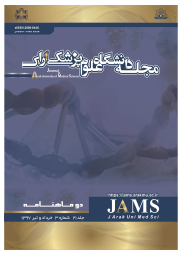
JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره سه، خرداد و تیر ۱۳۹۷

journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

ارتقا ایمنی‌زایی واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان با استفاده از هموکینین-۱

شهلا شاهسوندی[1*]، محمد مجید ابراهیمی[1]، محمدرضا سمیعی[1]

۱. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۱۹

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۳/۰۱

واژگان کلیدی:

آنفلوانزا

نانوذره

هموکینین-۱

***نویسنده مسئول:**

شهلا شاهسوندی

آدرس پستی: ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.

تلفن: +98 912 261 1468

نمابر:

E-mail:s.shahsavandi@rusti.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: برای هدایت پاسخ ایمنی و افزایش پایداری آنتی ژن، واکسن‌های غیر فعال با یاورها ترکیب می‌شوند. در سال‌های اخیر، طراحی یاورهای زیستی و ارزیابی توانایی آن‌ها در افزایش پاسخ ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا مورد توجه بوده است. هموکینین-۱ (HK-1) فعال کننده سلول‌های B و T برای تمایز به سلول‌های پلاسما و تولید آنتی‌بادی است. در این پژوهش اثر HK-1 همراه با واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان بر القای پاسخ ایمنی هومورال علیه آنفلوانزا بررسی شد.

مواد و روش‌ها: نانوذره کیتوزان حاوی آنتی ژن غیر فعال آنفلوانزا و نانوذره کیتوزان حاوی آنتی ژن غیر فعال آنفلوانزا و HK-1 تهیه شدند. پاسخ ایمنی پیامد واکسیناسیون‌های اولیه و یادآور با نانوذرات آنفلوانزا با و بدون این یاور درگروه‌های جوجه SPF بررسی شد. سطوح آنتی بادی اختصاصی علیه آنفلوانزا در نمونه‌های سرم گروه‌های تیمار و شاهد با آزمایش‌های سرولوژی ارزیابی شدند.

یافته‌ها: جوجه های ایمن شده با واکسن نانو ذره آنفلوانزا دارای HK-1 در مقایسه با دو گروهی که آنتی ژن غیر فعال آنفلوانزا و واکسن نانوذره بدون یاور را دریافت کرده بودند، سطوح آنتی بادی اختصاصی بیش‌تر و پایدار در دوره آزمایش داشتند. تفاوت در تعداد نوبت‌های واکسیناسیون اثری بر روی افزایش عیار نداشت.

نتیجه‌گیری: این داده‌ها نشان می‌دهند نانوذره کیتوزان شرایط جذب بهتر، رهایش و پایداری بیش‌تر آنتی‌ژن آنفلوانزا در حضور یاور زیستی HK-1 را فراهم می‌کند.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

پیش‌گیری از بیماری آنفلوانزا در هر یک از جمعیت‌های انسانی و پرندگان با واکسیناسیون امکان‌پذیر است. واکسن‌های دارای مجوز مصرف علیه آنفلوانزا، واکسن‌های غیرفعال تهیه شده از کل پیکره ویروس هستند و تجویز زیر جلدی یا داخل عضلانی آن‌ها سبب بروز پاسخ‌های ایمنی هومورال می‌شود (۱). این پاسخ‌ها با آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده توسط سلول‌های پلاسما ترشح کننده آنتی‌بادی که آخرین مرحله از سیر تکامل لنفوسیت‌های B است، میانجی می‌شوند. پاسخ‌های ایمنی سلولی پس از شناسایی آنتی‌ژن‌های ویروسی عرضه شده با مولکول‌های مجتمع سازگاری بافتی شامل MHCII و MHCIتوسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن APCها (DCها و ماکروفاژها)که به فعال سازی، ازدیاد و تمایز سلول‌های اختصاصی-آنتی‌ژن CD8+ T یا CD4+ منجر می‌شود، آغاز خواهد شد. این سلول‌ها به‌طور مستقیم برای تولید آنتی‌بادی به سلول‌های Th1 و یا Th2 کمک می‌کنند و یا سلول‌های CTL آنتی‌ژن ارایه شده توسط MHCI بر روی APCها را تشخیص می‌دهند (۴-۲). برای تحریک سیستم ایمنی و افزایش القای ایمنی موثر علیه عامل بیماری زا، تسریع در برانگیخته شدن و دوام پاسخ ایمنی، واکسن‌های غیرفعال با یاور ترکیب می‌شوند (۷-۵). جدیدترین گروه یاورهای مورد مطالعه سایتوکاین‌ها شامل اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و پروتئین‌های محرک سامانه ایمنی هستندکه سه نقش عمده شامل تکثیر و تمایز سلول‌های B، تغییر ایزوتیپی و بلوغ تمایل آنتی‌بادی‌ها را در القای پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند و خود یک القاکننده و تنظیم کننده ایمنی سلولی و ایمنی هومورال هستند (۸). بررسی‌های پیشین بیان‌گر این هستند که پروتئین تنظیمی هموکینین-۱ (HK-1) که آخرین عضو شناخته شده خانواده تاچی‌کینین است، سبب تکثیر و تمایز سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی می‌شود (۹). بیش‌تر مطالعات بر نقش آن در تحریک تکثیر سلول‌های B و تولید ایزوتیپ‌های مختلف آنتی‌بادی و تکامل سلول‌های T تاکید دارند (۱۰). این پروتئین قابلیت افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال علیه ویروس آنفلوانزا را دارد (۱۳-۱۱).

مخاط دستگاه تنفسی راه اصلی ورود ویروس آنفلوانزا به بدن میزبان است. بافت‌های لنفوئیدی ویژه ای در موکوس بینی وجود دارد که از مکان‌های اصلی آغاز پاسخ دهی به این عامل بیماری‌زا می‌باشند. بنابراین، استفاده از غشای مخاطی به‌دلیل داشتن سطح وسیع برای رساندن واکسن یا دارو و پاسخ‌دهی سریع اهمیت دو چندان یافته است (۱۴). برای افزایش نفوذ و جلوگیری از تخریب واکسن توسط انواع آنزیم‌های میزبان، از سیستم های دارورسانی نوین مانند نانوذرات زیست تخریب-پذیر (آلژینات و کیتوزان) که دارای توانایی بالایی برای انتقال عوامل درمانی هستند در طراحی نانو واکسن‌ها استفاده شده است. هدف اصلی در طراحی نانوذرات به عنوان سیستم تحویل ویژگی‌های سطحی، رهایش عامل دارویی فعال برای اثرگذاری در محل اختصاصی در محدوده مطلوب درمانی می‌باشد (۱۵، ۱۶). کیتوزان یک پلی‌مر داستیله شده طبیعی پلی کاتیونی از کیتین می‌باشد که از واحدهای N- استیل D-گلوکز آمین وD گلوکز آمین تشکیل شده و از طریق گروه‌های آمین خود در واکنش‌های شیمیایی شرکت می‌کند. این پلی ساکارید با ماهیت بازی قادر است با چربی‌ها، کلسترول، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و یون‌های فلزی پیوند تشکیل دهد. اما مهم‌ترین خصوصیاتی که آن را کاندیدای مناسبی برای صنایع پزشکی و دارویی کرده است، سازگاری زیستی بالا، زیست تخریب پذیری و غیرسمی بودن آن می‌باشد. کیتوزان دارای کاتیون فعال است که به آسانی می‌تواند با پلی‌مرهایی با بار منفی کمپلکس تشکیل دهد. به همین دلیل سیستم‌هایی که بر پایه این بیوپلی‌مر بنا شده‌اند در تحویل و رهایش انواع آنتی ژن‌ها، فاکتورهای رشد و داروها کاربرد دارند. در روند ایمن‌سازی علیه عوامل بیماری زا، رهاسازی طولانی مدت آنتی ژن پاسخ‌های ایمنی بسیار کاراتر را القا می‌کند. کیتوزان به علت تحریک تولید سایتوکاین هم به عنوان یاور و هم به عنوان سامانه‌های تحویل آنتی‌ژن و یاور در نظر گرفته می‌شود (۱۹-۱۷).

در این پژوهش پتانسیل نانوذرات کیتوزان در بهینه‌سازی رهایش آنتی ژن آنفلوانزا و القای پاسخ ایمنی علیه ویروس H9N2 در حضور یاور HK-1 مورد بررسی قرار گرفت.

۲. ملاحظات اخلاقی

موارد اخلاقی نگه‌داری جوجه‌ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به‌هنگام خون‌گیری و واکسیناسیون طبق دستورالعمل استاندارد (۲۲) و طی مجوز موسسه رازی (۹۴۱۱۲) به‌طور کامل رعایت شد.

۳. مواد و روش‌ها

تهیه آنتی ژن ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 در تخم مرغ جنین‌دار

در این مطالعه تجربی، از تلقیح ویروس آنفلوانزا H9N2 جدایه سال ۱۹۹۸ (Acc No. JX456182) (۲۰) در تخم مرغ عاری از عوامل بیماری زا (SPF) جنین‌دار برای تهیه آنتی ژن استفاده شد. با افزودن ۰/۱ درصد حجمی فرمالین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت آنتی ژن ویروس غیرفعال شد. قبل و بعد از فرآیند غیرفعال سازی، عیار ویروس با آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) ارزیابی شد (۲۱).

کلون سازی ژن HK-1 در وکتور pCDNA3.1

طحال پنج جوجه SPF برداشته شده و در محلول نمکی فسفاته استریل (PBS ،pH = ۷/۲) هموژن شد. برای استخراج RNA بافتی از کیت High Pure RNA Isolation ساخت شرکت Roche استفاده شد. کلون سازی ژن HK-1 در وکتور pcDNA3.1 همانند مطالعه پیشین (۱۱) انجام شد.

تهیه واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان حاوی HK-1

محلول کیتوزان با حل کردن ۰/۳۷ گرم از پودر آن (Sigma-Aldrich) در ۸۹/۲۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱ مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه شده و با استفاده از غشا پیش فیلتر تحت خلا (برای حذف ذرات بزرگ) فیلتر شد. مقدار ۱۶۰/۷۸ میلی‌لیتر سدیم استات ۰/۱ مولار به آن اضافه شد. مقدار ۰/۵ درصد حجمی آنتی ژن غیرفعال ویروس آنفلوانزا H9N2 به ۱ درصد حجمی محلول کیتوزان افزوده شده و مخلوط به مدت ده دقیقه به آرامی هم زده شد. توپین ۸۰ (Sigma-Aldrich) در غلظت ۰/۰۱ درصد حجمی به عنوان امولسیون کننده اضافه شد. سپس، سدیم تری پلی فسفات (TPP) به نسبت ۰/۱ درصد (W/V) به طور جداگانه در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و به محلول کیتوزان/آنتی ژن ویروس افزوده شد. مخلوط به آرامی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه هم زده شد تا نانوذرات تشکیل شوند.

در شرایط مشابه، مقدار ۰/۱ درصد حجمی از HK-1 به مخلوط آنتی ژن غیرفعال ویروس آنفلوانزا و کیتوزان افزوده شد تا نانوذرات ویروس آنفلوانزا بر پایه کیتوزان دارای HK-1 تهیه شود. اندازه نانوذرات تولید شده به وسیله دستگاه سایز آنالایزر و میزان پتانسیل زتای نانوذرات به وسیله دستگاه زتاسایزر (Nano-ZS-90, Malvern) اندازه‌گیری گردید. محلول‌های نانوذره تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ماه قرار داده شدند و پایداری آن‌ها در مقایسه با آنتی ژن غیرفعال ویروس H9N2 با عیار سنجی به روش HI ارزیابی شد.

ایمن سازی جوجه‌های مورد مطالعه

تعداد شصت جوجه یک روزه در چهار گروه تیمار به شرح ذیل دسته‌بندی شدند:

گروه A: دریافت یک نوبت واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان؛

گروه B: دریافت نوبت دوم یا دوز یادآور واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان دو هفته پس از واکسیناسیون اولیه؛

گروه D: دریافت نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان حاوی HK-1؛ گروه E: دریافت دوز یادآور واکسن نانوذره آنفلوانزا حاوی HK-1 دو هفته پس از واکسیناسیون اولیه و سه گروه شاهد شامل:گروه C1) بدون دریافت آنتی ژن غیر فعال آنفلوانزا و HK-1، گروه C2) دریافت فقط HK-1 و گروه C3) فقط دریافت آنتی ژن غیر فعال آنفلوانزا.

گروه‌های شاهد نیز نوبت یادآور را دو هفته پس از تجویز اولیه دریافت کردند. واکسن نانوذره آنفلوانزا با و بدون HK-1 به گونه‌ای تهیه شد که هر قطره آن معادل یک دوز باشد.

در روز صفر بر اساس گروه بندی، یک قطره در چشم جوجه‌های گروه‌های شاهد و تیمار چکانده شد.

در روز هفتم و در فواصل معین تا ۷۰ روز، از تعدادی از جوجه‌های هر گروه به طور تصادفی خون گرفته شده و سرم آن‌ها برای بررسی عیار آنتی‌بادی اختصاصی علیه ویروس آنفلوانزا جدا شد. پاسخ ایمنی القا شده با آزمایش‌های HI و الایزا با استفاده از کیت IDEXX AI Ab Test ارزیابی شد. به اختصار از رقت ۱:۱۰۰ سرم‌های رقیق شده در بافر بلوک کننده، به ترتیب در هر دو چاهک متوالی ستون‌های ۱۲-۱ ریخته شد. سرم کنترل منفی در چاهک A1 و A2 و سرم کنترل مثبت در چاهک‌های A3 و A4 ریخته شد و پلیت مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از سه بار شستشو، آنتی بادی کنژوگه به هر چاهک افزوده شده و پلیت مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. چاهک‌ها شسته شده، سپس محلول سوبسترا به هر چاهک اضافه شده و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از افزودن بافر متوقف‌کننده به هر چاهک، جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه خوانش‌گر الایزا ثبت شده و عیار آنتی‌بادی بر مبنای فرمول پیشنهادی شرکت سازنده محاسبه شد.

تحلیل آماری

پردازش آماری با استفاده از آزمون آنووای یک طرفه نرم افزار SPSS نسخه ۱۱ صورت گرفت. بیشینه خطای مورد پذیرش، با در نظر گرفتن ضریب اطمینان ۹۵ درصد، برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۴. یافته‌ها

نتیجه آزمایش الکتروفورز روی ژل آگارز محصول RT-PCR حاصل از تکثیر ژن HK-1 با جفت پرایمر اختصاصی نشان داد که این ژن به طول ۲۳۱bp تکثیر شده است. در کلون‌سازی HK-1 در وکتور pcDNA3.1، پلاسمیدهای حاوی ژن با آزمایش کلنی PCR با جفت پرایمر اختصاصی تایید شدند. اندازه نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان و نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان حاوی HK-1 و میزان پتانسیل زتای آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. افزودن ویروس آنفلوانزا سبب افزایش جزیی در میزان پتانسیل زتای نانوذرات شده است که به دلیل بارهای مثبت گلیکوپروتئین سطحی HA ویروس است. کارایی پوشش دهی نانوذرات تهیه شده بیش از ۹۸ درصد برآورد شد که بیان‌گر پوشش‌دهی موفقیت‌آمیز است. فعالیت HA نانوذرات تهیه شده در مقایسه با آنتی ژن غیرفعال آنفلوانزا طی دوره آزمایش ثابت باقی مانده بود. عیار HA (log2) این ذرات پس از یک ماه نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برابر با ۷ اندازه‌گیری شد، در حالی که عیار آنتی ژن غیرفعال log2 ۳ کاهش یافته بود. در پایان دوره دو ماهه، تغییری در اندازه محلول‌های نانوذره مشاهده نشد، اما آنتی ژن H9N2 فاقد فعالیت HA بود.

جدول ۱. اندازه ذرات و پتانسیل زتای آنتی ژن آنفلوانزا H9N2 و HK-1 بر پایه کیتوزان حاوی HK-1

پتانسیل زتا(میلی ولت)			اندازه ذرات(نانومتر)		
آنتی ژن آنفلوانزا و HK-1 بر پایه کیتوزان	آنتی ژن آنفلوانزا بر پایه کیتوزان	کیتوزان	آنتی ژن آنفلوانزا و HK-1 بر پایه کیتوزان	آنتی ژن آنفلوانزا بر پایه کیتوزان	کیتوزان
۰/۹+۴۸/۱	۰/۹+۴۸/۷	۱/۹+۴۳/۶	۲۲/۷+۳۴۴	۲۲/۶+۳۳۸	۲۲/۹+۲۵۴

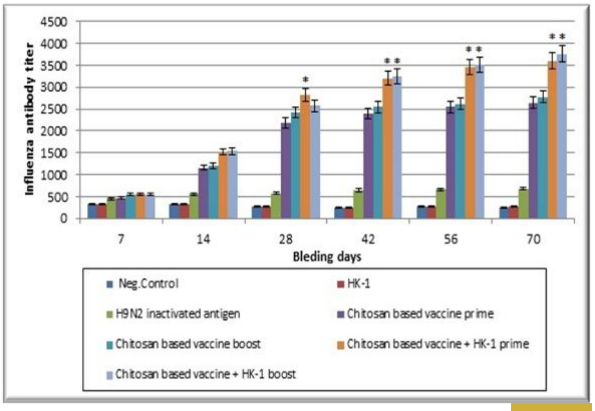
نتایج آزمایش HI پیامد ایمن‌سازی جوجه‌ها با واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان دارای HK-1 به صورت میانگین ± انحراف معیار در جدول ۲ آمده است. جوجه‌های تیمار شده با این واکسن عیار آنتی بادی مناسبی در مقایسه با دیگر گروه‌ها داشتند. در بین گروه‌های تیمار، جوجه‌هایی که دوز یادآور را دریافت کرده بودند، دارای بیشترین عیار آنتی‌بادی در این آزمایش بودند. پس از آن، جوجه‌هایی که یک بار واکسن نانوذره آنفلوانزا دارای HK-1 را دریافت کرده بودند و هم-چنین جوجه‌هایی که دوز یادآور واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان را دریافت کرده بودند دارای عیار مناسبی بودند.

جدول ۲. میانگین عیار آنتی‌بادی اختصاصی (log2) علیه آنفلوانزا H9N2 در نمونه سرم جوجه‌های ایمن شده با واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان با یا بدون HK-1 به روش HI

گروه‌های جوجه	پیش از تجویز	خون‌گیری در روزهای پس از تجویز					
		۷	۱۴	۲۸	۴۲	۵۶	۷۰
بدون دریافت و نانوذره و HK-1 (C1)	۰/۱۹±۰/۷۵	۰/۲۳±۰/۷۱	۰/۱۸±۰/۸۶	۰/۲۱±۰/۷۳	۰/۲۲±۰/۷۷	۰/۲۲±۰/۷۱	۰/۲۵±۰/۹۱
دریافت فقط HK-1 (C2)	۰/۱۸±۰/۷۸	۰/۱۶±۰/۷۷	۰/۲۱±۰/۸۱	۰/۲۲±۱/۰۸	۰/۲۱±۰/۹۳	۰/۲۵±۰/۸۹	۰/۲۴±۱/۰۷
دریافت فقط آنتی ژن غیر فعال آنفلوانزا (C3)	۰/۱۹±۰/۷۴	۰/۳۶±۲/۲۸	۰/۴۱±۳/۲۳	۰/۴۲±۳/۶۹	۰/۴۲±۳/۲۸	۰/۳۹±۳/۳۶	۰/۴۴±۳/۵۲
دریافت یک نوبت نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان (A)	۰/۱۷±۰/۷۴	۰/۳۷±۲/۸۳	۰/۳۹±۳/۵۲	۰/۴۴±۴/۱۹	۰/۴۸±۴/۵۶	۰/۴۹±۴/۳۴	۰/۴۱±۴/۴۷
دریافت دو نوبت نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان (B)	۰/۲۱±۰/۷۶	۰/۲۷±۲/۸۱	۰/۳۹±۳/۵۱	۰/۴۳±۴/۶۱	۰/۳۹±۴/۷۰	۰/۴۱±۴/۶۸	۰/۴۰±۴/۷۶
دریافت یک نوبت نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان و HK-1 (D)	۰/۲۲±۰/۷۲	۰/۲۶±۳/۳۹	۰/۳۸±۴/۷۲	۰/۴۱±۵/۶۴	۰/۴۰±۵/۶۳	۰/۴۳±۵/۶۸	۰/۳۹±۵/۷۱
دریافت دو نوبت نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان و HK-1 (E)	۰/۲۳±۰/۷۷	۰/۲۵±۳/۷۷	۰/۴۲±۴/۸۳	۰/۴۱±۵/۷۱	۰/۳۹±۵/۷۴	۰/۴۳±۵/۸۸	۰/۴۳±۵/۹۰

در ارزیابی پاسخ ایمنی در آزمایش الایزا، نتایج مشابه با آزمایش HI برای جوجه‌هایی که واکسن بدون یاور را دریافت کرده بودند به دست آمد و این گروه نسبت به گروه‌های شاهد میزان بالایی از آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنفلوانزا را داشته‌اند. میانگین عیار آنتی‌بادی در جوجه‌های ایمن شده با واکسن نانوذره آنفلوانزا دارای HK-1 (با یک و دو نوبت تجویز) بیشتر از دیگر گروه‌های تیمار بود و اختلاف بین آن‌ها با گروه‌های شاهد معنی‌دار ($p< ۰/۰۵$) است (نمودار ۱).

در جوجه‌های تیمار شده با واکسن دارای HK-1، یکنواختی در عیار آنتی‌بادی در طول دوره آزمایش وجود داشت. پس از دریافت دوز یادآور، میزان ایمنی‌زایی در گروه شاهد که فقط آنتی ژن غیرفعال را دریافت کرده بود نسبت به گروه‌هایی که نانو واکسن دارای یاور HK-1 را دریافت کرده بودند، کاهش قابل توجهی داشت. تمامی جوجه‌های تیمار شده در نوبت یادآور از میانگین عیار آنتی‌بادی حفاظتی برخوردار بودند که اختلاف معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) با جوجه‌هایی که یک نوبت یادآور را دریافت کرده بودند نداشت. این داده‌ها نشان می‌دهند که واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان دارای HK-1 کارایی مناسب برای افزایش پاسخ‌های ایمنی در یک نوبت واکسیناسیون را دارد.



نمودار ۱. عیار آنتی‌بادی اختصاصی در آزمایش الایزا سرم جوجه‌های ایمن شده با واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان حاوی HK-1. یکنواختی افزایش عیار آنتی‌بادی در طول دوره آزمایش برای گروه‌های تیمار مشاهده شد.

۵. بحث

اغلب واکسن‌های غیر فعال به صورت تزریقی مصرف می‌شوند. از معایب این واکسن‌ها نیاز به فرمولاسیون با یاورهای توان‌مند، میزان کم‌تر تولید آنتی‌بادی و کوتاه‌تر بودن نیمه عمر آن‌ها و نیاز به تزریق‌های یادآور می‌باشد. یاورها مکانیسم‌های مختلفی در برانگیختن پاسخ ایمنی اکتسابی نسبت به آنتی ژن دارند. برخی سبب تحریک آنتی ژن در محل تزریق شده و فعالیت APCها (سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها) را افزایش می‌دهند، برخی با هدف قرار دادن APCها سبب افزایش ترشح آنتی بادی و پاسخ‌های CD8+ شده و روی ایمنی اکتسابی اثر می‌گذارند و برخی دیگر توانایی عرضه آنتی ژن به مولکول‌های MHC را دارند (۲۳). برای جبران کاستی‌های واکسن‌های غیرفعال و افزایش هر چه بیشتر توان ایمنی‌زایی آن‌ها مطالعات گسترده‌ای در مورد

استفاده از پروتئین‌های تنظیم‌کننده سامانه ایمنی در دست انجام است. با استناد به یافته‌های پیشین (۱۳-۱۱)، در این پژوهش از پروتئین تنظیمی HK-1 برای افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال علیه ویروس آنفلوانزا استفاده شد. این پروتئین به عنوان یک کوفاکتور برای سلول‌های B خاطره که دارای CD27+ و B220+ هستند عمل کرده و سبب تکثیر و تمایزآن‌ها و تولید آنتی‌بادی می‌شود. HK-1 فعالیت‌های خود را از چندین مسیر انتقال پیام داخلی مانند تحریک LPS، پیوند متقاطع BCR و افزایش سطح لیگاند CD40 پیش می‌برد. این مسیرها سبب تکثیر و پایداری سلول‌های B می‌شوند (۹، ۱۲، ۲۴). افزایش ترشح IL-21 یکی دیگر از مسیرهای انتقال پیام داخلی HK-1 است که سبب تکثیر لنفوسیت‌های T فولیکولاری می‌شود که ایمنی هومورال را در واکنش علیه آنتی‌ژن فعال می‌کنند (۲۵).

یکی از مهم‌ترین عملکردهای یاورها علاوه بر تسریع در برانگیخته شدن، افزایش و پایداری پاسخ ایمنی، شناسایی آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک وتحویل آن به سلول‌های T است که به فعال سازی، ازدیاد و تمایز سلول‌های اختصاصی آنتی‌ژن CD8+ یا CD4+ منجر می‌شود. این سلول‌ها کارآمدترین سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن برای فعال‌سازی سلول‌های T و آغاز پاسخ‌های ایمنی هستند. یاورها با متمرکز کردن آنتی‌ژن در محل تجمع لنفویست‌ها مدت زمان عرضه آنتی‌ژن به سلول‌های ایمنی را افزایش داده و از کاهش تجزیه آنتی‌ژن جلوگیری می‌کنند و با افزایش تحویل آنتی‌ژن به APCها سبب هدایت آن به سمت MHC و تولید بیش‌تر سایتوکاین‌ها می‌شوند (۳، ۷، ۲۶). بدین ترتیب هر یاوری که جذب آنتی ژن توسط سلول‌های دندریتیک را بیشتر کند و ذخیره پایداری از آنتی ژن برای APCها فراهم نماید، سبب افزایش بیان مولکول‌های محرک ایمنی یا مولکول‌های MHC شده و با افزایش مهاجرت سلولی به سوی گره‌های لنفاوی می‌تواند پاسخ ایمنی را بهبود بخشد (۷، ۸). افزون بر نقش یاور در افزایش پتانسیل القا پاسخ‌های ایمنی، استفاده از مسیر مخاطی برای ایمن سازی دارای مزایایی مانند کاهش تنش به هنگام تزریق، کاهش آثار جانبی در محل تزریق و هزینه کمتر می‌باشد. در تماس با سطوح مخاطی، اغلب آنتی ژن‌ها پاسخ‌های ایمنی ضعیفی القا می‌کنند (۹). بدین ترتیب یکی از عمده ترین چالش‌های موجود در کارایی این نوع واکسن‌ها، شیوه تحویل آنتی ژن واکسن و یا یاور است، به گونه ای که سرعت پاسخ‌دهی ایمنی را هر چه بیشتر تحریک کند. استفاده از نانوذره رویکرد نوینی برای رفع محدودیت‌های ایمن بخشی مخاطی است که با فرآوری آنتی ژن نه فقط سبب بهبود پایداری آن و افزایش ایمنی می‌شود، بلکه روند رهاسازی و تحویل آنتی ژن به سلول هدف را نیز تسهیل می‌کند. زیرا تجویز توام آنتی ژن و یاور ممکن است سبب انتقال آن‌ها به گروه‌های مختلف سلول‌های دندریتیک شـــود. اما کپسوله کردن این دو در یک ذره، امکان تحویـــل هم زمان آن‌ها به یک سلول را فراهم می‌سازد که به القا قوی+CD8های اختصاصی آنتی ژن منجر می‌شود (۲۷). در این پژوهش، نانوذرات با پوشش دهی بسیار بالا تهیه شدند. بنابراین انتظار می‌رود نانوذره کیتوزان وآنتی‌ژن واکسن به تنهایی یا به همراه یاور HK-1 توسط سلول ایمنی بلعیده شوند. این امر به افزایش پردازش آنتی‌ژن و عرضه بیش‌تر آن به APCها منجر می‌شود.

رهایش آنتی ژن بر پایه نانوذره سبب ایجاد طیف گسترده ای از پاسخ‌های ایمنی طی چند مکانیسم شامل نفوذ بهتر آنتی ژن در بافت‌های میزبان و جذب بیشتر توسط APCها، پایدار کردن آنتی ژن، تسهیل تجمع آنتی ژن در سلول‌های گیرنده B و فعال شدن آن‌ها و جلوگیری از فرار آنتی ژن می‌شود (۱۰). نانوذره کیتوزان دارای کاتیون فعال است که به آسانی می‌تواند با پلی‌مرهایی با بار منفی کمپلکس تشکیل دهد و این امر سبب تسهیل اندوسیتوز و نفوذ آنتی ژن می‌شود (۲۸). از طرف دیگر، به عنوان تعدیل کننده پاسخ ایمنی سبب کاهش دوز آنتی ژن موثر مصرفی می‌شود. این خاصیت به جذب، فعال سازی و بلوغ سلول‌های دندریتیک نسبت داده می‌شود (۲۶). از نظر عملکرد، کیتوزان پیش برنده و فزاینده بیان مولکول‌های محرک ایمنی مانند CD40 و

CD86 و نیز تولید انتخابی IFNها و ISGهاست که به بلوغ سلول‌های دندریتیک منجر می‌گردد (۲۸، ۲۹).

۶. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نشان داده شد بهره‌گیری از تکنولوژی ذرات نانو شرایط جذب بهتر، پایداری بیش‌تر و تحویل مناسب آنتی‌ژن آنفلوانزا در حضور یاور زیستی HK-1 را فراهم می‌کند. بیوپلی‌مر کیتوزان به علت تحریک تولید سایتوکاین خواص بالقوه یاوری نیز دارد و سبب افزایش سطح آنتی بادی‌های سرمی در پاسخ به آنتی ژن می‌شود. هرچند که پاسخ ایمنی در گروه‌هایی که نانو واکسن بر پایه کیتوزان را دریافت کرده بودند کم تر از جوجه‌هایی بود که واکسن دارای یاور HK-1 را دریافت نموده بودند. این بدان معنی است که اثرگذاری مطلوب نانو واکسن‌های مخاطی علاوه بر ماهیت نانوذره به حضور یاور نیز بستگی دارد.

۷. تقدیر و تشکر

منابع مالی این پروژه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به شماره ۹۴۱۱۲-۱۸-۱۸-۲ تامین شده است. بدین وسیله از عزیزانی که در انجام این پژوهش صمیمانه همکاری نمودند سپاس گزاری می‌شود.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Lee CW, Suarez D. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. Animal Health research Review. 2005; 6: 1-15.
2. van de Sandt CE, Kreijtz JH, Rimmelzwaan GF. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. Viruses. 2012; 4(9):1438-76.
3. Johnson PA, Conway MA, Daly J, Nicolson C, Robertson J, Mills KH. Plasmid DNA encoding influenza virus haemagglutinin induces Th1 cells and protection against respiratory infection despite its limited ability to generate antibody responses. Journal of General Virology. 2000; 81(7):1737-45.
4. Lupfer C, Thomas PG, Kanneganti T-D. Nucleotide oligomerization and binding domain 2-dependent dendritic cell activation is necessary for innate immunity and optimal CD8+ T cell responses to influenza A virus infection. Journal of Virology. 2014; 88 (16):8946-55.
5. Roth J. Adjuvants in veterinary vaccines: Modes of action to enhance the immune response. Potential adverse effects, Journal of Veterinary International Medicine, 2003; 17:273-281.
6. Lima KM, dos Santos SA, Rodrigues Jr JM, Silva CL. Vaccine adjuvant: it makes the difference. Vaccine. 2004; 22(19):2374-9.
7. Fox CB, Kramer RM, Barnes L, Dowling QM, Vedvick TS. Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants. Ther Adv Vaccines. 2013; 1:7-20.
8. Tovey MG, Lallemand C. Adjuvant activity of cytokines. Methods in Molecular Biology. 2010; 626:287-309.
9. Song H, Yin W, Zeng Q, Jia H, Lin L, Liu X, et al. Hemokinins modulate endothelium function and promote angiogenesis through neurokinin-1 receptor. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2012; 44:1410-21.
10. Khalili I, Ghadimipour R, Sadigh Eteghad S, Fathi Najafi M, Ebrahimi MM, Godsian N, Sefidi Heris Y, Khalili MT. Evaluation of immune response against inactivated avian influenza (H9N2) vaccine, by using chitosan nanoparticles. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015; 8(12): e27035.
11. Sadeghi K, Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Mehravani H, Fazel H. Hemokinin-1 molecular adjuvant: an approach to enhance the efficacy of influenza vaccine. Arak Medical University Journal (AMUJ). 2014; 17: 62-69.
12. Shahsavandi S, Ebrahimi MM; Sadeghi K; Mahravani H. Design of a heterosubtypic epitope-based peptide vaccine fused with hemokinin-1 against influenza viruses. Virologica Sinica. 2015; 30: 1-8.
13. Zhang Y, Paige CJ. T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. Blood. 2003; 102: 2165-72.
14. Rose MA, Zielen S, Baumann U. Mucosal immunity and nasal influenza vaccination. Expert Rev Vaccines. 2012; 11:595-607.
15. Zhao L, Seth A. Nanoparticle Vaccines. Vaccine. 2014; 32:327-337.
16. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. Advanced Drug Delivery Reviews. 2010; 62: 28–41.
17. Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahirou T, Gu W, et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical Applications. Marine Drugs. 2010; 8: 1962-1987.
18. Ghendon Y, Markushin S, Krivtsov G, Akopova I. Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines. Archives of Virology. 2008; 153:831–837.
19. Dehghan A., Shahsavandi S., Jabalameli L. Improvement efficacy of H9N2 influenza nanovaccine in combination with hemokinin-1 molecular adjuvant. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2018; 10 (in press).
20. Shahsavandi S, Salmanian AH, Ghorashi SA, Masoudi S, Ebrahimi MM. Evolutionary characterization of hemagglutinin gene of H9N2 influenza viruses isolated from Asia. Research in Veterinary Science. 2012; 93:234-9.
21. OIE Terrestrial Manual. Avian Influenza (Infections with avian influenza viruses). Chapter 2.3.4. 2005.
22. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8 th ed. National Academies Press. Washington DC. 2010.
23. Singh H. Vaccines adjuvants and delivery systems: mechanism of adjuvants action, Novartis Vaccines, Wiley-Interscience Publication, California. 2007.

24. Wang W, Li Q, Zhang J, Wu H, Yin Y, Ge Q, et al. Hemokinin-1 activates the MAPK pathway and enhances B cell proliferation and antibody production. The Journal of Immunology. 2010; 184:3590-7.
25. Grassin-Delyle S, Buenestado A, Vallat L, Naline E, Marx S, Decocq J, et al. Expression and proliferative effect of hemokinin-1 in human B-cells. Peptides. 2011; 32:1027-34.
26. Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Préat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. Journal Control Release. 2006; 116: 1-27.
27. Riteau N, She A. Chitosan: An adjuvant with an unanticipated STING. Immunity. 2016; 44: 522-4.
28. Borges O, Borchard G, de Sousa A, Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A. Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. International Journal of Pharmacology. 2007; 337:254-264.
29. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. International Journal of Nanomedicine. 2011; 6: 765-74.

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(3)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Promotion the Immunogenicity of Chitosan Nanoparticle-Based Influenza Vaccine Using Hemokinin-1

Shahla Shahsavandi[1*], Mohammad Majid Ebrahimi[1], Mohammad Reza Samiee[1]

1. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:

Received: *25 February 2018*

Accepted: *9 May 2018*

Published online: *22 May 2018*

Keywords:

Hemokinin-1

Influenza

Nanoparticles

**** Corresponding Author:***

Shahla Shahsavandi; Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Tel: *+98 912 261 1468*

Fax:

Email: *s.shahsavandi@rusti.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Aim: The inactivated vaccines are formulated with adjuvant to direct the host immune responses and also increase stability of the antigen. In recent years, the development of biological adjuvants and the evaluation of their ability in elicitation of immune responses against influenza virus have been considered. Hemokinin-1 (HK-1) activates T and B cells for differentiation into plasma cells, and antibody production. In this study, the effect of HK-1 for inducing humoral immune response against influenza chitosan based-nano vaccine was investigated.

Materials and Methods: Chitosan nanoparticle containing inactivated influenza antigen and chitosan nanoparticle containing the inactivated antigen formulated with HK-1 were prepared. Immune response following influenza nanoparticles vaccinations with and without the adjuvant was assessed in SPF chickens after prime and boost immunizations. Specific antibody levels against influenza were evaluated in serum samples of treatment and control groups by serological tests.

Findings: The chickens immunized with the HK-1 adjuvanted nano vaccine produced higher specific antibody titers that were sustained until the end of experiment comparable either with inactivated antigen alone or the H9N2 nanoparticles without HK-1 adjuvant. Administration of boosting had no effect on the enhancing of antibody titer.

Conclusion: The data show that the chitosan nanoparticles provide better absorption conditions and more stability and release of the influenza antigen in the presence of HK-1 biological adjuvant.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: Shahsavandi S., Ebrahimi MM., Samiee MR. Promotion the Immunogenicity of Chitosan Nanoparticle-Based Influenza Vaccine Using Hemokinin-1. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(3): 65-74.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).