مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 16، شماره 2 (شماره پیاپی 71)، اردیبهشت 1392، 112-104

تهیه واکسن کونژوگه پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات *هموفیلوس آنفلوانزای* تیپb با پروتئین Keyhole Limpet Hemocyanin و نانوذره Poly lactic-co-glycolic acid و ارزیابی ایمنی آن در مدل حیوانی

حامد یاوری[1]، سید داور سیادت[2]، رضا شاپوری[3]، مهدی شفیعی اردستانی[4*]

1- کارشناسی ارشد زیست شناسی - میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

2- دانشیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

3- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

4- استادیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/6/6 تاریخ پذیرش: 91/9/15

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از نانومواد از پرکاربردترین روش‌های ساخت داروهای نوین است؛ این مواد در افزایش قابلیت دسترسی داروها به هدف بسیار مفیدند. هدف از این مطالعه دستیابی به نانوواکسنی ایمونوژن علیه مننژیت ناشی از باکتری هموفیلوس آنفلوانزا است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، آنتی ژن کونژوگه‌ای از پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات(PRP) هموفیلوس آنفلوانزا و یک مولکول ایمونوژن قوی به نامKeyhole Limpet Hemocyanin(KLH) و نانو ذره‌ای با قابلیت جذب سطحی بالا به نام Poly lactic-co-glycolic acid(PLGA) ساخته شد. جهت بررسی قدرت آنتی ژنیسیته، کونژوگه دو قسمتی و سه قسمتی حاصل به موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد SW1 تزریق شد. بدین منظور موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند که به ترتیب PRP، PRP+KLH، PRP-KLH، PRP-KLH-PLGA و PRP-TT را به همراه ادجوانت کامل فروند به صورت درون عضلانی دریافت کردند. در روز 28 بعد از تزریق، خون‌گیری انجام و نمونه‌های خونی از نظر افزایش تیتر آنتی بادی اختصاصی با تکنیک الایزا مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی میزان ورود به سلول آنتی ژن تولیدی در سلول‌های ایمنی از Immune Cell Uptake Assey و تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند تیتر آنتی بادی IgG در سرم حیوانات ایمن شده با واکسن‌های کونژوگه افزایش می‌یابد. یافته‌ها هم‌چنین حاکی از افزایش ورود به سلول کونژوگه سه قسمتی حاوی نانو ذره در سلول‌های ایمنی میزبان است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بیان‌گر این واقعیت است که آنتی ژن حاوی PLGA به مراتب قدرت جذب و ایمنی‌زایی بیشتری داشته و می‌تواند واکسن قوی‌تری علیه مننژیت هموفیلوسی باشد.

واژگان کلیدی: آنتی ژن کونژوگه، هموفیلوس آنفلوانزا، مننژیت، واکسن

***نویسنده مسئول:** تهران، انیستیتو پاستور ایران ، گروه هپاتیت و ایدز

Email:Shafieeardestani@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا یک باکتری گرم منفی و پلی مورفیسم (چند شکلی) است و می‌توان آن را به اشکال کوکوئید، کوکوباسیل، باسیل و یا رشته‌ای مشاهده نمود(3-1). 75 درصد سویه‌های این باکتری فاقد کپسول هستند؛ این در حالی است که اکثر سویه‌های مهاجم و بیماری‌زای جداشده از بیماران، دارای کپسول تیپ b هستند. جنس پلی ساکارید در سروتیپ b از قندهای 5 کربنه (پنتوز) بوده و از واحدهای پلی‌ریبوزیل ریبیتول فسفات (Polyribosyl ribitol phosphate-PRP) تشکیل شده است. این باکتری باعث مهار فعالیت باکتریسیدالی و اپسونوفاگوستوزی وابسته به کمپلمان در بیماران می‌شود(4، 5). مهم‌ترین بیماری‌های عفونی ناشی از این سویه‌ها، منتژیت است که در آن، قطعات لیپو الیگوساکارید و پپتیدوگلیکان باکتری منجر به افزایش تراوایی سد خونی-مغزی و التهاب منتژ می گردد. در واقع منتژیت، التهاب پرده عنکبوتیه و فضای زیر عنکبوتیه و گاهی سخت شامه است(4).

به طور کلی میزان مرگ و میر ناشی از منتژیت باکتریال در کودکان، 3 تا 20 درصد گزارش شده و هموفیلوس آنفلوانزا مهم‌ترین عامل این نوع منتژیت در کودکان زیر 5 سال است(4). این باکتری از نازوفارنکس به بدن وارد شده، پس از کلونیزاسیون در این ناحیه به خون راه یافته و خود را به منتژ رسانده و با تکثیر در فضای زیر عنکبوتیه و آزاد سازی سایتوکین‌های التهابی و در نهایت ایجاد ادم در این نواحی منجر به کاهش جریان خون مغزی-نخاعی و از کار افتادن خود تنظیمی رگ‌های مغزی و مرگ می‌شود. آنتی بادی محافظت کننده علیه PRP (از کلاس IgG)، از راه جفت به جنین قابل انتقال است و تا حداکثر 6 ماه پس از تولد می‌تواند نوزاد را در برابر عفونت‌های مهاجم ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا حفظ نماید، پس از این سن، سطح آنتی‌بادی محافظت کننده به شدت کاهش یافته و نوزاد مستعد عفونت‌های منتشر و مهاجم به ویژه منتژیت می گردد. لذا واکسیناسیون در فاصله سنی بین 15-2 ماهگی از اهمیت بالایی برخوردار است(4، 5).

در سال 1970 واکسیناسیون با کپسول پلی‌ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزا باعث پیش‌گیری منتژیت در کودکان بالای 20 ماه شد ولی این واکسن در نوزادان زیر 2 سال کارایی ندارد چراکه PRP خالص در این سنین، عیار کمی ار آنتی بادی را القا می‌نماید؛ از دیگر معایب این واکسن القای آنتی بادی‌هایی است که بیش از 90 درصدشان از نوع IgM هستند و نیز تغییر ایزوتیپ باکتری به IgG به ندرت اتفاق می‌افتد(6). به دلیل تمام محدودیت‌های واکسن حاوی PRP خالص، تحقیقات در جهت تولید واکسن‌های موثرتر ادامه یافت و در اوایل دهه 80، محققان موفق به تولید واکسن‌های کونژوگه علیه هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b شدند؛ در این واکسن‌ها PRP به صورت هاپتن به طور شیمیایی به یک حامل پروتئینی متصل می‌شد(7، 8). هاپتن‌ها ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که به تنهایی ایمونوژن نبوده اما با اتصال به یک پروتئین حامل، ایمونوژن می‌شوند(9). با کشف این روش پروتئین‌های مختلفی در کونژوگاسیون مورد مطالعه قرار گرفتند. در این میان تحقیقات روی Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH) بسیار شاخص تراند. کونژوگاسیون موفق KLH با پروتئین‌های سطحی استرپتوکوکوس(10)، زیر واحد B شیگا توکسین(11)، کپسول آلژیناتی سودوموناس آئروژینوزا(12)، پروتئین‌های سطحی پولیوماویروس(13)، فسفاتیدیل اینوزیتول مانوزید سطح مایکوباکتریوم توبرکولوزیس(14)، اپی توپ‌های دیواره باسیلوس آنتراسیس(15) و بسیاری مطالعات دیگرمنجر شد در بیست و چهارمین کنگره سرطان در آلمان واکسن‌های کونژوگه KLH به عنوان ابزارجدید درمانی بیماری‌های مختلف مطرح شود(16). با وجود ایمونوژنیسیته بیشتر PRP کونژوگه با پروتین‌های حامل، محققان همواره به دنبال راهی در افزایش جذب سطحی واکسن‌ها هستند و علم نانوتکنولوژی در این زمینه بسیار موثر بوده است. لذا در این پژوهش ضمن کونژوگاسیون PRP با KLH آن را با PLGA(Poly lactic-co-glycolic acid) که نانوذره‌ای با قابلیت جذب سطحی بالاست همراه نمودیم. PLGA

Archive of SID

www.SID.ir

معمولاً در چرخه‌های سلولی اختلالی ایجاد نمی‌کند و زمان قرارگیری دارو بر روی سلول و مسیر اندوسیتوزی را کاهش می‌دهد. در واقع در یک جمله می‌توان گفت که نانوذرات سدهای بیولوژیک را در می‌نوردند(17).

در این تحقیق سعی شد آنتی‌ژن کونژوگه‌ای از PRP باکتری هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b با KLH و PLGA ساخته و تاثیرات آن را در مدل حیوانی مورد ارزیابی‌های ایمونولوژیکی قراردهیم، تا شاید در راستای مبارزه با مننژیت هموفیلوسی کودکان، واکسنی قوی‌تر را در مقایسه با مطالعات پیشین ارائه دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، جهت تولید انبوه باکتری، هموفیلوس آنفلوانزای تیپ bATCC1623 از کلکسیون سویه‌های استاندارد انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. به طور خلاصه این سویه ابتدا در محیط کشت آگار خون دار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 ساعت کشت داده شد و سپس به منظور تهیه بذر سلولی، محیط کشت اختصاصی هموفیلوس مورد استفاده قرار گرفت. فرایند فرمانتاسیون به منظور تهیه توده سلولی هموفیلوس آنفلوانزا در محیط کشت حاوی Soybean pepton (10 گرم بر لیتر)، dextrose (5 گرم بر لیتر)، Heminchloride (10 گرم بر لیتر)، NAD (10 میلی‌گرم بر لیتر)،yeast extract (10 میلی‌لیتر بر لیتر) در pH=7/3 صورت گرفت. بذر سلولی تهیه شده به مخزن 60 لیتری فرمانتور Flow Cantact (b.v.bilthovan unit) صنعتی حاوی محیط کشت فوق تلقیح و در نهایت توده سلولی حاصل برای استخراج PRP مورد استفاده قرار گرفت(8، 18).

جهت استخراج و خالص سازی PRP، عمل غیر فعال‌سازی باکتری‌ها با استفاده از محلول 0/37-0/35 درصد (حجمی/حجمی) از فرمالین صورت گرفت. محلول رویی(Supernatant) آخرین انتقال محیط کشت جمع‌آوری و تا غلظت نهایی 4 درصد، استات سدیم به آن افزوده شد. سپس تحت شرایط سرما (4 درجه سانتی‌گراد) اتانول به آرامی به آن اضافه و pH در محدوده 6-2 تنظیم شد؛ پس از یک شب نگهداری در یخچال، سانتریفیوژ شده و PRP خام تهیه گردید. PRP خام به دست آمده در آب مقطر آپیروژن حل شده و پس از جدا کردن مواد زاید، ستاولن به آن اضافه شد. رسوب حاصل در کلرید سدیم 0/3 مولار حل و مواد غیر محلول آن نظیر کمپلکس اسیدهای نوکلئیک –ستاولن جدا شدند. در نهایت پس از چند مرحله سانتریفیوژ و رسوب گذاری الکی، حل کردن در آب مقطر و افزودن هیدروکسی آپاتیت به PRP، سوپرناتانت حاصله از فیلتر میلی پور عبور داده شد و پس از دیالیز، PRP تخلیص و لیوفیلیزه گردید(19).

برای آماده ساری PRP جهت کونژوگاسیون، 1 میلی‌لیتراز آن در بافر فسفات حل و سپس با 0/1 میلی‌مول سیانوژن بروماید ترکیب شد؛ آنگاه 1 میلی‌مول اتیل دی متیل آمین پروپیل کربوآمید (EDAC) به عنوان کاتالیزور و سولفو N- هیدروکسی سوکسینامید (sulfo-NHS) جهت پایداری واکنش آمیداسیون به آن اضافه شد. در مرحله بعد 1 میلی‌مول آدیپیـــک اسید دی هیدرازید (ADH) به عنوان لینکری برای اتصال بین دو ترکیب PRP و KLH به ظرف واکنش اضافه و به مدت نیم ساعت در 10000 دور سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل حاوی PRP متصل به ADH یا PRP فعال است. 0/1 میلی‌مول KLH را با 0/1 میلی‌مول EDAC و 0/1 میلی‌مول sulfo-NHS ترکیب و سپس PRP فعال شده به صورت قطره قطره به آن اضافه گردید و کمپلکس PRP-KLH ساخته شد. در مرحله بعد 1 میلی‌مول محلول کونژوگه حاصل با ترکیب PEG3400-COOH-PLGA در حضور 1 میلی‌مولEDAC و sulfo-NHS واکنش داده شد. بدین ترتیب کونژوگه PRP-KLH-PLGA به دست آمد که با استفاده از روش کروماتوگرافی سفادکس G75 خالص سازی شد.

جهت آزمودن قدرت ایمنی‌زایی واکسن تولید شده، از موش‌های نر32-28 گرمی نژاد SW1 استفاده شد. موش‌ها از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات انیستیتو پاستور ایران تهیه و در اتاق حیوانات با دمای کنترل شده 2±23

Archive of SID

www.SID.ir

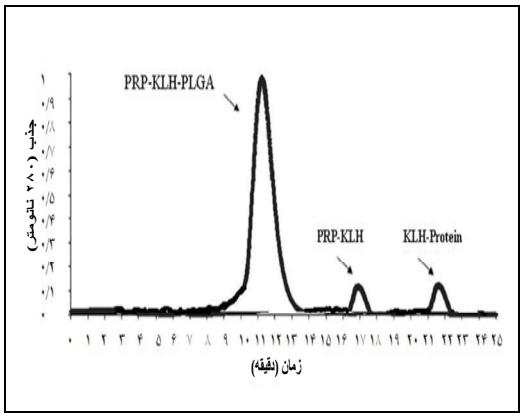
سانتـی‌گراد و دو رهنوری 12 سـاعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند.آزمایشات روی تمامی گروه‌های مورد بررسی در شرایط کاملا یکسان و مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر مبنای بیانیه هلسینکی صورت گرفت. حیوانات به 5 گروه 6 تایی تقسیم شدند؛ این گروه‌ها به ترتیب30 میکروگرم PRP، PRP+KLH ، PRP-KLH،PRP-KLH-PLGA و PRP-TT را به همراه ادجوانت کامل فروند به صورت درون عضلانی دریافت کردند. 14 روز بعد از تزریق اول دوز یاد آور به حیوانات تزریق شد، در روز 28 خون‌گیری از موش‌ها انجام شد. خون گرفته شده، سانتریفیوژ و سرم حاصله از نظر تیتر Total IgG توسط تکنیک الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

جهت بررسی میزان ورود به سلول آنتی ژن تولیدی در سلول‌های ایمنی از تست Immune Cell Uptake Assey و ارزیابی آن با فلوسایتومتری انجام شد. در این آزمایش نوتروفیل‌های جداسازی شده از خون حیوانات را با 50 میکرولیتر محلول 1 مولار نانوکونژوگه مخلوط کرده و به مدت 60 دقیقه در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه در سانتریفیوژ 1800 دور قرار گرفتند و رسوب تهیه شده با بافر فسفات شستشو و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر آنالیز گردید.

داده‌های خام حاصل از آزمایشات با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون واریانس یک طرفه با تست Post Hoc Tukey با سطح معنی‌داری $p<0/05$ آنالیز و به صورت میانگین±انحراف معیار ارایه شدند.

یافته ها

در این مطالعه جداسازی ماکروملکول کونژوگه از غیر کونژوگه با استفاده از کروماتوگرافی (سفادکس G75) انجام شد. با توجه به این که در سیستم سفادکس G75 مولکول‌های درشت‌تر، زودتر خارج می‌شوند به طور تئوریک کونژوگه 3 قسمتی زودتر خارج شده و پیک اول و بلندتر نمودار شدت جذب را به خود اختصاص می‌دهد(شکل 1). در این سیستم تنها پروتئین‌ها جذب دارند، PRP و PLGA چون ساختار پروتئینی ندارند فاقد جذب UV هستند.

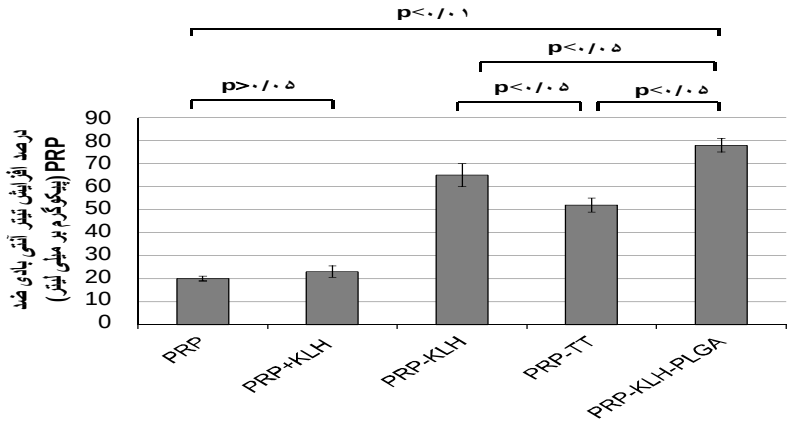


شکل1. جداسازی ماکروملکول‌های 3 قسمتی از ماکروملکول‌های 2 قسمتی و غیرکونژوگه

نتایج تست الایزا حاکی از آن است که تیترآنتی‌بادی اختصاصی بعد از دریافت آنتی ژن در گروه‌های PRP و PRP+KLH افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (PRP-TT) نداشته؛ در مقابل تیتر این آنتی بادی در گروه دریافت کننده کونژوگه PRP-KLH به طور معنی‌داری افزایش یافته است. بررسی‌ها هم‌چنین نشان داد که نانوواکسن (PRP-KLH-PLGA) القا کننده بالاترین تیتر آنتی بادی در مقایسه با دیگر گروه‌ها است. این افزایش در مقایسه با گروه کنترل و گروه PRP-KLH با $p<0/05$، و در مقایسه با گروه PRP با $p<0/01$ معنی‌دار بود.

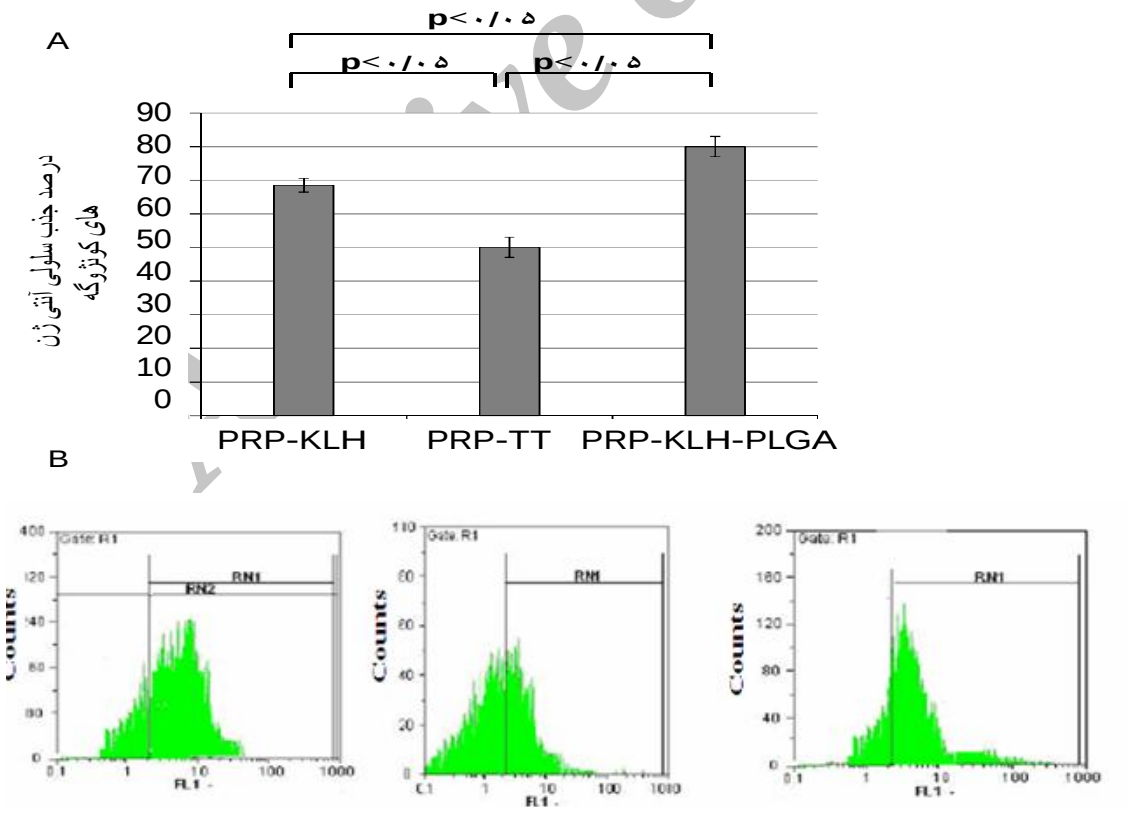
Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2 . افزایش تیتر آنتی بادی اختصاصی (IgG) در گروه‌های مورد آزمایش. همان طور که می‌بینید کونژوگاسیون PRP با KLH میزان ترشح آنتی بادی اختصاصی را به طور معنی‌داری(p<0/05) افزایش داده است؛ این افزایش در مورد آنتی ژن کونژوگه PRP-KLH-PLGA به مراتب بیشتر(p<0/01) بوده است.

نتایج حاصل از تست Immune Cell Uptake Assay حاکی از افزایش معنی‌دار (p<0/05) ورود به سلول شدن آنتی ژن‌های کونژوگه در سلول‌های ایمنی نسبت به PRP-TT بود(شکل 3). با این حال آنتی ژن حاوی نانوذره (PRP-KLH-PLGA) نسبت به آنتی ژن PRP-KLH، جذب سلولی (فاگوسیتوز) بیشتری داشته و با p<0/05 افزایش معنی‌داری نسبت به گروهPRP-KLH نشان می‌دهد.



شکل3. بررسی میزان ورود به سلول آنتی‌ژن‌های کونژوگه (تکنیک فلوسایتومتری).A: مقایسه میزان cellular uptake آنتی‌ژن‌های کونژوگه.B : تصاویر دستگاه فلوسایتومتر از ورود آنتی‌ژن‌های کونژوگه به درون سلول‌های ایمنی (فاگوسیتوز). آنتی‌ژن حاوی نانوذره جذب سلولی یا فاگوسیتوز بیشتری را نشان داده است.

www.SID.ir

بحث

در تحقیق حاضر، اثر ایمنی زایی تزریق کپسول پلی ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b به تنهایی و همراه با KLH و PLGA بررسی شد. نتایج حاکی از آن است که PRP به تنهایی ایمونوژنیسیته پایینی داشته ولی ترکیب PRP-KLH ایمنی زایی آن را به مراتب افزایش می‌دهد؛ از طرفی همراه نمودن این کونژوگه دو قسمتی با نانو ذره PLGA به دلیل توانایی اندرکنش بیشتر با سلول‌های ایمنی باعث بالا بردن تیتر آنتی بادی اختصاصی شده است.

PRP جزء آنتی ژن‌هایی است که برای ایجاد پاسخ ایمنی علیه آن، نیاز به حضور لنفوسیت‌های B است و از طرف دیگر در نوزادان سلول‌های B کمتر تکامل یافته‌اند، بنابراین بیشتر کودکان کمتر از دو سال پاسخ ایمنی ضعیفی نسبت به آنتی ژن PRP دارند. واکسن موثر باید آنتی‌بادی‌هایی با میل پیوندی بالا و تشکیل سلول B خاطره را القا کند، هر دو این واکنش‌ها تنها در صورتی اتفاق می‌افتند که واکسن بتواند سلول‌های T کمکی (T-helper) را فعال سازد(20). سلول‌های کمکی فعال شده توسط آنتی ژن، CD40L را بروز می‌دهند که به CD40 روی لنفوسیت‌های B و ماکروفاژها متصل می‌شود و این سلول‌ها را فعال می‌سازد(21). واکسن‌های اولیه علیه هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b که تنها حاویPRP بودند به دلیل ماهیت فیزیکی و شیمیایی خود قادر به تحریک ایمنی سلولی و لنفوسیت‌های T نبوده و جز آنتی ژن‌های مستقل از سلول T طبقه‌بندی می‌شوند(22)، لذا توانایی ایجاد مصونیت در مقابل منتژیت هموفیلوسی نوزادان را نداشتند. یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها در سوئیچ پاسخ‌های مستقل از سلول T به سمت پاسخ‌های وابسته به T، ایجاد کونژوگه هاپتن- ناقل (Hapten-Carrier) Complex است(23، 24). در واقع در بعضی از عفونت‌ها که در آن، آنتی ژن، یک پلی ساکارید کپسولی است، پلی ساکارید به صورت کوالان به یک پروتئین خارجی متصل می‌شود، این گونه واکسن‌ها که واکسن‌های کونژوگه نامیده می‌شوند سریع‌تر از واکسن‌های پلی ساکاریدی فاقد پروتئین‌های متصل شونده، آنتی‌بادی‌های با میل پیوندی بالا و خاطره ایمونولوژیک را القا می‌کنند(20). از جمله ایمونوژن ترین این حامل‌های پروتئینی که کارامدی‌اش در افزایش ایمنی‌زایی واکسن‌های پلی ساکاریدی در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است KLH است که به دلیل داشتن اسید آمینه‌های لایزین در ساختارش برای کونژوگاسیون بسیار مناسب است.

در مطالعه حاضر مکانیسم افزایش ایمنی‌زایی آنتی ژن کونژوگه PRP-KLH نسبت به PRP ایجاد پاسخ ایمنی وابسته به T و تولید آنتی بادی‌هایی با میل پیوندی بالا و تشکیل سلول B خاطره است.

در سال 2006 نوگبائورو همکاران دریافتند کونژوگه نمودن KLH با پروتئین‌های سطحی پولیوماویروس آن را بسیار ایمونوژن تر می‌کند(13). بونیاراتاناکالو همکاران در سال 2008 کونژوگه KLH با فسفاتیدیل اینوزیتول مانوزید سطح مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را به عنوان کاندید جدید واکسن بیماری سل مطرح کردند(14). در سال 2009 نیز کونژوگه KLH به اپی توپ‌های دیواره باسیلوس آنتراسیس به عنوان واکسن بسیار قوی‌تری علیه این باکتری عنوان شد(15). یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات پیشین در اتصال KLH به دیگرآنتی‌ژن‌های باکتریایی کاملاً مطابقت داشته و مطالعات مخالفی در این زمینه تاکنون گزارش نشده است.

امروزه در راستای ساخت واکسن‌هایی موثرتر به دنبال افزایش جذب سطحی آنتی‌ژن‌های طراحی شده توسط سلول‌های ایمنی هستند، نانوتکنولوژی در این زمینه ابزاری بسیار کار آمد است. در مطالعه‌ای در سال 2010 اثبات شد که آنتی ژن‌ها و فاکتورهای رشد انسانی به طور موفقیت‌آمیزی در نانوذره PLGA یا بستری از آن ترکیب می‌شوند. از سال 1999 اداره غذا و داروی آمریکا استفاده از PLGA را در داروهای مختلف و به خصوص در داروهای ضد سرطانی مورد تایید قرار داده است(26).

در این پژوهش نیز این نانوذره جهت همراهی با PRP-KLH و ساخت نانو آنتی ژن کونژوگه به کار گرفته شد. نتایج حاصل از تست‌الایزا، Immune Cell Uptake Assay و فلوسایتومتری حاکی از افزایش معنی‌دار تیتر آنتی

Archive of SID

www.SID.ir

بادی اختصاصی (IgG) و هم‌چنین موید جذب سطحی بیشترآنتی ژن سه قسمتی در مقایسه با PRP-TT (واکسن متداول کونژوگه شده با توکسوئید تتانوس) و PRP-KLH است. در واقع اضافه شدن PLGA به کونژوگهPRP-KLH باعث افزایش نفوذپذیری و جذب آن در سلول‌های ایمنی شده است. مکانسیم عملکرد اینواکسن در افزایش ایمنی‌زایی، نانوسایز بودن، قابلیت ترکیب بالا با نوتروفیل‌ها و ماکروفازها برای ترشح آنتی‌بادی بیشتر است که می‌توان آن را به دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل و قطبی فراوان در سطح مولکول کروی PLGA نسبت داد.

کاباو همکاران در سال 2009 نشان دادند نانوپارتیکل‌ها همانند سلول‌های دندریتیک در افزایش عرضه آنتی‌ژنی در جهت پاسخ‌های آنتی بادی و فاگوسیتوز آنتی‌ژن‌ها توسط سلول‌های ایمنی و CTLs (لنفوسیت‌های T سایتولیک) عمل می‌کنند(27). در تحقیقی که در سال 2011 انجام شد PLGA به عنوان حامل مناسبی برای انتشار تسهیل یافته آنتی‌ژن‌ها با قابلیت لیگاند شدن اختصاصی با مولکول‌های هدف و افزایش تیتر ایمونوگولوبولین‌ها و افزایش معنی‌دار پاسخ‌های ایمنی مطرح شد(28). این مطالعات با نتایج پژوهش ما مطابقت داشته و تأییدی بر صحت نتایج به دست آمده در این پژوهش است.

محدودیت مطالعه حاضر ناشی از کمبود مطالعات همه جانبه در زمینه به کارگیری PLGA با هدف ساخت نانوواکسن‌ها است و این امر از نوپایی عرصه نانو در تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی نشات می‌گیرد.

نتیجه گیری

کونژوگاسیون PRP هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b با KLH قادر است ایمنی‌زایی و فاگوسیتوز آن را افزایش دهد؛ ولی کونژوگاسیون این آنتی ژن دوقسمتی با نانوذره PLGA به دلیل افزایش قدرت فاگوسیتوزه شدن آنتی ژن توسط سلول‌های ایمنی باعث افزایش قابل توجه‌ای در ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی اختصاصی در بدن میزبان می‌شود. در واقع این نانوآنتیژن، واکسنایمونوژن تر وقوی‌تری علیه منتژیت هموفیلوسینوزا داناست. این تحقیق در راستای اهداف بلندپایه سازمان بهداشت جهانی مبنی بر کاهش میزان شیوع منتژیت باکتریال در جهان انجام شده است و امید است در جهت تحقق شعار این سازمان که گفته است: "هیچ کودکی در هیچ جای جهان نباید در اثر یک بیماری قابل پیش‌گیری صدمه ببیند یا کشته شود" قدمی برداشته باشد.

تشکر و قدر دانی

مولفین مراتب سپاس و قدردانی خود از مدیریت محترم انیستیتو پاستور ایران که منابع مالی و امکانات مورد نیاز این پروژه را تامین نمودند اعلام می‌دارند. هم‌چنین از سرکار خانم مرضیه قاسمی به خاطر مشاورت علمی شان بسیار سپاسگزاریم.

منابع

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Mosby; 2005.
2. Peltola H. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clinical Microbiology Reviews. 2000;13(2):302-17.
3. Jawetz M, editor. Adelberg's Medical Microbiology. Twenty; 2007.
4. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. Immunology. 2004;113(2):163-74.
5. Cripps AW, Foxwell R, Kyd J. Challenges for the development of vaccines against Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis. Current opinion in immunology. 2002;14(5):553-7.
6. Li W, Sydney Chung S. Flow cytometric evaluation of leukocyte function in rat whole blood. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2003;39(10):413-9.
7. Eskola J, Ward J, Dagan R, Goldblatt D, Zepp F, Siegrist C-A. Combined vaccination of Haemophilus influenzae type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis. Lancet. 1999;354(9195):2063-8.
8. Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P, Crane D, Belgrave D, Corbel MJ. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO International Standard for Haemophilus influenzae b capsular polysaccharide. Biologicals. 2007;35(4):235-45.

Archive of SID

www.SID.ir

and their functionalization with model ligands. Journal of controlled release. 2006;111(1):135-44.
18. Takagi M, Zangirolami TC, Tanizaki MM, Crespo J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by Haemophilus influenzae type b. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Microbiology. 2007:602-8.
19. Merritt J, Allard G, O'Toole L, Swartz R, Licari P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from Haemophilus influenzae. Journal of biotechnology. 2000;81(2):189-97.
20. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology Saunders Elsevier. International Edition, 6th. 2007.
21. Tiwari S, Goyal AK, Mishra N, Khatri K, Vaidya B, Mehta A, et al. Development and characterization of novel carrier gel core liposomes based transmission blocking malaria vaccine. Journal of controlled release. 2009; 140(2): 157-65.
22. Tiwari SH, Goyal A. Development and characterization of novel carrier gel core liposomes based transmission blocking malaria vaccine. Nanomedidine. 2009; 140:157-65.
23. DelVecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA, Kraycer JA, Estock F, et al. Brucella proteomes-a review. Veterinary microbiology. 2002;90(1):593-603.
24. Delvecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA, Kraycer JA, Estock F, Elzer P, et al. Brusella proteome-a review.Vet Microbial. 2002; 90(1-4):539-603.
25. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. Advanced drug delivery reviews. 2011;63(3):170-83.
26. Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. Advanced drug delivery reviews. 2009;61(2):140-57.
27. Bandyopadhyay A, Fine RL, Demento S, Bockenstedt LK, Fahmy TM. The impact of nanoparticle ligand density on dendritic-cell targeted vaccines. Biomaterials. 2011; 32(11): 3094-105.
9. Rappuoli R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. Vaccine. 2001;19(17):2319-22.
10. McMillan DJ, Batzloff MR, Browning CL, Davies MR, Good MF, Sriprakash KS, et al. Identification and assessment of new vaccine candidates for group A streptococcal infections. Vaccine. 2004;22(21):2783-90.
11. Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. Infection and immunity. 2005;73(10):6523-9.
12. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. Infection and immunity. 2003; 71(7): 3875-84.
13. Neugebauer M, Walders B, Brinkman M, Ruehland C, Schumacher T, Bertling WM, et al. Development of a vaccine marker technology: Display of B cell epitopes on the surface of recombinant polyomavirus-like pentamers and capsoids induces peptide-specific antibodies in piglets after vaccination. Biotechnology journal. 2006;1(12):1435-46.
14. Boonyarattanakalin S, Liu X, Michieletti M, Lepenies B, Seeberger PH. Chemical synthesis of all phosphatidylinositol mannoside (PIM) glycans from Mycobacterium tuberculosis. Journal of the American Chemical Society. 2008;130(49):16791-9.
15. Leoff C, Saile E, Rauvolfova J, Quinn CP, Hoffmaster AR, Zhong W, et al. Secondary cell wall polysaccharides of Bacillus anthracis are antigens that contain specific epitopes which cross-react with three pathogenic Bacillus cereus strains that caused severe disease, and other epitopes common to all the Bacillus cereus strains tested. Glycobiology. 2009; 19(6): 665-73.
16. Schumacher K. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) conjugate vaccines as novel therapeutic tools in malignant disorders. Journal of cancer research and clinical oncology. 2001;127:1-2.
17. Fischer S, Foerg C, Ellenberger S, Merkle HP, Gander B. One-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles

Archive of SID

www.SID.ir