سیتوتوکسیسیتی وتولید سیتوکین‌ها انجام‌گرفت .

فعالیت سلولهای T از طریق اندازه گیری تکثیر لمفوسیت های بلاست توسط Mitogens (نظیر هماگلوتینین) وعکس العمل کشت لمفوسیت‌های غیر همگن (Allogenic)وتولید لمفوکین ها امکان پذیر گردید که نتایج آن در جدول شماره ۱ منعکس شده است . این نتایج حاکی‌از آن است که ماده تقویت کننده سیستم ایمنی (IMP - 1) به اندازه تافسین در افزایش تولید اینترلوکین ــ ۱ موثر بوده است . این اطلاعات پیشنهاد می‌نمایدکه‌آمیخته تافسین ــ تیموزین آلفا خاصیت‌تافسین را حفظ کرده و مشابه تافسین یک فعال کننده روی مونوسیت ها می‌باشد . با توجه به‌اینکه این ترکیب اثر تقویت کننده روی سلولهای T هم دارد بنابراین آمیخته تافسین ــ تیموزین آلفا (IMP - 1) می‌تواند بخش های اساسی سیستم ایمنی را تقویت کند بدون آنکه عوارض جانبی در بدن ایجاد نماید زیرا هر دو ماده اصلی این ترکیب به صورت فیزیولوژیکی‌در بدن یافت می‌شوند . چنانچه این کار برد عملا " مفید وقابل اجرا باشد ممکن است در

آینده بتوان با تجویز IMP-1 ، قبل ویابعد از وقوع حوادث استرس آفرین در دامها ، ازبیماریهای‌زیادی‌ازقبیل‌تب‌حمل‌ونقل(Shipping Fever)گاوان جلوگیری کرد . البته درصورت موفقیت با جلوگیری‌ازبروزاثرات استرس وبیماریهای ناشی از آن می‌توان به نحو قابل توجهی از خسارات اقتصادی جلوگیری نمود و بدین ترتیب فرآورده های دامی (گوشت ــ شیر وغیره) را افزایش داد .بدیهی‌است قبل از آنکه اثرات سودمند IMP-I از نظر کلینیکی کاربرد واقعی‌پیداکند انجام‌آزمایشات گسترده‌ای در زمنیه‌های مختلف از قبیل دوزاژ موثر وفارماکوکینتیک (Pharmacokinetic)این ترکیب ضروری بنظر می‌رسد .

تشکر .

ازخواهرحوریه باقری‌که‌درتایپ این مقاله متحمل زحمات فراوان شده‌اندصمیمانه تشکر می‌نمائیم .

مولفین

The Effects of Thymosin-Tufsin Conjugate on the Immune system of Cattle

Khansari.N*; Rad.M.A**. Jafari.P***,

SUMMARY:

It appears that linkage of thymosin to tuftsin can be accomplished and product retains the biological activities of each compoment. The new compound has potentiation effects on both T-Cells and monocytes. Thus, it would be a potent immunomodulator for immunocompromised subjects.

* Dept. of Vet. Sci. Microbiology, NDSU, Fargo, ND. 58105, USA.

** Dept. of Vet. Cl. Sci., Faculty of Vet. Med. Tehran University Tehran(P.O. Box 14155-6453),The Islamic Republic of IRAN.

*** Immunobiological Laboratories Inc.,246 W.38th street, New York, N.Y. 10018, USA.

References:

1- Blecha, F. (1975). The role of IL - 2 in the immune response of incoming feeder cattle, The Bovine Proceedings 18, 113 - 118.

2- Chang, T.M. and Neville, D.M.Jr. (1977):Artificial hybrid protein containing a toxic protein fragment and a cell membrane receptor - binding moiety in disulfide conjugate.
I. Synthesis of diphtheria toxin fragment A-S-S-human placental lactogen with methyl-5 bromovaler-imidate, J. Biol. Chem. 252, 1505-1514.

3- Conlon, P.J. and Goldstein, A.L.(1985): Thymosins and other thymic hormones. In " Biological Response Modifiers"(P.F. Torrence ed). PP. 121-140 Academic press, Orlando,Florida.

4- Conlon, P.J. (1983): A rapid biological assay for the detection of inter leukin - 1, J. Immunology, 131, 1280-1282.

5- Frank, G.H., The role of pasteurella hemolytica in the bovine respiratory disease complex (1986), Vet. Med. 81, 838-846.

6- Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W. and Smith, K.A. (1978) T.cell growth factor: Parameters of Production and quantitative micro assay for activity, J. Immunol., 120, 2027-2032.

7- Gottlieb, P., Stabinsky, Y., Zakuth, V., Spirer, Z., and Fredkin, M. (1983): Synthetic Pathways to tuftsin and radioimmuno assay, Ann. N.Y. Acad. Sci. 419,12-22.

8- Kelley, K.W., (1980). Stress and immune Function a bibliographic review, Ann. Rech. Vet., 11, 445-478.

9- Khansari, N., Petrini, M., Ambrogi, F., Gold-Schmidtclermont,P. and Fudenberg, H.H. (1983): Role of autorosette forming cells in antibody synthesis in Vitro: Supprssive activity of ARFC in humoral immune response, Immunobiology. 166, 1-11.

10- Khansari, N., Whitten, H.D. and Fudenberg, H.H. (1984) Phencyclidine-induced immunosuppression, Science. 225, 76-78.

11- Khansari, N., Chou, Y.K., and Fudenberg, H.H.(1985) Human monocytes heterogeneity: Inter Leukin - 1 and Prostaglandin E_2 production by separate subsets, Eur.J. Immunol. 15, 48-51.

12- Khansari, N., Beauclair, K. and Gustad, T. (1989) Separation of bovine lymphocytes and granulocytes from blood by use of elutriation, Am. J. Vet. Res. 50. 1263-1265.

13- Larssen, B., Fossum, C., Tornquist, M., Matson, P. Aleniu, S. (1985): Evaluation of prophylactic potential of an immuno modulator against respiratory disease in calves.Vet. Scand. 29,262-272.

14- Ling, N.R., and Maclennan, I.C.M. (1981). Analysis of lymphocytes in blood and tissues. In " Techniques in clinical Immunology"(Thompson, R.A.ed.).PP.222-250, Blackwell scientific, Oxford, London.

15- Liu, T.T., Zinnecker, M., Hamaoka, T. and Katz, D. (1979): New procedures for preparation and isolation

D- amino acids and immunochemical characterization of such a conjugates, Biochemistry, 18,690 - 693.

16- Moolten , F.L., and Cooperland, S.R. (1970). Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens of the cells, Science. 169, 68 - 70.

17- Roth, J.A. (1982): Immuno- suppression and immuno-modulation in bovine respiratory disease. In book" Bovine respiratory disease " by . R.W. Loans eds., Texas A & M University press College Station, TX.,PP. 143-192.

18- Roth, J.A., and Kaeberle M.L. (1984): Enhancement of lymphocyte blasto - genesis and neutrophil function by Avridine in dexameth asone-treated and non - treated cattle, Am., J. Vet. Res.46,53-58.

19- O'Sullivan, M.J., Gnemmi, E., Morris, D., Chiregatti, G., Simonds, A.D., Simmons, M., Bridges, J.W., and Marks, V. (1979). Comparison of two methods of prepariny enzyme antibody conjugates. Application of these conjugates for enzyme immuno assay, Anal. Chem. 100, 100-108.

20- Synderman, R., and Pike, M. (1976): Macrophage chemotaxis, In: " INVITRO Methods in cell Mediated and Tumor Immunity" (B.Bloom and J. David, eds.) PP.185-196. Academic Press, New york.

21- Von - Tungeln, D.L. (1986), The effects of Stress on the immunology of the stocker Calf. The bovine Prac., 18, 109- 115.

22- Youle, R.J., amd Neville. D.M.Jr. (1980). Anti-thy 1,2 monoclonal antibody linked to ricin is a potent cell-type - specific toxin, proc. Natli Acad. Sci.USA., 77, 5483-5486.