

ارزیابی کارایی نانوکمپلکس AJC-F در ارتقای ایمنی‌زایی واکسن هپاتیت ب

فرانک خرازی^۱، مجتبی داربویی^۲، مهدی مهدوی^۳، محمد حسن نظران^۴^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات فارس^۲ دکترای ژنتیک مولکولی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات فارس^۳ استادیار، دکترای ایمونولوژی، گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران^۴ کارشناس الکترونیک نانو تکنولوژی، واحد توسعه و تحقیقات، شرکت صدور احراز شرق

چکیده

سابقه و هدف: شیوع ابتلا به بیماری هپاتیت ب، وجود جمعیت‌های غیر پاسخگو به واکسن موجود و ضعف ادجوانت کلاسیک آلوم در القای پاسخ ایمنی سلولی نشان دهنده ضرورت طراحی واکسن‌های کارا تر می‌باشد. بررسی‌های متعددی بر هم کنش عنصر آهن و سیستم ایمنی را به اثبات رسانده‌اند. در بررسی حاضر، اثرات دو ساختار محتوی آهن، شامل سولفات آهن و نانوکمپلکس AJC-F را بر ارتقای ایمنی‌زایی واکسن هپاتیت ب مورد ارزیابی قرار دادیم.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، به موش‌های Balb/c در سه دوره واکسن هپاتیت B تزریق گردید. به یک گروه همراه با واکسن نانوکمپلکس AJC-F و به گروه دیگر سولفات آهن تزریق شد. پاسخ تکثیر ضد HBS Ag لنفوسیت‌های طحالی با روش BRDU و سطح کلی آنتی بادی اختصاصی ضد HBS Ag، اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما با روش الیزا ارزیابی شد. آنالیز آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام گردید.

یافته‌ها: نانوکمپلکس AJC-F سطح کلی آنتی بادی اختصاصی ضد HBS Ag و سیتوکین‌ها را نسبت به گروه سولفات آهن و کنترل به شکل معنی‌داری افزایش داد. سولفات آهن موجب کاهش شدید سطح آنتی بادی و اینترلوکین ۴ نسبت به گروه کنترل گردید. هر دو ترکیب تکثیر لنفوسیتی و سطح اینترفرون گاما را نسبت به گروه کنترل افزایش دادند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که نانوکمپلکس AJC-F به عنوان ساختار محتوی آهن می‌تواند سطح ایمنی سلولی و همورال را در واکسن هپاتیت بی به شدت ارتقا دهد.

واژگان کلیدی: ادجوانت، نانو تکنولوژی، واکسن هپاتیت ب، آهن.

مقدمه

ویروس هپاتیت ب عامل مهم ایجاد بیماری‌های کبد و از جمله سرطان کبد در انسان می‌باشد. واکسیناسیون افراد در معرض خطر، مانند کادر بیمارستانی، با آنتی ژن سطحی ویروس (HBSAg) به عنوان مهم‌ترین استراتژی برای پیشگیری و همچنین کنترل عفونت هپاتیت ب معرفی گردیده است.

اصولاً هدف واکسیناسیون ایجاد پاسخ ایمنی قوی برای ایجاد حفاظت طولانی مدت علیه عفونت است. به طور کلی واکسن‌ها، عمدتاً شامل فرمولاسیون‌های متعددی از جمله پاتوژن‌های زنده ضعیف شده، پاتوژن‌های کشته شده و واکسن‌های زیر واحدی می‌باشند (۱).

واکسن هپاتیت ب نیز از دسته آخر (واکسن‌های زیر واحدی) است که محتوی HbsAg، آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B می‌باشد. برای رسیدن به ایمنی‌زایی کافی، برخلاف واکسن‌های زنده ضعیف شده، عموماً آرگانیزم کامل کشته شده یا

Nanochelating به منظور استفاده به عنوان ادجوانت در واکسن هیپاتیت ب شدید. این ساختار، به شکل بنیادین در ابعاد نانو طراحی شده است و به دلیل نقش انکارناپذیر یون آهن بر سیستم ایمنی، در این نانوکمپلکس یون آهن به کار گرفته شده است. قرار گیری ابعاد کمپلکس مورد نظر در مقیاس نانو در کنار ساختار ویژه آن ترکیبی را شکل داده است که به نظر می‌رسد قابلیت اثرگذاری هدفمند بر سیستم ایمنی را داشته باشد. در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر AJc-F بر افزایش کیفیت واکسن هیپاتیت B مورد ارزیابی قرار گرفته است و با سولفات آهن مقایسه شده است. ادجوانت فوق محلول در آب بوده و در مطالعه حاضر به صورت مخلوط شده با واکسن موجود هیپاتیت ب به حیوانات تزریق شده است. در نهایت جهت بررسی دقیق کارایی این ساختار بر سیستم ایمنی پارامترهای متعددی از ایمنی همورال و سلولی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روشها

نانو کمپلکس AJc-F

این نانوکمپلکس بر اساس تکنولوژی Nanochelating (ثبت شده در اداره ثبت اختراعات و علامات تجاری آمریکا، USPTO به شماره ی US20120100372A1) سنتز شده است.

حیوانات

در این مطالعه تجربی، از ۳۰ موش بلب سی نر ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. یک هفته قبل از شروع آزمایش موش‌ها به اتاق حیوانات منتقل شدند. در طول مدت نگه داری دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و سیکل روشنایی و تاریکی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) تنظیم شده بود.

گروه بندی

حیوانات به ۳ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (واکسن)، گروه AJc-F+ واکسن (با دوز ۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم)، و گروه سولفات آهن (با دوز ۴ میکروگرم بر کیلوگرم) (جدول ۱). دوز سولفات آهن بر اساس میزان آهن موجود در ساختار AJc-F تعیین گردید تا مقایسه تیمارها بر مبنای مقادیر یکسان از عنصر آهن باشد.

پروسه ایمنی زایی

گروه های تجربی سه بار و به فاصله دو هفته در روزهای ۰، ۱۴ و ۲۸ با دوز $10 \mu\text{g HBs} / \text{mice}$ تحت تزریق داخل صفاقی قرار گرفتند. دو هفته پس از آخرین تزریق ارزیابی پاسخ‌های ایمنی در گروه های تجربی انجام شد.

واکسن‌های زیر واحدی برای تاثیر گذار بودن، نیاز به افزودن یک ادجوانت موثر و بی خطر دارند (۲، ۳).

واژه ادجوانت به معنی کمک یا افزایش، از کلمه لاتین adjuvare مشتق شده است (۳) ادجوانت‌ها ترکیباتی هستند که واکنش ایمنی علیه آنتی‌ژن‌ها را ارتقاء می‌دهند (۲). در حقیقت ادجوانت‌ها موجب افزایش میزان عرضه آنتی‌ژن و پایداری آن شده و یا به عنوان یک تعدیل کننده سیستم ایمنی عمل می‌کنند. در یک دسته بندی ترکیبات محرک ایمنی را در ۳ دسته ادجوانت‌ها، ناقل‌های غیر زنده و حامل‌ها تقسیم بندی می‌شوند. از ادجوانت‌های شناخته شده می‌توان به نمک‌های آلومینیوم و ساپونین، از حامل‌ها به اسیدهای چرب و وکتورهای زنده و از ناقل‌ها به امولسیون‌های روغنی اشاره نمود (۴).

مشاهده شده است که حدود ۱۰٪ از افراد سالم واکسینه شده با واکسن هیپاتیت ب پاسخ ایمنی مناسبی بر علیه واکسن از خود نشان نمی‌دهند. این پدیده که به عنوان non-responding تلقی می‌شود، در بیماران دیابتی و یا دیالیزی نیز دیده شده است. اگر چه ادجوانت به کار گرفته شده در این واکسن آلود می‌باشد، اما اعتقاد بر این است که ممکن است بهینه سازی ادجوانت موجب برطرف شدن این مشکل گردد. ادجوانت شناخته شده آلود به خوبی قادر است پاسخ ایمنی از نوع همورال (TH2) را برانگیزد، اما درالقای پاسخ ایمنی سلولی (TH1) که برای مقابله با بسیاری از پاتوژن‌ها اهمیت دارد فاقد کارایی است (۲) و به همین دلیل ارتقای ایمنی سلولی به واسطه ادجوانت‌های گوناگون بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این راستا تحقیقات متعددی جهت طراحی و ساخت ادجوانت‌هایی با ایمنی زایی بهتر انجام گرفته است.

پژوهش‌های گوناگون نشان می‌دهد که متابولیسم عناصر ریز مغذی مانند آهن، سلنیم و ... بر عملکرد سیستم ایمنی اثرگذار است، به شکلی که کمبود و یا اضافه بار این عناصر می‌تواند موجب اختلال در واکنش‌های دفاعی علیه بیماری‌ها و یا ایمنی‌زایی بعد از استفاده از واکسن گردد (۵، ۶). از این رو ساختارهایی که بتوانند بر هومئوستاز عناصر ریز مغذی در بدن اثر بگذارند قادر خواهند بود سیستم ایمنی را نیز تحت تاثیر خود قرار دهند. از این رو این فرضیه مطرح شده است که با استفاده از این ساختارها می‌توان سیستم ایمنی را تقویت نموده و پاسخ‌دهی به واکسن را با استفاده از اثر شبه ادجوانتی آنها افزایش داد.

با تلفیق تکنولوژی نانو و Chelating برای اولین بار موفق به ساخت نانوکمپلکسی با نام AJc-F بر اساس تکنولوژی

جدول ۱- گروه‌های مورد مطالعه

مداخله‌ی انجام شده	گروه‌ها
۳ بار تزریق واکسن تجاری هیاتیت بی به فاصله‌ی دو هفته	گروه واکسن (کنترل)
۳ بار تزریق واکسن تجاری هیاتیت بی به همراه ۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم به فاصله‌ی دو هفته	گروه نانوانجیوات AJC-F
۳ بار تزریق واکسن تجاری هیاتیت بی به همراه ۲ میکروگرم بر کیلوگرم به فاصله‌ی دو هفته	گروه سولفات آهن

جمع آوری نمونه‌ها

جهت خون‌گیری، دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون موش‌ها با استفاده از پی پت پاستور از گوشه داخلی چشم آنها خون‌گیری شد و دراپندرف جمع‌آوری گردید. جهت جداسازی سرم ابتدا خون یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا لخته گردید سپس با استفاده از پی پت پاستور لخته باز شد و در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم حاصل با سمپلر به اپندرف دیگر منتقل و بار دیگر سانتریفیوژ شد و در نهایت سرم عاری از لخته جدا و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تهیه سوسپانسیون طحالی

برای جداسازی سلول‌های طحال موش، ابتدا موش‌ها نخاعی شده و برای چند ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. موش از قسمت راست بدن روی تخته جراحی در زیر هود تحت شرایط استریل قرار داده شد و به کمک قیچی استریل پوست موش برش داده شد. پس از کنار زدن پوست شکم پرده صفاقی را قیچی نموده و با پنس استریل، طحال را از بافت‌های مجاور مجزا کرده و با قیچی آن را از چربی‌های اطراف جدا نموده و در پلیت استریل درون بافر PBS حاوی ۲ درصد FBS سرد قرار داده شد. طحال با کمک ته‌سرنگ به آرامی له گردیده و به کمک پی پت پاستور چندین بار پیپتاژ نموده و سوسپانسیون سلولی به داخل لوله فالكون ریخته شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۳۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به رسوب به دست آمده بافر لیزکننده گلبول قرمز به حجم ۵ml اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه در مجاورت یکدیگر بودند. در این مدت گلبول‌های قرمز لیز گردید. جهت خارج نمودن سلول‌ها از شوک اسموتیک به آنها مقدار ۵ ml محیط RPMI-1640+5% FBS اضافه نموده و بعد از قرار دادن سوسپانسیون به مدت نیم ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و جدا نمودن سلول‌ها از توده بافتی، دو بار در PBS سرد و دور ۳۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شستشو داده شد. سپس در محیط کشت کامل سوسپانسیون شده و یک

نمونه از آن با رنگ تریپان بلو رنگ شده و به کمک لام نئوبار شمارش گردید و درصد سلول‌های زنده مشخص شد و در نهایت در محیط RPMI-1640 کامل به تعداد 3×10^6 سلول در میلی لیتر سوسپانسیون شده و جهت انجام آزمایش‌های بررسی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها به روش BRDU

از سوسپانسیون‌های سلولی 3×10^6 cell/ml به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معادل 3×10^5 cell/ml در هر حفره پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی آنتی ژن HBsAg با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ به حفره‌های آنتی ژن مثبت (غلظت نهائی آنتی ژن ۵ میکروگرم در میلی لیتر شده است) و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل فاقد آنتی‌ژن به حفره‌های آنتی ژن منفی به عنوان کنترل مطالعه افزوده شد. حجم نهایی تمام حفرات ۲۰۰ میکرو لیتر بود و پس از کشت ۷۲ ساعته در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 به هر حفره ۲۰ میکرولیتر از BrdU به رقت ۱:۱۰۰ اضافه گردید و ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 قرار داده شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس به کمک سمپلر به آرامی محیط کشت از چاهک‌ها برداشته شد و پلیت‌ها با ششوار به مدت ۴۰ دقیقه خشک گردید. ۲۰۰ میکرولیتر بافر Fix/Dent به هر حفره افزوده شد و پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. محتویات داخل چاهک‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر Anti-BrdU-HRP با رقت ۱:۱۰۰ به تمام حفرات به غیر از بلانک افزوده شد و پلیت‌ها ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از طی زمان لازم محتویات داخل چاهک‌ها تخلیه و با بافر PBS، چهار مرتبه شستشو داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا TMB به هر حفره اضافه شد و بعد از ۵-۳ دقیقه با استفاده از محلول H_2SO_4 واکنش متوقف و جذب نوری پلیت‌ها با دستگاه ای‌زا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید و نتایج بر اساس اندیکس تحریک (جذب حفرات تحریک نشده/ جذب حفرات تحریک شده) محاسبه گردید.

بررسی الگوی سایتوکائینی

از سوسپانسیون‌های سلولی 3×10^6 cell/ml به مقدار ۱ میلی لیتر در هر حفره پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی $5 \mu\text{g}$ آنتی ژن اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵% CO_2 به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سانتریفیوژ نمودن در rpm ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سپس محلول رویی هر چاهک به

غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر در پلیت‌های الیزا ریخته شد. پلیت‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند تا آنتی ژن به کف پلیت کوت شود. پلیت‌ها یک بار با بافر شستشو، شستشو داده شدند و سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر بلاک کننده به حفرات ریخته شد و پلیت‌ها برای یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پلیت‌ها یک بار با بافر شستشو، شستشو داده شدند و به خوبی روی روزنامه کوبیده شدند، تا هیچ بافری داخل حفرات باقی نماند. سرم‌ها به نسبت ۱۰۰۰ برابر با با بافر رقیق کننده رقیق شدند. به حفرات مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده ریخته شد و پلیت‌ها ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پلیت‌ها ۵ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو برای مدت ۳-۵ دقیقه شستشو شدند. آنتی‌ایزوتیپ‌های IgM، IgG2a، IgG2b، IgG1 که همگی از منبع Goat بودند را ۱/۱۰۰۰ در بافر رقیق کننده رقیق نموده و به حفرات مربوطه ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید و پلیت‌ها ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پلیت‌ها ۵ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو برای مدت ۳-۵ دقیقه شستشو شدند. در مرحله بعد Rabbit anti goat HRP conjugate را به نسبت ۱/۱۰۰۰۰ در بافر رقیق کننده رقیق نموده و ۱۰۰ میکرولیتر به تمامی حفرات اضافه گردید و پلیت‌ها ۱ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پلیت‌ها ۵ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو برای مدت ۳-۵ دقیقه شستشو شدند. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB ریخته شد و پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شدند. برای متوقف نمودن واکنش به حفرات ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال ریخته شد. پلیت‌ها بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شدند.

آنالیز آماری داده‌ها

از تمامی داده میانگین به دست آورده شد و سپس از میانگین‌های به دست آمده در آنالیز آماری استفاده گردید. برای مقایسه میانگین نمونه‌ها از t-test و Anova با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد، حدود اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار بود.

یافته‌ها

اثر AJc-F بر سطح سیتوکین های IL-4 و IFN- γ

بررسی اثر AJc-F بر سیتوکین‌ها نشان داد که این نانوکمپلکس اینترفرون گاما را نسبت به گروه کنترل به شکل معنی دار و معادل ۱۰۵٪ افزایش داد (شکل ۱). AJc-F

دو اپندورف ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و تا زمان انجام تست در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تست الیزا برای سنجش میزان سایتوکاین‌های مذکور با استفاده از کیت‌های تجاری اختصاصی اندازه‌گیری IFN- γ و IL-4 موشی (R&D) انجام شد. با توجه به منحنی استاندارد حاصل از OD چاهک‌های استاندارد، میزان IFN- γ و IL-4 مربوط به نمونه‌های مورد آزمایش محاسبه گردید.

بررسی پاسخ‌های همورال

به منظور بررسی سطح آنتی بادی، تست الیزا بر روی تمامی نمونه‌های سرم انجام گردید. سرم‌های هر مرحله از آزمایش جمع آوری شده و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از اتمام جمع آوری سرم‌ها در این مطالعه، از نظر پاسخ‌های آنتی بادی مورد بررسی قرار گرفتند.

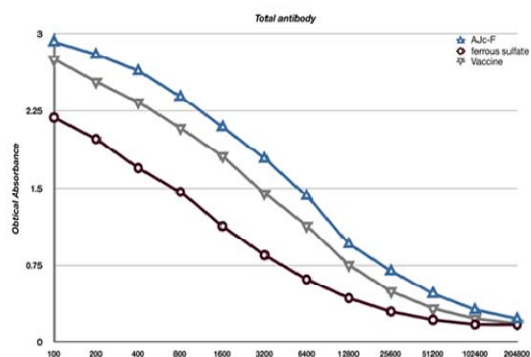
الف) بررسی سطح کلی آنتی بادی اختصاصی ضد HBS Ag:

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن با غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر کوت شد. پلیت‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا آنتی ژن به کف پلیت کوت شود. پلیت‌ها یکبار با بافر شستشو، شستشو داده شدند و سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر بلاک کننده به حفرات ریخته شد و پلیت‌ها برای یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پلیت‌ها یکبار با بافر شستشو، شستشو داده شدند و به خوبی روی کاغذ کوبیده شدند. در مرحله بعد، جهت تهیه سرم‌ها در ۱۲ رقت به نسبت (۲۰۰، ۱۰۰، ۸۰۰، ۴۰۰، ۱۶۰۰، ۳۲۰۰، ۶۴۰۰، ۱۲۸۰۰، ۲۵۶۰۰، ۵۱۲۰۰، ۱۰۲۴۰۰، ۲۰۴۸۰۰) با بافر رقیق کننده رقیق شدند. به حفرات مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده در بافر رقیق کننده، ریخته شد و پلیت‌ها ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پلیت‌ها ۵ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو برای مدت ۳-۵ دقیقه شستشو شدند. سپس Anti mouse HRP conjugate را ۱:۸۰۰۰ در بافر رقیق کننده الیزا، رقیق نموده و ۱۰۰ میکرولیتر در حفرات ریخته شد و پلیت‌ها ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پلیت‌ها ۵ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو برای مدت ۳-۵ دقیقه شستشو شدند. در هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB ریخته شد و پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شدند. برای متوقف نمودن واکنش به حفرات ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال ریخته شد. پلیت‌ها بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شدند.

ب) بررسی سطح آنتی بادی IgG2b, IgG2a, IgG1

(ایزوتایپینگ): مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن با

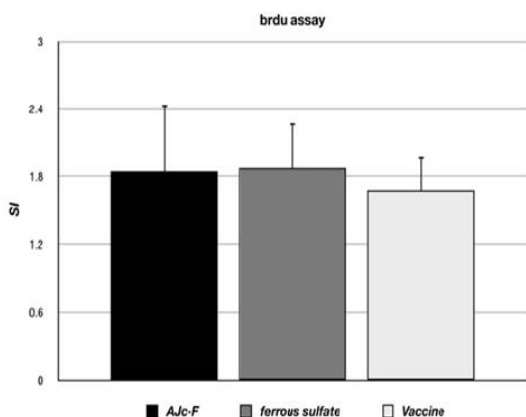
تقویتی بر این بخش مهم از سیستم ایمنی نگذاشت، بلکه آن را تضعیف نمود (شکل ۳).



شکل ۳- اثر نانوکمپلکس AJc-F بر ایمنی هومورال در مقایسه با سولفات آهن و گروه کنترل

اثر نانو کمپلکس‌های کلاته بر تکثیر لنفوسیت‌ها

بررسی اثر نانوکمپلکس AJc-F بر تکثیر سلول‌های طحالی نشان داد که این نانوادجوانت اثر افزایش‌دهنده بر تکثیر لنفوسیتی دارد. سلول‌های طحالی موش‌های تیمار شده با AJc-F ۱۰٪ بیشتر از سلول‌های جدا شده از موش‌های گروه کنترل تکثیر نشان دادند. تیمار با سولفات آهن نیز موجب افزایش ۱۳ درصدی تکثیر شد. البته افزایش پاسخ‌های تکثیری دیده شده در پارامتر BRDU در هیچ یک از تیمارها معنی‌دار نبود (شکل ۴).

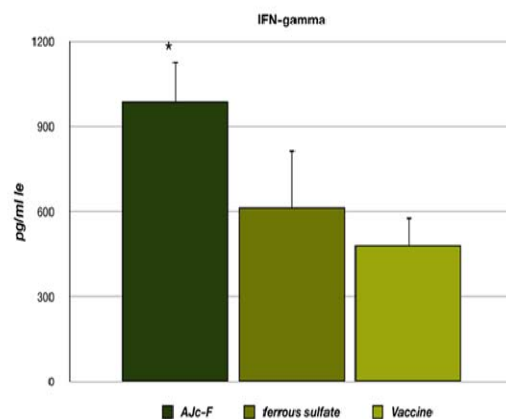


شکل ۴- اثر نانوکمپلکس AJc-F بر تکثیر لنفوسیت‌های جدا شده از طحال در مقایسه با سولفات آهن و گروه کنترل

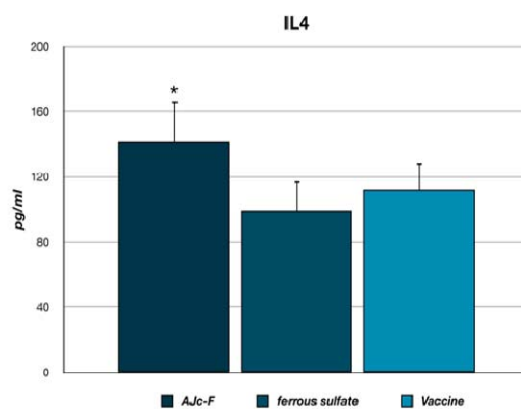
بحث

بررسی‌ها نشان می‌دهد که بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی حدود دو میلیارد نفر در سراسر جهان با ویروس هیپاتیت آلوده‌اند و ۶۰۰ هزار نفر هر ساله در اثر هیپاتیت ب می‌میرند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در ایران نیز

موجب افزایش معنی‌داری معادل ۲۶٪ در اینترلوکین ۴ نسبت به گروه کنترل گردید. سولفات آهن موجب افزایش ۲۷ درصدی در اینترفرون گاما و کاهش ۱۲ درصدی در اینترلوکین ۴ گردید که هیچ یک معنی‌دار نبودند (شکل ۲). در گروه‌های تیمار شده با نانوکمپلکس و یا سولفات آهن نسبت اینترفرون گاما به اینترلوکین ۴ بزرگ‌تر از یک بود.



شکل ۱- اثر نانوکمپلکس AJc-F بر اینترفرون گاما در مقایسه با سولفات آهن و گروه کنترل



شکل ۲- اثر نانوکمپلکس AJc-F بر اینترلوکین ۴ در مقایسه با سولفات آهن و گروه کنترل

اثر AJc-F بر پاسخ آنتی بادی

یافته‌های پژوهش نشان داد که نانوادجوانت AJc-F سطح کلی آنتی‌بادی اختصاصی ضد HBS Ag را به شکل قابل توجهی افزایش داده است. در حالی که در موش‌های تیمار شده با سولفات آهن این پارامتر سرکوب شد و به شدت نسبت به گروه واکسن کاهش نشان داد. بنابراین نانوکمپلکس AJc-F در رفتاری بسیار کارا، ایمنی هومورال را نسبت به گروه واکسن افزایش داد، در حالی که سولفات آهن نه تنها هیچ گونه اثر

تکثیر سلول به اثبات رسیده است، به گونه‌ای که در مطالعات مربوط به سرطان برخی از عوامل شیمی درمانی از طریق اثرگذاری بر متابولیسم این عنصر و حذف دسترسی سلول سرطانی به آهن مانع تکثیر می‌گردند (۱۴).

اینترفرون گاما سایتوکین آنتی ویرالی است که عدم تولید کافی آن در افراد غیر پاسخگو به واکسن هپاتیت و نیز مبتلایان به عفونت این ویروس نیز دیده شده است (۱۵). یافته‌های پژوهشی این مطالعه، رفتار متفاوت نانوکمپلکس AJC-F با سولفات آهن در افزایش اینترفرون گاما را نشان می‌دهد. در حقیقت در شرایطی که سولفات آهن افزایشی معادل ۲۷٪ در این سایتوکین مهم آنتی‌ویرال ایجاد کرد، اما AJC-F، اینترفرون گاما را ۱۰۵٪ نسبت به گروه کنترل افزایش داد. با توجه به اهمیت ارتقای پاسخ ایمنی از نوع TH-1 در پاسخ‌دهی به واکسن هپاتیت ب، افزایش چشمگیر دیده شده در این سایتوکین در کنار اثرات افزایشنده بر ایمنی هومورال بسیار ارزشمند است. در حالی که در شرایط مشابه سولفات آهن علی‌رغم افزایش اینترفرون گاما موجب سرکوب ایمنی هومورال گردیده است. با توجه به عدم میزان موثر آنتی بادی در جمعیت‌های non responder ایجاد چنین پاسخی از این ادجوانت جدید اهمیت بالایی دارد. به خصوص که در رفتاری هوشمند سایر شاخصه‌های مهم ایمنی‌زایی نیز به واسطه آن افزایش یافته است.

افزایش صرف در سایتوکین اینترفرون گاما و نیز پاسخ تکثیری ایجاد شده به واسطه سولفات آهن در مطالعه حاضر نمی‌تواند سولفات آهن را به عنوان ادجوانت مناسبی برای واکسن معرفی کند. چرا که سطح آنتی بادی به عنوان شاخصه مهم پاسخ ایمنی هومورال توسط این ترکیب به شدت در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. علاوه بر این، در بررسی‌های انجام شده روی بیماران دیالیزی مشاهده شده است که تزریق وریدی آهن در قالب مکمل‌های موجود به شدت روی پاسخ‌دهی به واکسن هپاتیت ب اثر منفی می‌گذارد (۱۶).

بر اساس بررسی حاضر، افزایش اینترفرون گاما، اینترلوکین ۴، تکثیر لنفوسیتی و سطح کلی آنتی بادی نتایج به دست آمده از به کار بردن نانوکمپلکس AJC-F در فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب است. با توجه به این مطالعه به نظر می‌رسد نانوادجوانت AJC-F واجد ویژگی‌های لازم برای یک ادجوانت ایده‌آل می‌باشد. ساختار هیدروکربنی این نانوکمپلکس آن را *biodegradable* می‌سازد. از این رو، AJC-F کاندیدای خوبی برای معرفی به عنوان یک ادجوانت جدید جهت بررسی‌های تکمیلی به جهت استفاده در واکسن هپاتیت ب می‌باشد.

میزان عفونت مخفی این بیماری بین ۱/۱۵ تا ۱/۵ درصد متغیر است (۷). این ویروس ۵۰ تا ۱۰۰ بار عفونت‌زاتر از ویروس HIV است (۸). با پیدایش جمعیت افراد غیر پاسخگو در مقابل واکسن هپاتیت ب و نیز نیاز به درمان‌های جدید برای افراد آلوده به این ویروس، ساخت واکسن‌های با فرمولاسیون بهینه‌تر و موثرتر در تحریک پاسخ‌های ایمنی برای کنترل عفونت‌زایی مهلک این ویروس ضروری به نظر می‌رسد. واضح است که واکسن هپاتیت ب محتوی ادجوانت کلاسیک آلوم، قادر است پاسخ‌های آنتی‌بادی را به خوبی تحریک نماید، اما نمی‌تواند الگوی پاسخ‌های Th1 را تحریک نماید. به همین دلیل واکسن‌های محتوی آلوم نه تنها کارایی مناسبی برای پیشگیری قطعی از بیماری هپاتیت ب را ندارند (وجود جمعیت‌های غیر پاسخگو)، بلکه عملاً در افراد آلوده به ویروس فاقد کارایی هستند. بررسی‌های گوناگونی اثرات ساختارهای دارای قابلیت کلات کنندگی را بر سیستم ایمنی مورد بررسی قرار داده‌اند که در مجموع نشان دهنده اثر ادجوانتی و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی توسط ترکیبات دارای ویژگی *chelating* می‌باشد. Doerr و همکارانش اثر یک کلات کننده فلزی با نام EDDS را بر *humancytomegalovirus* مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این کلات کننده به خوبی قادر به تنظیم پاسخ‌های التهابی ضد ویروس است (۹). در تحقیق دیگری که توسط Cinatl و همکارانش انجام گرفت، خواص تعدیل کنندگی سیستم ایمنی به واسطه دو کلات کننده دیگر با نام دسفرال (کلات کننده معروف آهن که در رفع اضافه بار بیماران تالاسمی استفاده می‌شود) و DTPA در محیط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این دو کلات کننده دارای اثرات تنظیمی روی سیستم ایمنی ضد سایتومگالوویروس می‌باشند (۱۰). از سوی دیگر آهن عنصری ضروری برای سلول‌های زنده است و به عنوان یک کوفاکتور در ساختار بسیاری از آنزیم‌ها وجود دارد. این یون در سنتز DNA، تنفس سلولی و انتقال اکسیژن نقش دارد (۱۱). آهن در فرایند مراقبت ایمنی اهمیت محوری دارد، چرا که در رشد سلول‌های ایمنی، القاء پاسخ‌های ایمنی سلولی و فعالیت سایتوکین‌ها نقش مهمی دارد (۱۲، ۱۳). از این رو در بررسی حاضر اثر یک نانوکمپلکس کلاته محتوی آهن را بر بهبود ایمنی زایی واکسن هپاتیت ب مورد ارزیابی قرار دادیم.

نتایج پژوهش نشان می‌دهد که AJC-F به خوبی قادر است پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد. باید توجه داشت نقش انکارناپذیر عنصر آهن در

تشکر و قدردانی

از دپارتمان ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران و همچنین از بخش تحقیقات و توسعه شرکت صدور احرار شرق به دلیل پشتیبانی مادی و معنوی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 2003; 33: 469-78.
2. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 488-96.
3. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 2007; 25: 3752-62.
4. Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* 2002; 20: S56-64.
5. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab* 2007; 51: 301-23.
6. Lukac N, Massanyi P. Effects of trace elements on the immune system. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2007; 56: 3-9.
7. Saki N, Pourfatholah A, Dehghani Fard A, Mousavi S, Kazemi Arababadi M, Kiani Ghaleasrdi O. The challenges of hepatitis B in blood transfusion in Iran. *Sci J Blood Transfus Organ*. 2013; 9: 463-77.
8. Hepatitis B. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.htm>
9. Vogel JU, Michaelis M, Neyts J, Blaheta RA, Snoeck R, Andrei G, et al. Antiviral and immunomodulatory activity of the metal chelator ethylenediaminedisuccinic acid against cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2002; 55: 179-88.
10. Scholz M, Blaheta RA, Henrich D, Cinatl J, Markus BH, Doerr HW, et al. Immunomodulatory properties of the metal chelators desferrioxamine and diethylenetriamine penta-acetic acid in vitro. *Transplantation* 1996; 62: 1371-74.
11. Brock JH, Pippard MJ, Powell LW, eds. Iron metabolism in health and disease. Philadelphia, PA: Saunders Company; 1994. p. 353-91.
12. Seligman PA, Kovar J, Gelfand EW. Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology* 1992; 60: 19-26.
13. de Sousa M. Immune cell functions in iron overload. *Clin Exp Immunol* 1989; 75: 1-6.
14. Chitambar CR, Wereley JP. Effect of hydroxyurea on cellular iron metabolism in human leukemic CCRF-CEM cells: changes in iron uptake and the regulation of transferrin receptor and ferritin gene expression following inhibition of DNA synthesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4361-66.
15. Albarran B, Goncalves L, Salmen S, Borges L, Fields H, Soyano A, et al. Profiles of NK, NKT cell activation and cytokine production following vaccination against hepatitis B. *APMIS* 2005; 113: 526-35.
16. Liu JH, Liu YL, Lin HH, Yang YF, Kuo HL, Lin PW, et al. Intravenous iron attenuates postvaccination anti-HBsAg titres after quadruple hepatitis B vaccination in dialysis patients with erythropoietin therapy. *Int J Clin Pract* 2009; 63: 387-93.