Archive of SID

دانشور
پزشکی

استخراج و ارزیابی مولکولی وزیکول غشای خارجی حاوی PorA نیسریا منتژیتیدیس زیر گروه B

نویسندگان: دکتر سیدداور سیادت*[1]، دکتر قربان بهزادیان‌نژاد[2]، دکتر بهمن تبرایی[1]، دکتر شهین نجارپیرایه[3]، دکتر حجت احمدی[1]، دکتر انوشیروان کاظم‌نژاد[2] و مهدی نجاتی[4]

۱. استادیار بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران
۲. دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۴. عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران
* نویسنده مسئول: Email: d.siadat@gmail.com

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال چهاردهم – شماره ۶۵
آبان ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۳/۱۱/۷
تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۱۲

چکیده

مقدمه: *نیسریا منتژیتیدیس*، عمده‌ترین عامل سببی منتژیت باکتریایی در انسان و از معضلات بهداشتی در جهان است. پلی‌ساکارید کپسولی *نیسریا منتژیتیدیس* زیرگروه‌های A و C و W_{135} و Y آنتی‌بادی باکتریسیدال محافظت‌کننده‌ای را در انسان القا می‌کند و مصرف آن به‌عنوان واکسنی مؤثر، بیش از دو دهه کاربرد دارد. در مقابل، به علت تشابه کپسول پلی‌ساکاریدی زیرگروه B با پلی‌ساکاریدهای بدن انسان، استفاده از این ماکرومولکول سیستم ایمنی را تحریک نمی‌کند. بنابراین امروزه زیرگروه B اصلی‌ترین عامل سببی بیماری‌های منتگوکوکی، در کشورهای درحال توسعه است. به همین دلیل، نیاز اساسی به بررسی و توسعه واکسن‌های زیرواحد جایگزین، از جمله پروتئین‌های غشای خارجی، کانون تحقیق پژوهشگران محسوب می‌شود. اجزای سطحی باکتری، از جمله پورین غشای خارجی PorA (پروتئین کلاس I) امروزه به‌عنوان کاندیدای بالقوه واکسن، توجهی جدی را به خود معطوف داشته است.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، سویه استاندارد *نیسریا منتژیتیدیس* زیرگروه CSBPI،G245-B تحت شرایط کنترل شده کشت غوطه ور فرمانتور، در محیط فرانتز اصلاح شده، کشت داده شد و در انتهای فاز لگاریتمی رشد توده باکتری برداشت گردید. وزیکول غشای خارجی حاوی PorA (OMV-PorA)) به روش دزاکسی‌کولات- اولتراسانتریفوژ افتراقی استخراج گردید و سپس در فسفات بافر سالین حاوی سوکروز و تیومرسال، با اولتراسوند هموژنیزه، و برای انجام بررسی‌های بعدی نگهداری شد. پس از تهیه گرید و رنگ‌آمیزی، وزیکول‌ها در میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند. همچنین آنالیز نمونه با SDS_PAGE انجام گرفت. توان OMV-PorA در القای سنتز آنتی‌بادی اختصاصی با استفاده از آزمون ژل دابل دیفیوژن انجام گرفت. به‌علاوه بی‌زیانی مصرف OMV-PorA و عدم‌وجود هرگونه عامل سمی در نمونه با انجام تست‌های پیروژنی در خرگوش و آزمون سمیت غیرنرمال در موش و خوکچه هندی به اثبات رسید.

نتایج: در عکس الکترونی اندازه OMV-PorA ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر و درصد وزیکول‌های سالم ۷۰ تا ۹۰ درصد است. در بررسی الکتروفورتیک با SDS-PAGE، پس از رنگ‌آمیزی باندهای پروتئینی، یک باند قوی در ناحیه ۴۰-۴۵ کیلودالتون مشاهده گردید. با آزمون دابل دیفیوژن، خط رسوبی مشخصی در ژل آگاروز نمایان شد که از توان OMV-PorA در القای سنتز آنتی‌بادی هایپرایمیون حکایت می‌کند.

بحث: بررسی داده‌های حاصل از تحقیقات فوق نشان می‌دهد که در مراحل مختلف فرایند تخلیص، OMV-PorA نه تنها شکل فضایی و طبیعی خود را کاملاً حفظ کرده، بلکه فاقد ناخالصی بوده، توان القای سنتز آنتی‌بادی اختصاصی را دارد. بنابر این OMV-PorA استخراج شده از سویه CSBPI ،G245 *نیسریا منتژیتیدیس زیرگروه B* می‌تواند به‌عنوان یک ایمنوژن مفید و مؤثر علیه عفونت‌های منتگوکوکی زیرگروه B مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: وزیکول غشای خارجی، *نیسریا منتژیتیدیس زیرگروه B*، ایمنوژن، استخراج

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نیسریا منتژیتیدیس، عمده‌ترین عامل سببی منتژیت باکتریایی در انسان، هنوز در زمره معضلات بهداشتی در سراسر جهان است. مطالعات همه‌گیری‌شناختی نشان داده که تنها راه پیشگیری افراد از ابتلا به این بیماری، واکسیناسیون است [۱]. کپسول پلی‌ساکاریدی این باکتری به‌طور گسترده برای ایجاد ایمنی مورد استفاده قرار گرفته است. تفاوت‌های آنتی‌ژنی در کپسول پلی‌ساکاریدی، *نیسریا منتژیتیدیس* را به حداقل ۱۳ زیرگروه طبقه‌بندی می‌کند. بیش از ۹۹ درصد عفونت‌های منگوکوکی توسط سویه‌های زیرگروه A,B,C,29E,W135,Yایجاد می‌شوند.مصرف وسیع واکسن مفید دو ظرفیتی پلی‌ساکارید کپسولی منگوکوک (A+C) و در برخی مناطق چهار ظرفیتی $(A+C+Y+W_{135})$ سبب گردیده تا در ۳۰ سال گذشته، زیر گروه B *نیسریا منتژیتیدیس* شایع‌ترین عامل سببی منتژیت اپیدمیک، به‌ویژه در کشورهای توسعه یافته گردد؛ به‌طوری که امروزه بیش از ۹۰ درصد از منتژیت منگوکوکی در آمریکا به علت این زیر گروه است. برخلاف کپسول پلی‌ساکاریدی زیرگروه‌های A و C و Y و W_{135}، کپسول زیر گروه B در انسان ایمنوژنیک نبوده، پاسخ‌های ناخواسته‌ای را به همراه دارد [۲،۳،۴و۵]. تشابه زنجیره کوتاه اسیدسیالیک در سیالوگانگلیوزیدها و اسفنگولیپیدها (اسفنگومیلی‌نها) عامل ایجاد تولرانس ایمنولوژیکی نسبت به پلی‌ساکارید کپسولی زیر گروه B بوده، در صورت القای ایجاد آنتی‌بادی، واکنش متقاطعی با ساختار فوق را در انسان سبب می‌گردد [۶و۷]. با توجه به مشکلات بیان شده، امروزه تمرکز کارهای تحقیقاتی بر سایر اجزای دیواره سلولی و ترکیبات باکتریایی، ازجمله بر پروتئین‌های عمده غشای خارجی معطوف شده است [۸،۹و۱۰]. تومیسن (Tommassen) و همکاران او در سال ۱۹۹۰ در یک طبقه‌بندی اولیه، اصلی‌ترین پروتئین‌های غشای خارجی را به پروتئین‌های کلاس ۱ تا ۴ تقسیم کردند [۱و۱۰]. کلاس I پروتئین‌ها، (پورین PorA) ۴۵ کیلودالتون وزن داشته، در تمام منگوکوک‌ها بیان می‌شوند. پروتئین‌های کلاس II وIII نیز پورین‌هایی با وزن مولکولی ۳۷ تا ۴۲ کیلودالتون هستند. پروتئین‌های کلاس IV با وزن مولکولی ۳۷ تا ۴۳ کیلودالتون، پروتئین‌های القایی بوده، در اتصال به آنتی‌بادی بلوکان نقش دارند. تخلیص مجموعه‌ای از پروتئین‌های غشای خارجی سویه‌های فاقد پروتئین کلاس III و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی‌زایی در مدل‌های حیوانی، حاکی از عدم‌تغییر در میزان آنتی‌بادی باکتریسیدالی تولید شده در حیوان است، در حالی که موتاسیون در ژن تولیدکننده کلاس I، کاهش شدیدی را در تیتر این آنتی‌بادی‌ها ایجاد می‌کند که نشان از نقش غالب پروتئین‌های کلاس I در تولید آنتی‌بادی باکتریسیدالی دارد [۱۱،۱۲،۱۳،۱۴و۱۵]. بنابراین، امکان استفاده از پروتئین‌های عمده غشای خارجی زیرگروه B، به‌ویژه پروتئین‌های کلاس I که هم در سایر ایمنوتایپ‌های *نیسریا منتژیتیدیس* بیان می‌گردد و هم عمده‌ترین آنتی‌ژن در القاء آنتی‌بادی‌های باکتریسیدالی سرم خون است، به‌عنوان واکسنی مفید و مؤثر، منووالانت یا کونژوگه دو ظرفیتی، توجه محققان را به خود جلب کرده است [۲،۳،۴،۵،۱۳و۱۶].

از آن‌جا که گره‌های کلیدی در فرایند خط تولید صنعتی وزیکول غشای خارجی حاوی PorA رازی است تجاری و در انحصارکمپانی‌های بزرگ چندملیتی، مراحل مختلف تحقیق حاضر حول محور دستیابی به میزان قابل توجهی از این پروتئین، که با حفظ فرم فضایی طبیعی خود، توان حفاظتی بالایی را در بزرگسالان، کودکان و نوزادان ایران حفظ کند، پایه‌ریزی گردیده است.

مواد و روش‌ها

۱. سروتایپ باکتری و تهیه بذر تلقیحی

جهت استخراج وزیکول غشای خارجی حاوی PorA (OMV-PorA)، *نیسریا منتژیتیدیس* زیر گروه B

www.SID.ir

Archive of SID

(CSBPI [CSBPI: Cultural Collection of Standard Bacteria, Pasteur Institute of Iran], G-245) از کلکسیون نگهداری باکتری‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی انستیتو پاستور ایران ابتیاع گردید. ۲۵ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته *نیسریا مننژیتیدیس* زیر گروه B (CSBPI,G-245) در مولر هینتون برات را به نیم لیتر محیط کشت فرانتز (Frantz) اصلاح شده، تلقیح کرده، به‌مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۶±۱°C و اتمسفر ۵ درصد CO_2 با دور شیکر ۱۵۰۰ rpm نگهداری کردیم [۱۵،۱۱و۱۷].

۲. کشت در فرمانتور

۵۰۰ میلی‌لیتر بذر تلقیحی را در شرایط استریل به مخزن فرمانتور (Contact-Flow b.v. Bilthoven unit system) حاوی ۴۰ لیتر محیط کشت فرانتز اصلاح شده منتقل کرده، سپس در شرایط اپتیمم رشد و پارامترهای تخمیری، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۶±۱°C، pH=۷/۶، دور موتور ۴۰۰ـ۳۰۰ rpm و جریان هوای ۵ لیتر در دقیقه نگهداری کردیم. به‌منظور غیرفعال کردن باکتری‌ها در انتهای فاز لگاریتمی، مخزن فرمانتور به مدت نیم ساعت در دمای ۵۶°C قرار گرفت [۱۷،۱۱و۱۸].

۳. استخراج و تخلیص OMV-PorA

جسم سلولی غیرفعال *نیسریا مننژیتیدیس* زیر گروه B (CSBPI, G-245) به مدت یک ساعت در دور ۶۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C سانتریفوژ گردید و پس از دوبار شستشو با PBS=7.2، طبق روش پیشنهادی کلاسن و همکارانش (۱۹۹۶) توده غلیظی از جسم سلولی را در بافر کلرور سدیم به‌صورت تعلیق درآوردیم و پس از هموژنیزاسیون به مدت ۳۰ دقیقه، وزن مرطوب آن تعیین گردید. این تعلیق مجدداً در ۶۵۰۰ rpm به مدت یک ساعت در ۴ °C سانتریفوژ شد. رسوب سلولی در ۷/۵ برابر وزن مرطوب خود با تریس بافر ۰/۱ مولار (سیگما) محتوی اتیلن دی آمین ترا کلرواستیک اسید ۱۰ میلی‌مولار (EDTA) (سیگما) w/v به‌صورت تعلیقی یکنواخت درآمد. به تعلیق فوق میزان ۱/۲۰ حجمی محلول تریس بافر ۰/۱ مولار محتوی EDTA ۱۰ میلی‌مولار و سدیم دزاکسی کولات ۱۰۰ گرم در لیتر (مرک) اضافه و به شدت تکان داده شد. پس از ده دقیقه، توده سلولی تیمار شده با دزاکسی کولات توسط اولتراسانتریفوژ (بک من ۸۰M و L8) به مدت یک ساعت در دور ۱۶۵۰۰ rpm و ۴ °C جدا گردید. سپس مایع سانتریفوژ شدهٔ عاری از سلول به مدت ۲ ساعت در دور ۴۲۰۰۰ rpm و ۴ °C سانتریفوژ شد. آنگاه تعلیقی از رسوب به‌دست آمده در بافرتریس ۰/۱ مولار حاوی EDTA ۱۰ میلی‌مولار و دزاکسی کولات ۵ گرم در لیتر، تهیه گردید و به مدت ۲ ساعت در دور ۱۶۵۰۰ rpm و ۴ °C، اولترا سانتریفوژ شد. OMV-PorA ته‌نشین شده در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۳ درصد سوکروز حل، و پس از عبور از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون در ویال‌های ۲۰ و ۵۰ میلی‌لیتری شیشه‌ای استریل تقسیم و لیوفیلیزه گردید [۱۸،۱۷و۱۹].

٤. سنجش پروتئین

میزان پروتئین OMV-PorA طبق روش پیترسن (۱۹۹۷) مورد سنجش قرار گرفت، به طوری که ابتدا OMV-PorA در ۰/۱۵ درصد سدیم دزاکسی کولات (w/v) حل، و به محلول فوق ۷۲ درصد اسید تری‌کلرو استیک (مرک) (w/v) اضافه شد. رسوب پروتئین پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در میزان معینی از آب مقطر حل گردید و میزان پروتئین OMV-PorA بر اساس روش لوری تغییر یافته (۱۹۵۱) محاسبه شد [۱۷،۱۱و۲۰].

۵. SDS-PAG الکتروفورز OMV-PorA

طبق روش SDS-PAGE لامیلا (۱۹۷۰) در ژل ۱۰ درصد، وزن مولکولی OMV-PorA با مقایسه مارکرهای

www.SID.ir

Archive of SID

استاندارد (سیگما) محاسبه شد و مورد سنجش قرار گرفت [۱۷،۱۱و۱۸].

۶. میکروسکوپ الکترونی

درجه خلوص و پایداری فرم طبیعی OMV-PorA (در مراحل مختلف فرایند خالص‌سازی) توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که پس از یکنواختی وزیکول‌ها در میزان معینی PBS ۰/۰۱ مولار توسط اولتراسوند، میزان ۱۰ لاندا از وزیکول را روی گرید نیکلی پوشیده شده با فرم وار ـ کربن قرار داده، سپس گرید توسط PBS ۰/۰۱ مولار محتوی ۰/۵ مولار BSA (مرک) و ۰/۱ درصد ژلاتین (مرک) شستشو شد. OMV-PorA توسط PBS ۰/۰۱ مولار حاوی ۱ درصد گلوتارآلدئید بر روی گرید کاملاً فیکس گردیده، تحت رنگ‌آمیزی کنتراست منفی با فسفوتنگستات پتاسیم (pH=۶/۵) قرار گرفت. در نهایت به کمک میکروسکوپ الکترونی زایس مدل CEA902-A تصویر میکروگراف الکترونی OMV-PorA تهیه شد [۱۷،۱۱و۱۸].

۷. آزمون پیروژنی

جهت بررسی عدم‌وجود احتمالی عوامل تب‌زا، آزمون پیروژنی، طبق پیشنهاد ارائه شده در فارماکوپه WHO (۱۹۶۷) روی OMV-PorA انجام پذیرفت. به این خاطر، ابتدا ۳ رأس خرگوش سفید نیوزلندی با وزن ۲ تا ۳/۵ کیلوگرم انتخاب، و نیم میلی‌لیتر OMV-PorA خالص معادل ۱۰۰ میکروگرم پروتئین به‌صورت داخل جلدی به ازای هر کیلوگرم وزن به خرگوش تزریق گردید. دمای نرمال بدن خرگوش‌ها قبل از تزریق و در هر ساعت تا ساعت پنجم پس از تزریق توسط رکتومتر مورد سنجش قرار گرفت.چنانچه افزایش گرمایی یکی از سه خرگوش معادل و یا بیش از ۶°C باشد و یا مجموعه افزایش گرمایی بدن سه خرگوش نسبت به مجموعه گرمای نرمال بدن حیوانات قبل از تزریق بیش از ۱/۴°C شود، آزمون پیروژنی مثبت تلقی می‌شود [۲۱].

۸. آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال

این آزمون برای تعیین بی‌زیانی مصرف OMV-PorA تخلیص شده در خوکچه هندی و موش سوری به دو روش صورت پذیرفت:

الف) آزمون سمیت در خوکچه هندی

دو گروه پنج تایی خوکچه هندی به وزن ۳۵۰ تا ۳۸۰ گرم انتخاب گردید. به یک گروه ۵۰۰µg در میلی‌لیتر OMV-PorA خالص سروتیپ G۲۴۵ و CSBPI به‌صورت صفاقی تزریق شد. گروه شاهد نیز ۵۰۰ میلی‌لیتر PBS (pH=۷/۲) دریافت کرد. خوکچه‌ها به مدت هفت روز در شرایط نرمال پرورشی، نگهداری شده، به مدت هفت روز از نظر کاهش وزن، عوارض جانبی محل تزریق و مرگ‌ومیر مورد بررسی قرار گرفتند [۲۱].

ب) آزمون سمیت در موش سوری

سه گروه پنج‌تایی موش سوری به وزن ۱۸ تا ۲۰ گرم انتخاب گردید و به دو گروه ۱۰۰ µg/ml OMV-PorA خالص سروتیپ G۲۴۵ و CSBPI به‌صورت صفاقی تزریق گردید. موش‌ها به مدت هفت روز در شرایط مناسب پرورشی نگهداری شده، هر روز از لحاظ کاهش وزن، عوارض جانبی محل تزریق و مرگ‌ومیر مورد ارزیابی قرار گرفتند. گروه شاهد نیز ۰/۱ میلی‌لیتر PBS (pH =۷/۲) دریافت کرد [۲۱].

۹. توان القای سنتز آنتی‌بادی هیپرایمیون در خرگوش

به یک گروه سه‌تایی از خرگوش‌های سفید نیوزلندی با وزن ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم µ ۵۰۰ از OMV-PorA تخلیص شده از نیسریا منتژیتیدیس زیر گروه B سویه G۲۴۵ و CSBPI را همراه ادجوانت کامل فروند به‌صورت داخل عضلانی در روزهای ۱، ۲۸، ۵۸ و۱۴۸

www.SID.ir

Archive of SID

تزریق گردید. پس از یک هفته از آخرین تزریق، خون هر یک از خرگوش‌ها از طریق قلب جمع‌آوری شد و آنتی‌سرم‌های OMV-PorA مخلوط گردیدند. سپس واکنش رسوبی آنتی‌سرم هیپرایمیون OMV-PorA خالص و آنتی‌سرم جسم‌سلولی زیرگروهB طبق روش ژل ایمنودیفیوژن اجترلونی در آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۲و۲۳].

نتیجه

۱. شرایط کشت

در تحقیق حاضر، پس از تلقیح بذر مورد نظر به ۴۰ لیتر محیط فرانتز اصلاح شده، تا انتهای فاز لگاریتمی رشد کلیه پارامترهای تخمیری در شرایط کاملاً کنترل شده و اپتیمم کشت غوطه‌ور به‌صورتی در فرمانتور تنظیم گردید تا سلول‌ها به حداکثر تکثیر خود برسند. در این شرایط از ۴۰ لیتر برات (Broth) تخمیری حدود ۲۰/۵۲ گرم وزن مرطوب سلولی به‌دست آمد (نمودار ۱، ۲ و ۳).

۲. اندازه‌گیری پروتئین

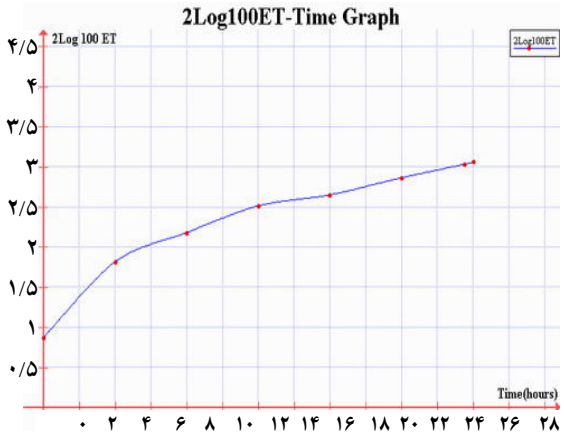
دترژانت‌ها به‌ویژه دزاکسی کولات، کشش شدیدی نسبت به اتصال با پروتئین‌ها از خود نشان می‌دهند. این امر سبب می‌گردد تا در سنجش دقیق میزان پروتئین در نمونه‌ها به روش لوری اختلال ایجاد گردد. بنابراین در تحقیق حاضر میزان پروتئین طبق روش اصلاح شده لوری که توسط پترسن ارائه گردید اندازه‌گیری شده است، به‌طوری که از کل توده زنده (Biomass) سلولی حاصل ۷۳۰ میلی‌گرم پروتئین وزیکول غشای خارجی به‌دست آمده است.

۳. بررسی وزن مولکولی

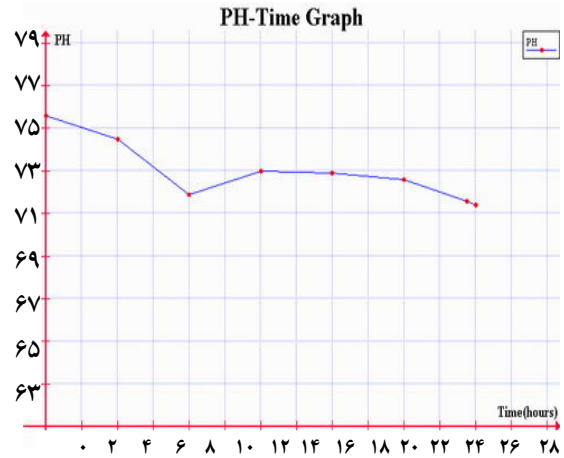
چنانچه در شکل ۱ ملاحظه می‌گردد، الگوی حرکتی وزیکول غشای خارجی حاوی PorA در SDS-PAG الکتروفورز ۱۰ درصد با مقایسه با مارکرهای پروتئینی استاندارد به‌صورت یک باند نسبتاً قوی در محدوده ۴۰ تا ۴۵ کیلودالتون ظاهر گردیده است.

۴. میکروسکوپ الکترونی

خصوصیات مرفولوژیکی OMV-PorA پس از گذر از مراحل مختلف فرایند استخراج و تخلیص توسط رنگ‌آمیز کنتراست منفی در میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. به‌طوری که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد نه تنها اندازه وزیکول‌ها بین ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر است، بلکه بیش از ۷۰ تا ۹۰ درصد آن‌ها شکل فضایی و طبیعی خود را کاملاً حفظ کرده‌اند. همچنین در میکروگراف مربوط، ناخالصی پروتئینی در بین وزیکول‌ها نیز مشاهده نمی‌گردد.



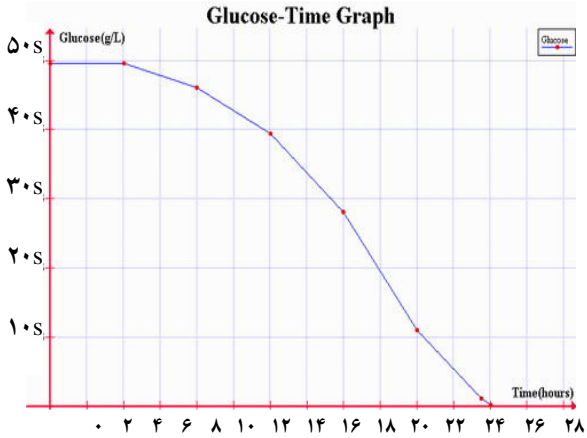
نمودار ۱ سینتیک رشد نیسریا منتژیتیدیس زیر گروه B در فرمانتور



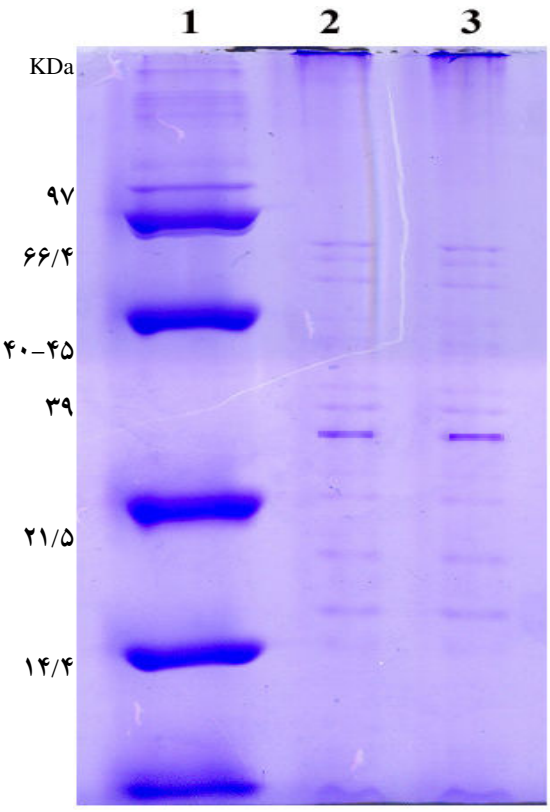
نمودار ۲ تغییرات pH در طی زمان رشد در فرمانتور

www.SID.ir

Archive of SID



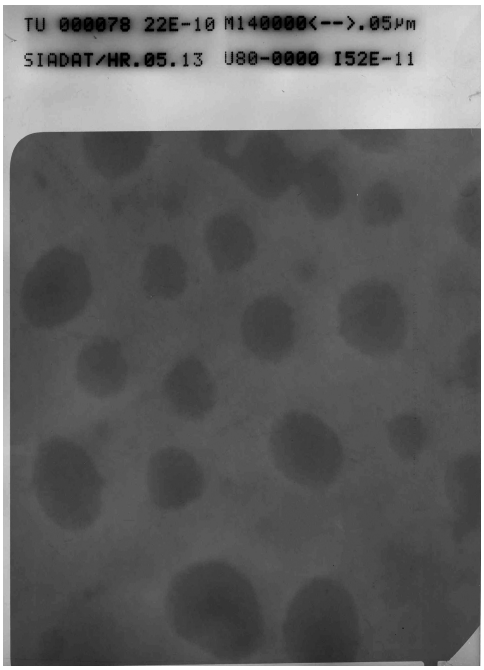
نمودار ۳ میزان مصرف گلوکز در طی زمان رشد در فرمانتور



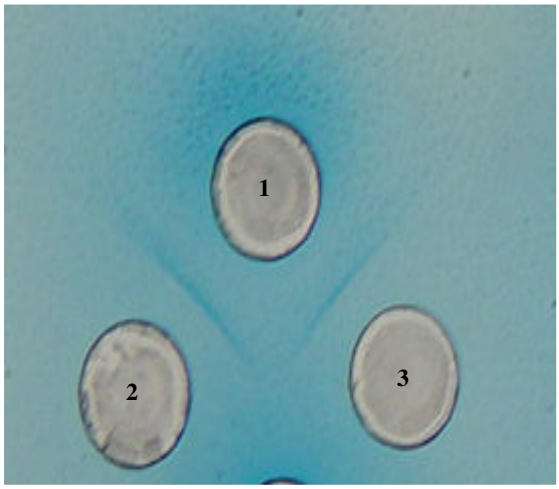
شکل ۱. الگوی SDS-PAGE الکتروفورز از OMV-PorA نیسریا منتژیتیدیس‌زیرگروهB سروتیپ CSBPI,G-245 در ژل ۱۰درصد

ـ ستون ۱: مارکرهای استاندارد باوزن ملکولی پایین

ـ ستون ۲ و ۳: به ترتیب ۲ و ۴ میکروگرم وزن کل پروتئین OMV-PorA



شکل ۲. میکروگراف الکترونی وزیکول‌های تهیه شده از سویه استاندارد CSBPI,G-245 *نیسریا منتژیتیدیس* زیر گروهB



شکل ۳. آزمون ژل ایمنودیفیوژن:

چاهک شماره ۱:OMV-PorA خالص

چاهک شماره ۲: Anti OMV-PorA Ab

چاهک‌شماره۳: Anti Neisseria meningitidis serogroup B Ab

www.SID.ir

Archive of SID

۵. سنجش بی‌زیانی مصرف OMV-PorA

بر اساس روش پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی (۱۹۶۷)، بی‌زیانی مصرف OMV-PorA خالص با انجام آزمون پیروژنی در خرگوش که احتمال وجود ناخالصی بیش از حد مجاز عوامل تب‌زا نظیر LPS در نمونه را مشخص می‌کند، مورد ارزیابی قرار گرفت.

در ادامه با انجام آزمون سمیت غیرنرمال در خوکچه هندی و موش سوری نیز عدم‌وجود هر نوع عامل سمی در نمونه به اثبات رسید. به‌طوری که تزریق داخل جلدی ۱۰۰ میکروگرم از OMV خالص به ازای یک کیلوگرم وزن خرگوش، افزایشی در میانگین دمای طبیعی بدن حیوان ایجاد نمی‌کند. به‌علاوه، تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ میکروگرم OMV-PorA خالص به یک گروه پنج‌تایی خوکچه هندی و تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم از همان وزیکول به یک گروه پنج تایی موش سوری، طی ۷۲ ساعت نگهداری در شرایط مناسب، نه تنها سبب مرگ‌ومیر و یا کاهش وزن بدن حیوانات نگردید، بلکه پس از اتویسی نیز هیچ‌گونه آسیب نسجی در محل تزریق و یا اعضای داخلی بدن حیوانات مشاهده نشد (جدول ۱و۲).

۶. آزمون تعیین هویت به روش ژل ایمنودیفیوژن

چنان‌که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، بین چاهک شماره ۱ حاوی OMV-PorA خالص و چاهک شماره ۲ محتوی آنتی‌سرم هیپرایمیون خرگوش علیه OMV واکنش رسوبی مشخصی در ژل آگاروز ایجاد شده است. این پدیده، توان القایی OMV-PorA در سنتز آنتی‌بادی هومولگ قابل اندازه‌گیری در بدن حیوان را به‌خوبی مشخص می‌کند. به‌علاوه، ایجاد واکنش رسوبی بین آنتی‌بادی القا شده علیه جسم سلولی نیسریامننژیتیدیس زیرگروه B (چاهک شماره ۳) و OMV-PorA (چاهک شماره ۱) نه تنها هویت اختصاصی PorA را در شناسایی ایمنوگلبولین‌هایی که علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک خود سنتز گردیده است به اثبات می‌رساند، بلکه بیانگر مقاومت و پایداری خواص آنتی‌ژنیک وزیکول‌ها در مراحل مختلف فرایند استخراج و جریان خالص‌سازی است.

بحث

مهم‌ترین عامل در افزایش روزافزون موارد ابتلا به منتژیت مغزی ـ نخاعی ناشی از زیرگروه B *نیسریا منتژیتیدیس*، مصرف همگانی واکسن منگوکوک A+C و عدم‌دسترسی ارگانیک به واکسن مفید و مؤثری است که بدن را در مقابل این زیرگروه حفاظت کند [۱و۲]، زیرا برخلاف پلی‌ساکاریدهای کپسولی زیرگروه‌های A و C که ایمنوژن‌های پرتوانی هستند، پلی‌ساکارید کپسولی زیرگروه B سیستم ایمنی اختصاصی بدن را تحریک نمی‌کند [۲،۳و۴].

این نقص مولکولی به دلیل تشابه ساختمان شیمیایی آن با اسفنگولیپیدها و سیالوگانگلیوزیدهای موجود در سیستم اعصاب مرکزی است [۶]. به‌همین دلیل در دو دهه گذشته جهت جایگزینی زیر واحد ایمنوژن دیگری نظیر پروتئین‌های عمده غشای خارجی دیواره سلولی (OMPS) *نیسریامننژیتیدیس* زیرگروه B فعالیت‌های تحقیقاتی گسترده‌ای انجام گرفته است. در اواخر سال ۱۹۸۹ سیرا و همکاران او توان حفاظتی OMPS *نیسریامننژیتیدیس* زیرگروه B را در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسانیدند و در سال‌های ۱۹۹۰ـ۱۹۹۱ بوژنه و همکارانش واکسن‌های زیرواحد پروتئینی استخراج شده از غشای خارجی دیواره سلولی را برای کنترل شیوع اپیدمیک منتژیت منگوکوکی تحت نظارت مؤسسه بین‌المللی بهداشت عمومی نروژ مورد ارزیابی قرار دادند که با موفقیت همراه بود [۵].

کلاسن و همکاران او نیز دریافتند که بین چهار کلاس I و II و III و IV پروتئین‌های عمده غشای خارجی دیواره سلولی *نیسریا منتژیتیدیس* زیرگروه B، کلاس I (PorA)، سیستم ایمنی اختصاصی بدن را نسبت به سایر پروتئین‌های غشای خارجی فعالانه‌تر تحریک

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کند. مطالعه PorA در سطح مولکولی نشان می‌دهدکه ژن مسئول سنتز آن نه‌تنها در شرایط کنترل شده کشت غوطه‌ور به‌خوبی فعال است، بلکه در تمام زیرگونه‌های مختلف *نیسریامننژیتیدیس* به‌ویژه زیرگروه B به‌طور قابل توجهی بیان می‌شود. به‌علاوه، این ژن پایدار بوده، به‌ندرت در معرض جهش خودبه‌خودی قرار می‌گیرد. با توجه به بالا بودن تعداد آن در سطح خارجی باکتری نسبت به سایر پروتئین‌های غشای خارجی دیواره، توان حفاظتی آن نیز بسیار قابل توجه است [۱۲و۱۷]. امروزه خواص آدجوآنتی OMV به‌عنوان یک ایمنومدولاتور قوی کاملاً مشخص گردیده است [۱۰،۱۷و۲۴]، به‌طوری که کمپانی‌های مرک، درهام و شارپ با بهره‌گیری از تکنولوژی تیواتر کوپلینگ برای اتصال OMV استخراج شده از *نیسریا منتژیتیدیس* زیرگروه B به پلی‌ساکارید کپسولی *هموفیلوس انفلوانز* تیپ b، واکسن کونژوگه دوظرفیتی مفیدی را به بازار عرضه می‌کنند که نقص واکسن تک‌ظرفیتی پلی‌ساکارید کپسولی *هموفیلوس انفلوانزای* تیپ b را با تحریک سیستم ایمنی اختصاصی بدن کودکان زیر دو سال و نوزادان علیه زیرواحد پلی‌ساکاریدی برطرف کرده است. به‌علاوه، تزریق دوز یادآور آن نیز افزایش ایمنی را برای هر دو زیرواحد کونژوکه به‌دنبال دارد [۱،۲،۳و۴].

از آن‌جا که دانش فنیِ مراحل مختلف تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی واکسن‌های زیرواحد مدرن امروزی در انحصار کمپانی‌های بزرگ چندملیتی قرار دارد، در تحقیقات حاضر با بهره‌گیری از تجارب سایر محققان فن و بهینه‌سازی سنتیک رشد در کشت غوطه‌ور، امکان تولید نیمه‌صنعتی OMV-PorA خالص زیرگونه استاندارد *نیسریامننژیتیدیس* زیرگروه B (CSBPI: G-245) در ایران مورد ارزیابی قرار گرفت؛ به‌طوری که از کشت ۴۰ لیتر محیط فرانتز اصلاح شده در شرایط کنترل شده اپتیمم در فرمانتور ۷۵۰ میلی‌گرم OMV-PorA خالص به‌دست آمد که نسبت به روش کلاسن و همکاران او ۱۰ درصد افزایش تولید را نشان می‌دهد. بررسی میکروگراف الکترونی نیز نشان می‌دهد که بیش از ۶۰ تا ۸۵ درصد وزیکول‌ها، شکل فضایی طبیعی خود را حفظ کرده، در مراحل مختلف فرایند خالص‌سازی، سالم مانده‌اند که این میزان نیز در مقایسه با گزارش سایر محققان، از جمله کلاسن و همکارانش افزایش ۲۰ درصدی نشان می‌دهد. چنان‌که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، الگوی حرکت الکتروفورتیک OMV-PorA در SDS-PAGE (ژل ۱۰ درصد) در جایگاه ۴۵ـ۴۰ کیلودالتون به‌صورت یک باند ضخیم قرار گرفته که این نتیجه با یافته‌های سایر محققان، از جمله پیتر و همکاران او (۱۹۹۹) و کلاسن و همکارانش (۱۹۹۶) به‌طور کامل مطابقت دارد [۱۱،۱۷،۱۸و۲۵].

یکی دیگر از مزایای فرایند تخلیصی که در این پژوهش به‌کار رفته، پایین بودن نسبت ناخالصی LPS در OMV-PorA است، زیرا میزان قابل توجهی از دزاکسی کولات جایگزین LPS متصل به OMV-PorA می‌شود. این امر سبب می‌گردد تا میزان LPS موجود در OMV-PorA تا سطح محدوده پذیرش برای تزریق کاهش یابد. بنابراین وزیکول‌های خالص کاملاً عاری از LPS نخواهد شد. اگرچه LPS ماکرومولکولی سمی است، اما میزان کم آن در ثبات و پایداری وزیکول‌ها بسیار مؤثر است. همچنین LPS خود به‌عنوان آدجوانتی فعال که متصل به وزیکول است، عمل می‌کند [۴،۱۷،۱۸،۲۱و۲۵]. با وجود این، انجام آزمون پیروژنی در خرگوش، فقدان خواص پیروژنیک OMV-PorA استخراج شده به روش انتخابی از سروتایپ CSBPI, G-245 را به اثبات می‌رساند؛ به‌طوری که تزریق داخل جلدی ۱۰۰ میکروگرم از OMV-PorA به‌ازای یک کیلوگرم وزن خرگوش سبب افزایش دمای نرمال بدن حیوان نگردید (جدول ۲).

در ادامه مطالعات حاضر، بی‌زیانی مصرف OMV-PorA توسط آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال در خوکچه هندی و موش سوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

به‌طوری که در جدول ۳ و ۴ ملاحظه می‌شود با تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم OMV-PorA خالص به گروه ۵ تایی موش و ۵۰۰ میکروگرم به گروه ۵ تایی خوکچه هندی، هیچ‌گونه ضایعه‌ای در محل تزریق و اعضای داخلی حیوان پس از اتوپسی ایجاد نگردید. به‌علاوه ۷ روز بعد از تزریق نیز کاهش وزن و یا مرگ و میر در بین حیوانات مشاهده نشد.

توان OMV-PorA در القای سنتز آنتی‌بادی‌های اختصاصی با استفاده از آنتی‌سرم هیپرایمیون خرگوش توسط آزمون ژل دابل دیفیوژن به اثبات رسید، به‌طوری که مابین چاهک شماره ۳ و ۲ و چاهک شماره ۱ (مرکزی) باند رسوبی پررنگی مشاهده می‌گردد.

با توجه به بررسی داده‌های کسب شده از آزمون‌های پژوهش حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که OMV-PorA استخراج شده از زیرگروه B *نیسریامننژیتیدیس* را می‌توان به‌تنهایی و یا کونژوگه با واکسن‌های زیرواحد دیگر، به‌عنوان یک ایمنوژن مفید و مؤثر علیه عفونت‌های منگوکوکی زیرگروه B به‌کار برد.

منابع

1. Pollard A.J, Frasch C. Development of natural immunity to Neisseria meningtidis. Vaccine, 2001; 1327-1346.
2. Ala'Aldeen D.A.A. and Cartwright K.A.V. Neisseria meningitidis: vaccines and vaccine candidates. J. Infect., 1996; 33: 153-157.
3. Morley S.L., Pollard A.J. Vaccine prevention of meningococcal disease, Coming soon?. Vaccine. 2002; 20: 666-687...
4. Mrcpch P.A.J. and Frepch L.M. Vaccines for prevention of meningococcal disease. Pediatr. Infect. Dis., 2000; 19(4): 333-345.
5. Romero J.D., outschoorn I.M. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: Capsular or noncapsular?. Clin Microb Rev. 1994; 7(4): 559-575
6. Boslego J., Garcia J., Cruz C., Zollinger W., Brandt B., Ruiz S., et al. Efficacy, safety and immunogenicity of a meningococcal group B (15: P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, chile. Vaccine, 1995; 13(9): 821-829.
7. Lifely M.R., Roberts S.C., Shepherd W.M., et al. Immunogenicity in adult male of a Neisseria meningitidis group B vaccine composed of polysaccharide complexed with outer membrane proteins.Vaccine.1991;9:60-66
8. Kleijin E.D., Groot R., Lafeber A.B. L., et al. Prevention of meningococcal serogroup B infection in children: A protein-Based vaccine induces immunologic memory. J. Infect. Dis., 2001; 184: 98-102.
9. Tabaraie B.,etal. Evaluation of Salmonella porins as broad spectrum vaccine candidate. Microbio. Immuno. 1994;36(7):561-569
10. Massari P., Ram S., Macleod H. et al. The role of proteins in neisserial pathogenesis and immunity. Trend in Microbiology, 2003; 11(2): 87-93.
11. Arigita C., Jiskoot W., Westdijk J., etal. Stability of mono and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. Vaccine, 2004; 22: 629-642
12. Jansen C., Wiese A., Reubsaet L., et al. Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of Neisseria meningitidis. Biochimida et Biophysica Acta, 2000; 1464: 284-298
13. Jansen C., Kuipers B., Vander Biezen J., etal. Immunogenicity of in Vitro folded outer membrane protein PorA of Neisseria meningitidis. FEMS Immun, Med Microb. 2000; 27: 227-233.
14. Ley P.V.D., Poolman J.T. Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain Based on the class 1 outer membrane protein. Infect. Immun., 1992; 60(8): 3156-3161.
15. Vermot C. and Dobelsteen G. Neisseria meningitidis serogroup B: Laboratory correlates of protection. FEMS Immun. Med. Microbiol., 2002; 24: 89-96.
16. SwaminathanB.,MaterG.M.,Reeves M.W., Graves L.M. Ajello G., Bibb W.F. Molecular subtyping of Neisseria meningitidis serogroup B: Comparsion of five methods. J. Clinc. Microbiol., 1996: 34(6): 1468-1473.
17. Claassen J., Meylis J., Ley P.V., et al. Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. Vaccine, 1996; 14(10): 1001-1008
18. Peeters C.C.A.M., claassen I.J.T.M., schuller M., et al. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of Neisseria meningitidis in mice. Vaccine. 1999; 17: 2702-2712.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Cartwright K., Morris R., Rumke H., et al. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of an novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane portein. Vaccine. 1999; 17: 2612-2619.

20. Peterson G.L. Asimplification of the protein assay of Lowry etal. Which is more generally applicable. Anal. Biochem. 1977;83:346-356

21. Wang L.Y. and Frasch C.E. Development on Neisseria meningitidis group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. Infect. Immun., 1984; 46(2): 408-414

22. Harold J., Jennings, Lugowski C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates. J, of Immuno. 1981; 127 (3): 1011-1018.

23. Ouctherlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis prog. Allergy.1962; 6:30.

24. Fukasawa L.O., Dias W.O., Schenkman R.P.F., et al. Adjuvant can improve protection induced by OMV vaccine against Neisseria meningitidis serogroups B/C in neonatal mice. FEMS Immuno. Med Microb, 2004; 41: 205-210.

25. Siadat SD., Behzadian-Nejad Q., Tabaraie B., Najar-Peerayeh Sh., Ahmadi H., Kazemnejad A., Nejati M. et al. Production extraction and evaluation of neisseria meningitides serogroup B outer membrane vesicle containing Pro A. clinc. Microbiol and Lnfect., 2005; 11(52): 140. [Abstract].

www.SID.ir