بررسی اثر ICI118,551 (آنتاگونیست بتاآدرنوسپتور)و آلوم به عنوان ادجوانت به منظور افزایش اثر محافظت بخش واکسیناسیون برعلیه سالمونلا تیفی موریوم

سمیه حسنی[۱]، نیما حسینی جزنی*[۲]، شهرام شهابی[۳]، سیداحمد کرامتی[٤]

تاریخ دریافت 1392/06/03 تاریخ پذیرش 1392/08/06

چکیده

پیش زمینه و هدف: سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی است که در موش، علائم حصبه در انسان را تقلید می‌کند. مطالعه بر روی طراحی یک واکسن برای پیشگیری از عفونت‌های این باکتری، می‌تواند راه‌گشای طراحی یک واکسن موفق جهت پیشگیری و کنترل تیفوئید در انسان باشد.در این مطالعه کارایی مخلوط آلوم وICI118,551 به عنوان ادجوانت در القاء پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار نسبت به جسم سلولی کشته شده سالمونلا تیفی موریوم (HKST)، به عنوان واکسن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: موش‌های بالب سی نر به پنج گروه تقسیم شدند. موش‌ها در گروه‌های تحت آزمایش واکسن سالمونلا تیفی موریوم کشته شده با حرارت را به تنهایی یا در همراهی با ادجوانت آلوم، ICI و یا در همراهی با هردو آدجوانت دریافت نمودند. موش‌های گروه کنترل منفی تنها بافر فسفات سالین دریافت کردند. کلیه موش‌ها دوبار در روزهای صفر و ۱۴ ایمن شدند، دو هفته پس از آخرین مصون سازی پاسخ‌های ایمنی نسبت به سالمونلا تیفی موریوم مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: تجویز مخلوط آلوم-ICI به عنوان آدجوانت توانایی واکسن HKST را پس از تجویز دوزهای تحت کشنده از باکتری‌ها در کاهش تعداد کلنی‌ها پس از کشت کبد و طحال افزایش می‌دهد، باعث افزایش میزان تولید آنتی‌بادی‌های IgG وIgG2a و میزان بقاء پس از مواجه با دوز کشنده باکتری‌ها در مدل موشی می‌شود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که ICI به عنوان مهار کننده انتخابی بتا دو آدرنوسپتر باعث تشدید پاسخ‌های ایمنی سلولی و آلوم به عنوان آدجوانت ایمنی هومورال باعث تشدید پاسخ‌های ایمنی هومورال در همراهی با واکسن کشته شده سالمونلا تیفی موریوم در مل موش می‌شود.

کلید واژه‌ها: سالمونلا تیفی موریوم، واکسیناسیون، ادجوانت، ICI118,551، آلوم، موش

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره یازدهم، ص ۸۶۱-۸۵۱، بهمن ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۶۴۲۳۴

Email: n_jazani@yahoo.com

مقدمه

سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی است که در جنس سالمونلا و خانواده انتروباکتریاسه قرارمی گیرد، این باکتری عامل ایجاد کننده عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای در انسان، دام‌ها و پرندگان است. در افراد سالم عفونت‌های ناشی از سالمونلا تیفی موریوم اغلب به شکل عفونت‌های روده‌ای با علائمی از قبیل اسهال یا اسهال هموراژیک روی می‌دهد(۱). علائم بیماری ناشی از این باکتری در مدل موش، علائم بیماری حصبه در انسان را تقلید می‌کند(۲). بنابراین مطالعه بر روی طراحی یک واکسن مؤثر برای پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری در مدل موش، می‌تواند راه‌گشای طراحی یک واکسن موفق جهت پیشگیری و کنترل بیماری تیفوئید در انسان باشد. هدف از واکسیناسیون ایجاد پاسخ‌های ایمنی مؤثر جهت ایجاد محافظت برای دوره‌های طولانی مدت است.

[۱] کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات مرکزی، واحد اراک

[۲] دانشیار میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی (نویسنده مسئول)

[۳] دانشیار ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی و ژنتیک

[٤] کارشناس ارشدانگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

در ایجاد ایمنی محافظت بخش برعلیه سالمونلا تیفی موریوم تحریک هر دو جزء سیستم ایمنی اختصاصی، هومورال و سلولار ضروری است(۵-۳). بر خلاف واکسن‌های زنده ضعیف شده، واکسن‌هایی که حاوی جسم سلولی باکتری کشته شده می‌باشند، سطح بالایی از ایمنی محافظت بخش را ایجاد ننموده و جهت کارایی بیشتر نیازمند همراهی در تجویز با ادجوانت‌ها هستند(۷،۶). ادجوانت‌ها ترکیباتی هستند که باعث تحریک بهتر سیستم ایمنی جهت ایجاد پاسخ‌های مؤثرتر در برابر آنتی‌ژنی می‌شوند که در همراهی با آن تجویز می‌شوند. ادجوانت‌ها به طور عمده به منظور افزایش ایمنی زایی آنتی ژن‌های همراه، کاهش تجویز در مقدار آنتی‌ژن، کاهش تعداد دوزهای یادآور، افزایش کارایی سیستم ایمنی در نوزادان و افراد مبتلا به نقص ایمنی ونیز به عنوان سیستمی جهت تحویل آنتی ژن‌ها به سلول‌های مخاطی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۹،۸).

مکانیسم کلاسیک ادجوانت اثر ذخیره ایی آن است که در آن ادجوانت آنتی ژن را از رقیق شدگی و تخریب و حذف سریع توسط میزبان حفظ می‌کند.

ادجوانت آلوم تنها ادجوانتی است که توسط اداره کل غذا و داروی آمریکا اجازه استفاده در همراهی با واکسن‌های انسانی را دارد. متأسفانه ادجوانت آلوم در ایجاد پاسخ‌های ایمنی به عنوان ادجوانت ضعیفی عمل می‌کند و تنها قادر به تقویت پاسخ‌های ایمنی هومورال است(۱۰). در حال حاضر تنها تعداد معدودی از ادجوانت‌ها برای تحریک ایمنی سلولار در دسترس می‌باشند. سیستم عصبی دارای ارتباط تنگاتنگی با سیستم ایمنی است و محیطی که توسط واسطه‌گرهای عصبی فراهم می‌شود نقش مهمی در جهت گیری پاسخ‌های ایمنی به سمت پاسخ‌های ایمنی سلولی (تی هلپر ۱)یا هومورال (تی هلپر ۲) دارد. در این میان می‌توان به نقش سیستم عصبی سمپاتیک اشاره کرد. مطالعات متعددی نشان داده است که تحریک سیستم عصبی سمپاتیک (به خصوص تحریک بتا آدرنورسپتورها) باعث کاهش شدت پاسخ‌های ایمنی و شیفت پاسخ‌ها به سمتی هلپر ۲ یا به عبارت دیگر راه اندازی پاسخ‌های ایمنی هومورال می‌شود. هم چنین نشان داده شده است که مهار نمودن بتا آدرنورسپتورها باعث تشدید پاسخ‌های ایمنی و شیفت آن‌ها به سمت تی هلپر ۱ یا راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شود. نوراپی نفرین واپی نفرین باعث مهار تولید سیتوکین‌های پیش برنده التهاب مانند اینترلوکین ۲، فاکتورنکروزتوموری آلفا واینترفرن گاما توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن و سلول‌های تی هلپر ۱ می‌شوند و بدین ترتیب در حقیقت پاسخ‌های تی هلپر ۱ را مهارمی کنند. درحالی که تولید سیتوکین‌های ضدالتهابی مانند اینترلوکین ۱۰ و فاکتور رشد توموری بتارا تحریک می‌کنند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کاتکول آمین‌های آندوژن باعث سرکوب انتخابی پاسخ‌های تی هلپر ۱ و ایمنی سلولی و شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمتی هلپر ۲ می‌شوند. قبلاً کارایی پروپرانولول به عنوان مهار کننده بتا آدرنورسپتورها، در همراهی با واکسن کشته شده سالمونلا تیفی موریوم وآلوم در شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمتی هلپر۱ و القاء تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار نشان داده شده است(۱۱).

اگرچه ماده شیمیایی آی سی آی ۵۵۱،۱۱۸ که یکی از مهار کننده‌های بتا دوآدرنورسپتر ها است در انسان قابل تجویز است (۱۲)، ولی تاکنون هیچ‌گونه استفاده درمانی در انسان برای آن شناخته نشده است. ولی از آی سی آی به طور گسترده در مطالعات پژوهشی برای درک عملکرد گیرنده بتا دوآدرنرژیک در مدل آزمایشگاهی استفاده شده است و به عنوان یکی از آنتاگونیست‌های خاص این گیرنده شناخته شده است(۱۴،۱۳).

آی سی آی مهار کننده انتخابی بتا ۲ آدرنوسپتر بوده ولذا با مهارنمودن بتا آدرنورسپتورها باعث تشدید پاسخ‌های ایمنی و شیفت آن‌ها به سمتی هلپر ۱ می‌شود (۱۶،۱۵). لذا این احتمال وجود دارد که تجویز آی سی آی به عنوان یک ادجوانت همراه با یک واکسن بتواند با شیفت پاسخ ایمنی به سمتی هلپر ۱ باعث تشدید ایمنی زایی ناشی از واکسن شود. بنابراین دراین مطالعه برای اولین بار در دنیا نقش تجویز مخلوط آلوم همراه با آی سی آی به عنوان یک ادجوانت در افزایش کارایی واکسن کشته شده سالمونلا تیفی موریوم در موش بالب سی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی و تأیید سویه و تهیه توده سلولی:

سویه مورد استفاده تحت عنوان سالمونلا تیفی موریوم PTCC1735 به صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و با انجام آزمایش‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت. پس از کشت سویه مورد نظر بر روی محیط تی اس آ (Merck)[5] و گرمخانه گذاری در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول شب، باکتری‌ها از سطح محیط کشت با استفاده از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (PH=7) جمع‌آوری و در G × ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و توده سلولی جداسازی شد. پس از سه بار شستشو با بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، نمونه به مدت دو ساعت در بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جسم سلولی کشته

1 Tryptic Soy Agar

شده باکتری به دست آمد. کنترل مرگ باکتری‌ها با کشت نمونه بر روی محیط کشت تی اس آ انجام شد(۱۱).

ایمنی زایی در موش‌ها:

موش‌های بالب سی نر ۸-۶ هفته‌ای از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی دانشگاه ارومیّه خریداری شده و به پنج گروه تحت آزمایش (شامل گروه کنترل، گروه واکسن، گروه آلوم+ واکسن، گروه آی سی آی+ واکسن، گروه آلوم + آی سی آی+ واکسن) که هر کدام حاوی پنج موش بودند، تقسیم شدند. به منظور ایمنی زایی تزریق دوبار در روزهای صفر و ۱۴ (۱۷)، به طریق زیر جلدی (۱۸) از ناحیه گردن مطابق با جدول یک انجام شد. مقدار دوز تجویز شده آی سی آی، mg/kg ۲ در موش‌های تحت آزمایش بود.

جدول شماره (۱): روش ایمنی زایی در موش‌ها

	حجم بافر فسفات سالین (PBS)	حجم واکسن تزریقی	حجم آلوم تزریقی	حجم ICI118,551 تزریقی
گروه کنترل	۱۵۰ میکرولیتر	-	-	-
گروه واکسن	۱۰۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر (۱۰میکروگرم)	-	-
گروه آلوم+ واکسن	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر (۱۰میکروگرم)	۵۰ میکرولیتر	-
گروه ICI118,551	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر (۱۰میکروگرم)	-	۵۰ میکرولیتر
گروه واکسن+ آلوم+ ICI118,551	-	۵۰ میکرولیتر (۱۰میکروگرم)	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر

کشت میکروبی کبد و طحال:

موش‌های آزمایشگاهی در پنج گروه پنج تایی گروه بندی شدند، تزریق دو بار در روزهای صفر و۱۴ صورت گرفت، دو هفته بعد از آخرین تزریق یعنی در روز بیست و یکم موش‌ها با دوز تحت کشنده (۱.۵×۱۰^{۳}) واحد تشکیل دهنده کلنی از سالمونلا تیفی موریوم به صورت داخل صفاقی مورد تزریق قرار گرفتند (۱۹). پس از ۴۸ ساعت موش‌ها به روش قطع نخاعی کشته شدند و در الکل ۷۰ درصد استریل شدند و به دنبال آن کبد و طحال موش‌ها استخراج شد. پس از یک نواخت نمودن نمونه کبد و طحال در محلول تریتون X-100(۰/۰۵ درصد)(Applichem) به طور جداگانه، ۱۰ میکرولیتر از نمونه در محیط کشتتی اس آ کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌های هر پلیت شمارش و ثبت شد (۲۰).

اندازه گیری میزان IgG و زیر کلاس‌های آن:

موش‌های آزمایشگاهی نر در پنج گروه پنج تایی مطابق با جدول یک مورد تزریق قرار گرفتند. موش‌ها دو هفته بعد از آخرین ایمنی‌زایی، با استفاده از کلروفرم بی‌هوش شده و خون‌گیری به عمل آمد. جداسازی سرم در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰ rpm انجام شد و جهت تعیین میزان آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی کل،IgG1 و IgG2a اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت، به طور خلاصه برای انجام الایزا، آنتی ژن در بافر کربنات- بیکربنات حل شد و به چاهک‌های میکروپلیت مورد استفاده اضافه شد، پس از انکوباسیون به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت ها با استفاده از محلول پی بی اس- توین شستشو داده شدند وآلبومین سرم گاوی ۵درصد به منظور مهار جایگاه‌های اتصال مورد استفاده قرار گرفت. پس از انکوباسیون وشستشوی مجدد، سرم موردآزمایش با رقت یک چهار صدم وحجم ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شده و پس از انکوباسیون و شستشو از پراکسیداز آنتی‌آنتی‌بادی کنژوگه وسوبسترای مربوطه به منظور ایجاد رنگ استفاده شد. نهایتاً شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر قرائت شد(۱۱).

روش انجام آزمایش محافظت حیوان ایمن در برابر دوز عفونی باکتری بیماری‌زا:

گروه‌های تحت آزمایش و کنترل شامل پنج گروه هر یک حاوی هفت موش طراحی شدند و طبق جدول یک مورد تزریق قرار گرفتند. دوهفته پس از آخرین تزریق موش‌های هرگروه با 10^7عدد باکتری سالمونلا تیفی موریوم زنده مورد تزریق قرار گرفتند و میزان مرگ و میر تا سه هفته بررسی و ثبت شد(۲۰).

روش‌های آماری:

برای مقایسه‌ی میانگین نتایج بدست آمده از بررسی‌های مختلف ایمونولوژیکی حیوان ایمن شده با مخلوط آلوم+ آی سی آی+ جسم سلولی کشته شده سالمونلا تیفی موریوم باسایر گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها از آزمون مقایسه چندگانه Tukey استفاده شد. مبنای معنی‌دار بودن اختلافات $P<0/05$ می‌باشد.

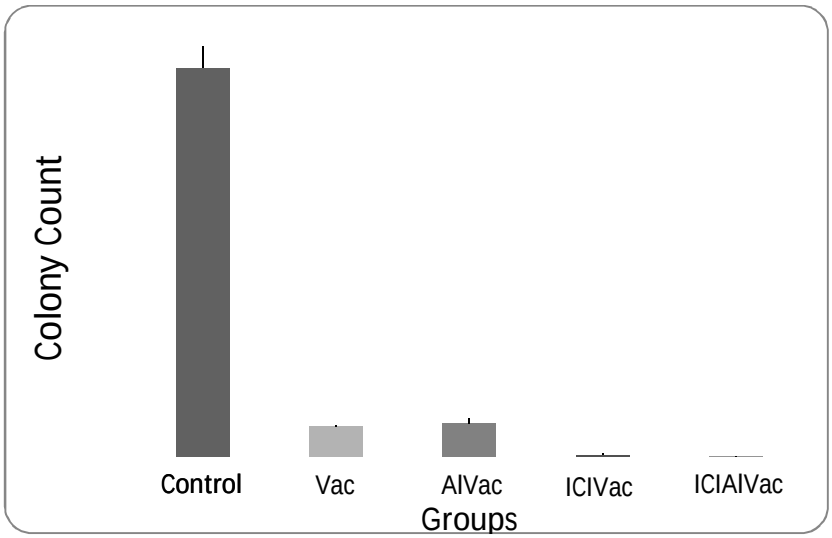
یافته‌ها

شناسائی و تأیید سویه:

سویه مورد استفاده تحت عنوان سالمونلا تیفی موریوم PTCC1735 به صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آزمایشات بیوشیمیایی حاکی از توانایی سویه مزبور در تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، مانیتول و دولسیتول، تولید گاز H2s، متحرک بودن، ام آر(+) ، سیترات (+)، واجد آنزیم‌های آرژنین دهیدرولاز، لیزین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربوکسیلازبود، اما فاقد قدرت تخمیر قندهای لاکتوز و ساکارز، عدم تولید آنزیم اوره آز، عدم تولید اندول، عدم توانایی استفاده از مالونات بود. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایشات بیوشیمیایی سویه تهیه شده به عنوان سویه سالمونلا تیفی موریوم تایید شد.

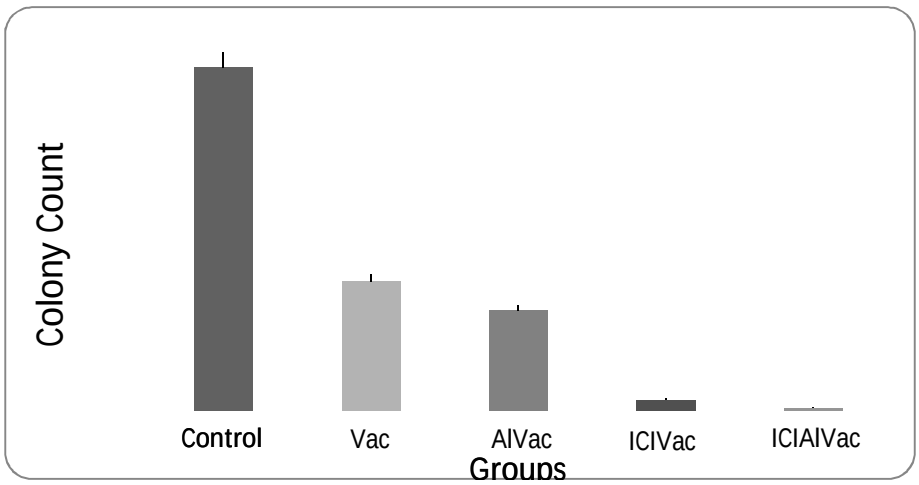
نتایج کشت میکروبی کبد و طحال:

نتایج کشت طحال: هم چنانکه در نمودار یک مشاهده می‌شود به ترتیب در گروه‌های آلوم+ آی سی آی+ واکسن و به دنبال آن آی سی آی+ واکسن کمترین تعداد کلنی پس از کشت نمونه‌های طحال در محیط کشت جامد مشاهده شد. در گروه کنترل حداکثر تعداد کلنی پس از کشت نمونه طحال بر روی محیط کشت جامد مشاهده شد. در گروه واکسن و آلوم- واکسن نیز اگرچه تعداد کلنی‌ها نسبت به گروه‌های آلوم+ آی سی آی + واکسن و آی سی آی+ واکسن بیشتر بود ولی در مقایسه با گروه کنترل به شدت کاهش یافته بود.



نمودار شماره (۱): تعداد کلنی‌های حاصل از کشت طحال در گروه‌های مختلف تحت آزمایش

نتایج کشت کبد: هم چنان که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود به ترتیب در گروه‌های آلوم+ آی سی آی+ واکسن) و به دنبال آن آی سی آی + واکسن کمترین تعداد کلنی پس از کشت نمونه‌های کبد در محیط کشت جامد مشاهده شد. در گروه کنترل حداکثر تعداد کلنی پس از کشت نمونه کبد بر روی محیط کشت جامد مشاهده شد). در گروه واکسن وآلوم- واکسن نیز اگرچه تعداد کلنی‌ها نسبت به گروه‌های آلوم+ آی سی آی+ واکسن و آی سی آی+ واکسن بیشتر بود ولی در مقایسه باگروه کنترل به شدت کاهش یافته بود.

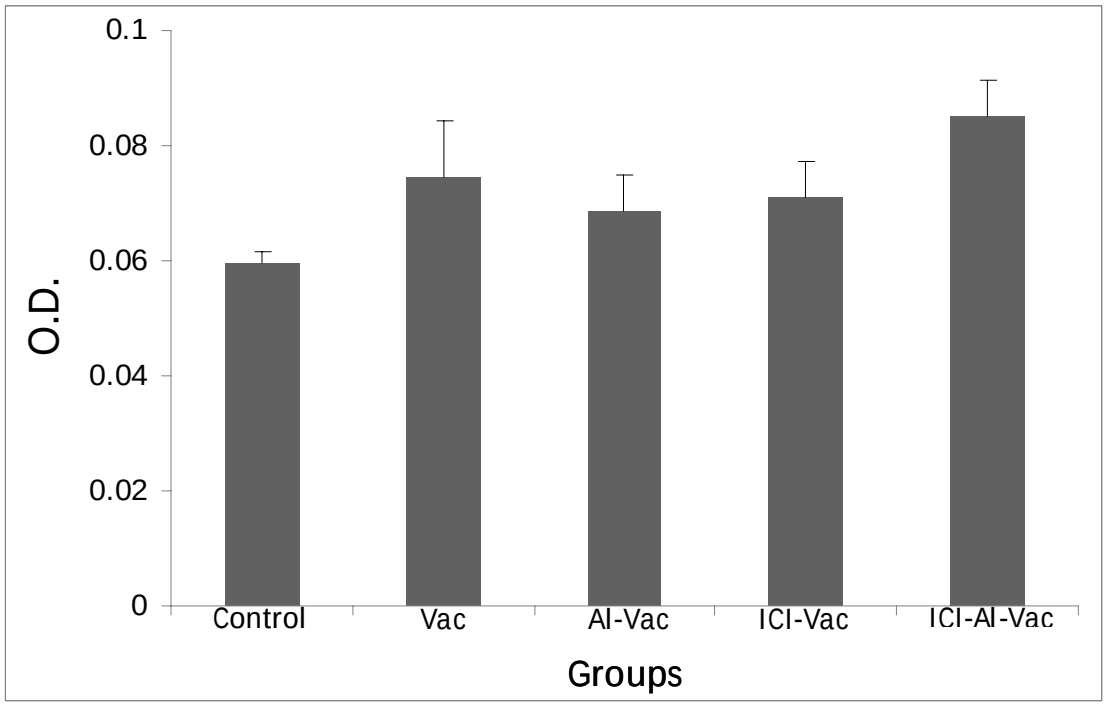


نمودار شماره (۲): تعداد کلنی‌های حاصل از کشت کبد گروه‌های مختلف تحت آزمایش

اندازه گیری میزان IgG و زیر کلاس‌های آن:

اندازه گیری ایمنوگلوبولین جی اختصاصی کلی:

دو هفته بعد از آخرین ایمنی زایی، سرم موش‌های ایمن شده از جهت وجود میزان آنتی‌بادی‌های توتال ایمنوگلوبولین جی ضد سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گرفت. در نمودار سه نتایج مقایسه میزان تولید ایمنوگلوبولین توتال جی در گروه‌های مختلف تحت آزمایش نشان داده شده است. حداکثر میزان تولید ایمنوگلوبولین جی اختصاصی کلی در گروه آلوم + آی سی آی + واکسن در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده می‌شود.

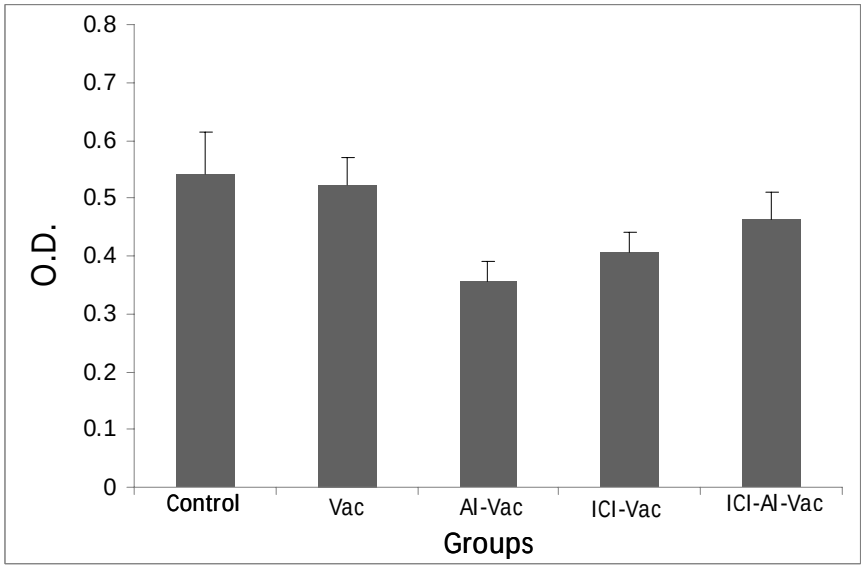


نمودار شماره (۳): مقایسه میزان آنتی‌بادی‌های ایمنوگلوبولین جی اختصاصی کلی تولید شده بر علیه سالمونلا تیفی موریوم.

هم چنان که مشاهده می‌شود مقدار تولید ایمنوگلوبولین جی توتال در گروه واکسن+آی سی آی+ آلوم در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر بوده ولی با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری ندارد.

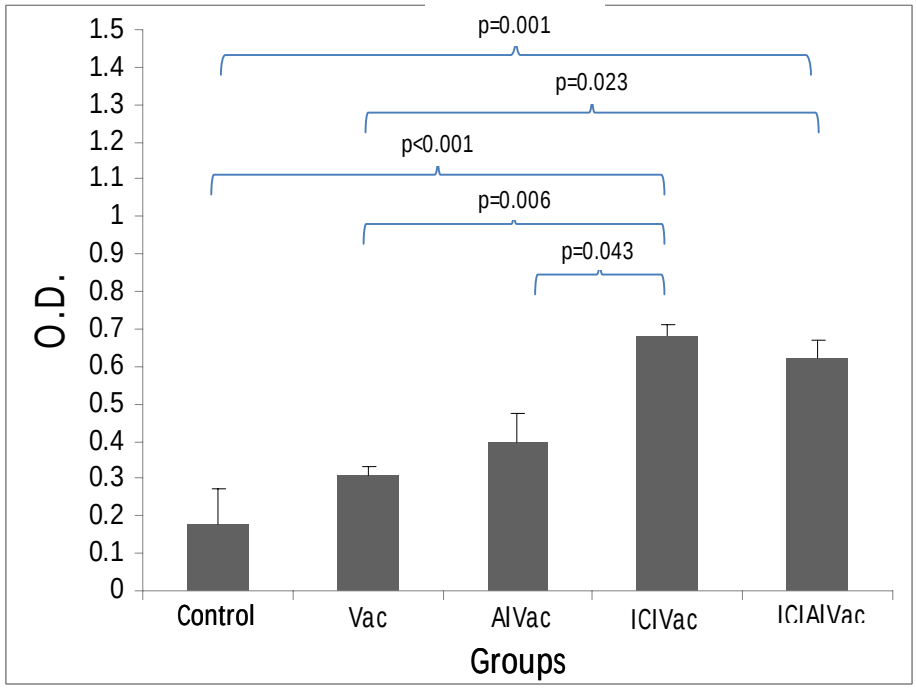
اندازه‌گیری مقدار ایزوتیپ‌های مختلف ایمنوگلوبولین جی:

تولید ایزوتیپ‌های مختلف ایمنوگلوبولین جی مرتبط با حضور سیتوکین‌های ویژه‌ای است که توسط سلول‌های تی اختصاصی تولید می‌شوند. میزان تولید IgG2a و IgG1 و نسبت IgG2a به IgG1 در هر گروه به ترتیب در نمودارهای۴ و۵ و۶ نشان داده شده است.



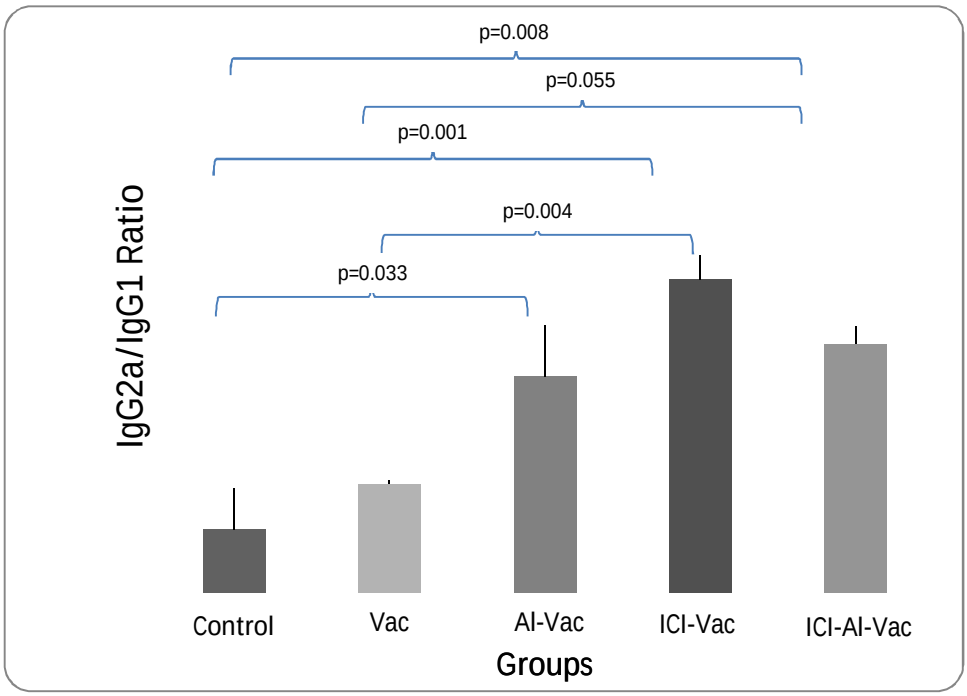
نمودار شماره (۴): مقایسه میزان تولید IgG1 در گروه‌های مختلف تحت آزمایش

هم چنانکه مشاهده می‌شود، مقدار IgG1 در هیچ یک از گروه‌های تحت مطالعه تفاوت معنی‌داری با گروه‌های دیگر ندارد.



نمودار شماره (۵): مقایسه میزان تولید IgG2a در گروه‌های مختلف تحت آزمایش

هم چنانکه مشاهده می‌شود، مقدار IgG2a در گروه آی سی آی +آلوم + واکسن با گروه کنترل (p=0.001) و واکسن (p=0.023) تفاوت معنی‌داری دارد. مقدار IgG2a در گروه آی سی آی + واکسن با گروه‌های آلوم + واکسن، واکسن (p=0.043) و کنترل (p<0.001) تفاوت معنی‌دار دارد، مقدار IgG2a در گروه آلوم+ واکسن با گروه‌های واکسن و کنترل تفاوت معنی‌دار ندارد. مقدار تولید IgG2a در گروه‌های آلوم+ واکسن+ آی سی آی با واکسن+ آی سی آی تفاوت معنی‌دار ندارد.

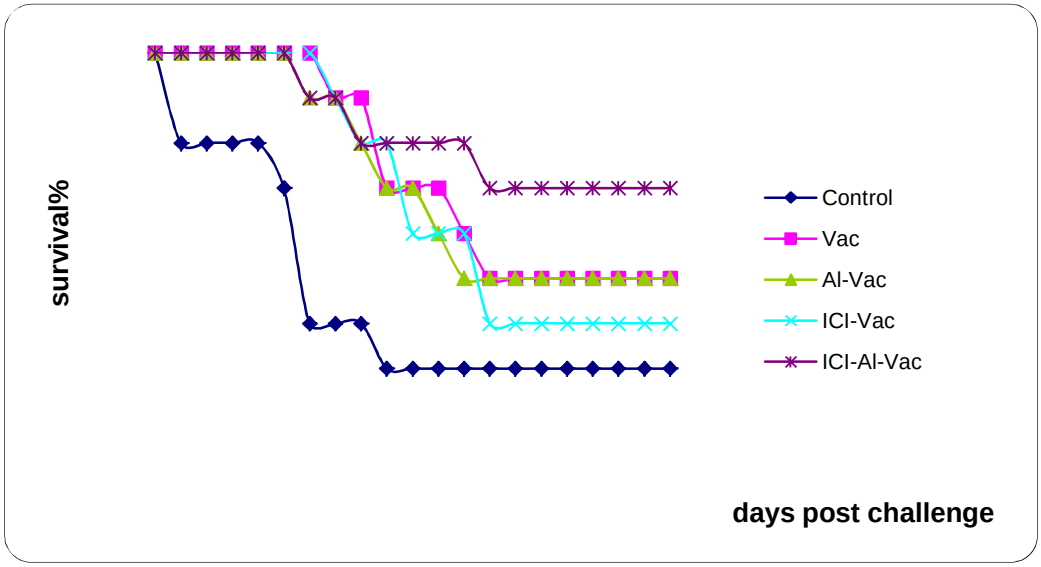


نمودار شماره (۶): مقایسه نسبت غلظت IgG2a به IgG1 در گروه‌های مختلف تحت آزمایش.

نتایج محاسبه نسبت IgG2a به IgG1 (نمودار ۶) نشان می‌دهد که این نسبت در گروه‌هایی که همراه با واکسن، ادجوانت آلوم، آی سی آی یا مخلوط آی سی آی وآلوم دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر است(به ترتیب p=0.033، p=0.004، p=0.008). همچنین در حالی که تفاوت این نسبت در موش‌های گروهی که همراه با واکسن، آلوم دریافت کرده‌اند با موش‌های گروهی که تنها واکسن دریافت کرده‌اند، معنی‌دار نمی‌باشد؛ این نسبت در موش‌های گروهی که همراه با واکسن،آی سی آی دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های گروهی است که تنها واکسن دریافت کرده‌اند (p=0.004). به علاوه تجویز مخلوط آلوم و آی سی آی باعث افزایش تقریباً معنی‌دار (p=0.055) است. نسبت IgG2a به IgG1 در گروه‌هایی که همراه با واکسن، آی سی آی یا مخلوط آلوم و آی سی آی دریافت کرده‌اند بیشتر از موش‌های گروهی است که همراه با واکسن، آلوم دریافت کرده‌اند، اگرچه این تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد. نتایج فوق نشان دهنده این است که تجویز ادجوانت آی سی آی باعث شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمتی هلپر ۱ می‌شود.

نتایج آزمایش محافظت حیوان ایمن در برابر دوز عفونی باکتری بیماری زا:

دو هفته بعد از آخرین ایمنی زایی، موش‌های بالب سی توسط 10^7 عدد از باکتری سالمونلا تیفی موریوم زنده مورد مواجهه قرار گرفتند و میزان مرگ و میر به مدت سه هفته پی گیری و ثبت شد. میزان بقاء موش‌ها در موش‌های گروه آلوم + آی سی آی + واکسن به طور معنی‌داری بالاتر از موش‌هایی بود که واکسن را به تنهایی و یا مخلوط آن را با آلوم دریافت نموده‌اند. میزان بقا در موش‌های گروه آلوم + آی سی آی + واکسن به طور معنی‌داری بالاتر از موش‌های گروه کنترل بود(نمودار ۷).



نمودار شماره (۷): مقایسه میزان بقا در پنج گروه مورد آزمایش

هم چنانکه مشاهده می‌شود در طی ۲۱ روز پیگیری پس از مواجه گروه‌های مختلف تحت آزمایش با دوز کشنده باکتری، میزان بقاء در موش‌های گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه‌ها پس از مواجه با دوز کشنده باکتری کمتر از بقیه و میزان بقاء در موش‌های گروه واکسینه شده با آلوم+آی سی آی + واکسن در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشترین بوده است.

بحث و نتیجه گیری

سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی درون سلولی اختیاری است که در جنس سالمونلا و خانواده انتروباکتریاسه قرار می‌گیرد. این باکتری قادر به ایجاد اشکال متنوعی از عفونت‌ها در انسان و حیوانات می‌باشد. مکانیسم‌های ایمنی اختصاصی که در دفاع در برابر عفونت‌های ناشی از این باکتری نقش دارند به دو دسته هومورال و سلولار تقسیم می‌شوند و از آنجایی که این باکتری در داخل بدن در داخل سلول‌های سیستم رتیکولواندوتلیال رشد و تکثیر می‌نماید لذا پاسخ‌های سیستم ایمنی سلولار نقش مهمّی در کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری به عهده دارند (۲۱).

واکسن‌های تهیه شده از جسم سلولی باکتری‌های کشته شده در القاء پاسخ‌های ایمنی محافظت بخش قابل توجه و پایدار چندان موفق نیستند ولی تجویز این نوع آنتی ژن‌ها در همراهی با ادجوانت‌ها می‌تواند باعث تحریک بیشتر سیستم ایمنی در پاسخ دهی به این آنتی ژن‌ها گردد.

تجویز واکسن تهیه شده از باکتری‌های کشته شده سالمونلا تیفی موریوم در همراهی با آدجوانت آلوم باعث تشدید پاسخ ایمنی هومورال نسبت به آنتی ژن همراه می‌گردد، به هر حال در ایجاد پاسخ ایمنی محافظت بخش در برابر سالمونلا تیفی موریوم تحریک هردو جزء سیستم ایمنی اختصاصی اعم از هومورال و سلولار ضروری می‌باشد(۵،۴).

مشخص شده است که آی سی آی یک بتا بلوکر برخوردار از فعالیت آنتا گونیستی برای بتا دو آدرنورسپتور است که برای این گیرنده در مقایسه با گیرنده‌های بتا یک و بتا سه بیش از ۵۰۰ برابر انتخابی عمل می‌کند(۲۲).

بنابراین آی سی آی مهار کننده انتخابی بتا دو آدرنوسپتور بوده و لذا با مهار نمودن بتا آدرنوسپتورها باعث تشدید پاسخ‌های ایمنی و شیفت آن‌ها به سمت تی هلپر ۱ و تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولار می‌شود(۲۳).

در سال ۲۰۱۱ حسینی جزنی و همکاران نقش تجویز یکی از آنتاگونیست‌های گیرنده‌های اپیوئیدی (نالوکسان) را به عنوان ادجوانت احتمالی همراه با ادجوانت آلوم در کنار پروتئین‌های آنتی ژنی سالمونلا تیفی موریوم بر پاسخ سیستم ایمنی به واکسیناسیون به عنوان الگویی برای طراحی یک واکسن موفق که با تحریک هر دو بازوی ایمنی هومورال و سلولی قادر به پیشگیری از عفونت‌های ناشی از سالمونلا تیفی موریوم باشد، مورد بررسی قرار دادند، نتایج به دست آمده توسط این محققین نشان داد که تزریق نالوکسان به عنوان یک ادجوانت همراه با ادجوانت آلوم باعث ایجاد ایمنی هومورال و سلولار در موش آزمایشگاهی بالب سی می‌شود، از آنجایی که نالوکسان جنبه مصرفی در مورد انسان را دارد، می‌تواند به عنوان ادجوانت مناسبی جهت ایجاد پاسخ‌های ایمنی تی هلپر ۱ بر علیه این میکروارگانیسم مورد استفاده قرار گیرد، از طرفی تحقیقات این موضوع را به اثبات رسانیده است که آلوم باعث

شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمتتی هلپر ۲ می‌شود، بنابراین با استفاده از دو ادجوانت می‌توان به طور همزمان پاسخ‌های ایمنی سلولار و هومورال را در بدن برانگیخت(۲۴).

در سال ۲۰۱۲ مظلومی و همکاران اثرات تجویز هم زمان آلوم و پروپرانولول را در همراهی با واکسن کشته شده سالمونلا تیفی موریوم به منظور بررسی نقش این ترکیبات در القاء ایمنی هومورال وسلولار نسبت به این واکسن باکتریایی بررسی نمودند و نشان دادند که تجویز پروپرانولول به عنوان مهار کننده بتا آدرنورسپتورها باعث القاء تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال وسلولار در برابر این واکسن می‌شود و الگوی پاسخ‌های ایمنی را به سمتتی هلپر ۱ شیفت می‌دهد(۱۱). بنابراین نتایج به دست آمده توسط این محققین در توافق با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر است.

بنابراین مطالعه پیش روی نشان داد که تزریق آی سی آی به عنوان یک ادجوانت همراه با ادجوانت آلوم و جسم سلولی کشته شده باکتری باعث تشدید تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار در موش آزمایشگاهی بالب سی می‌شود. بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی نتایج منتشر شده، می‌توان ادعا نمود که این مطالعه برای اولین بار در دنیا صورت گرفته است، لذا انجام مطالعات تکمیلی جهت تأیید نتایج این پژوهش الزامی است.

References:

1. Badawi R, Nageh T, Walker D, Wray R. Nontyphoidal Salmonella Pericarditis: a case of Salmonella typhimurium phage type 2 pericarditis. Int. J. Cardiol 2002; 82 (2): 187-9.
2. Groisman EA, Ochman H. How Salmonella became a phatogen. Trends Microbiol 1997; 5: 343-9.
3. Ramarathinam L, Niesel DW, Klimpel GR. Salmonella typhimurium induces INF-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. J.Immunol 1993; 150(9): 3973-81.
4. Mittrucker HW, Ravpach B, Kohler A, Kaufmann SH. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection. J. Immunol 2000; 164(4): 1648-52.
5. Wijburg, OL, Simmons CP, van Rooijen N, Strugnell RA. Dual role for macrophages in vivo in pathogenesis and control of murine Salmonella enterica var. Typhimurium infections. Eur. J. Immunol 2000; 30:944-53.
6. Misfeldt ML, Johnson W. Variability of Protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from Salmonella typhimurium. Infect. Immun 1976; 14(3):652-9.
7. Petrovasky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol. Cell. Biol 2004; 82(5):488-96.
8. Schijns VE. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. Vaccine 2003; 21(9-10): 829-31.
9. Stills HF. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freunds Complete and Other Adjuvants. ILAR J2005; 46(3) 250-93.
10. Allison AC, Byars NE. Immuonological adjuvants: desirable properties and side-effects. Mol. Immunol 1991; 28(3):279-84.
11. Mazloomi E, Jazani NH, Shahabi S. A novel adjuvant, mixture of alum and the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol, elicits both humoral and cellular immune responses for heat-killed Salmonella typhimurium vaccine. Vaccine 2012; 30(16): 2640-6.
12. Tyrer P, Marsden C, Ferguson B, Murphy S, Hannon S, Greenwood D. Clinical and humoral effects of beta-blockade with ICI 118,551 in the general neurotic syndrome. J Psychopharmacol 1991; 5(3):238-42.
13. Pietri-Rouxel F, Drumare MF, Stroberg AD. Pharmacological characteristics of β adrenergic receptor. In: Ruffolo RRJr. Editor. Adrenoceptors: Structure, Function. and Pharmacology. 1nd ed.

Luxembourg: Harwood Academic Publisher; 1995.P. 229-37.

14. Ramos BP, Arnsten AF. Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. Pharmacology & Therapeutics 2007; 113(3): 523–36.
15. Hillman KL, Doze VA, Porter JE. Functional characterization of the beta-adrenergic receptor subtypes expressed by CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus. J Pharmacol Exp Ther 2005;314(2):561–7.
16. Summerhill S, Stroud T, Nagendra R, Perros-Huguet C, Trevethick M. A cell-based assay to assess the persistence of action of agonists acting at recombinant human beta(2) adrenoceptors. J Pharmacol Toxicol Methods 2008;58(3):189–97.
17. Moayeri N, Collins CM, Ohanely P. Efficacy of a Proteus mirablitis outer membrane protein vaccine in preventing experimental Proteus pyelonephritis in a BALB/c mouse model. Infect.Immune 1991; 59(10):3778-86.
18. Zhao Z, Xue Y, Wu B, Tang X, Hu R, Xu Y, et al. Subcutaneous vaccination with attenuated Salmonella enterica serovar Choleraesuis C500 expressing recombinant filamentous hemagglutinin and pertactin antigens protects mice against fatal infections with both S. enterica serovar Choleraesuis and Bordetella bronchiseptica. Infect Immun 2008;76(5):2157–63.
19. Noto Llana M, Sarnacki SH, Giacomodonato MN, Caccuri RL, Blanco GA, Cerquetti MC. Sublethal infection with Salmonella enteritidis by the natural route induces intestinal and joint inflammation in mice. Microbes Infect 2009; 11(1):74-82.
20. Jazani NH, Karimzad M, Mazloomi E, Sohrabpour M, Hassan ZM, Ghasemnejad H, et al. Evalution of the adjuvant activity of naloxane., an opioid receptor antagonist, in combination with heat-killed Listeria monocytogenes vaccine. Microb Infect 2010; 12(5):382-8.
21. Hof H, Emmerling P, Hacker J, Hughes C. The role of macrophages in primary and secondary infection of mice with Salmonella typhimurium.Ann.Immunol 1982; 133(1): 21-32.
22. Wenzel D, Knies R, Matthey M, Klein AM, Welschoff J, Stolle V, Sasse P, Röll W, Breuer J, Fleischmann BK. beta(2)-adrenoceptor antagonist ICI 118,551 decreases pulmonary vascular tone in mice via a G(i/o) protein/nitric oxide-coupled pathway. Hypertension 2009; 54(1):157-63.
23. Crestani CC, Alves FH, Resstel LB, Corrêa FM. Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline micro injected into the bed nucleus of the stria terminal of rats. Br J Pharmacol. 2008;153(3):583-90.
24. Jazani NH, Parsania S, Sohrabpour M, Mazloomi E, Karimzad M, Shahabi S. Naloxone and alum synergistically augment adjuvant activities of each other in a mouse vaccine model of Salmonella typhimurium infection. Immunobiology 2011; 216(6):744-51.

Original Article

EVALUATION OF THE EFFECT OF ICI118, 551, A BETA ADRENO-RECEPTOR ANTAGONIST ,AND ALLUM , AS ADJUVANTS FOR INCREASING THE PROTECTION OF VACCINATION AGAINST *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

***Somayeh Hasani*[6], *Nima Hosseini Jazani* *[7], *Shahram Shahabi*[8], *Seyed Ahmad Karamati*[9]**

Received: 25 Aug , 2013; Accepted: 28 Oct , 2013

Abstract

***Background & Aims*:** In this study the efficacy of the mixture of ICI118,551 and alum, as an adjuvant, in the induction of humoral and cellular immunity response to heat-killed *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) (HKST) as a model vaccine was investigated.

***Materials and Methods*:** BALB/c mice were divided into five groups. Mice in the experimental groups received either the HKST vaccine alone or in combination with the adjuvant alum, ICI or the alum-ICI mixture. Mice in the negative control group received phosphate-buffered saline. All mice were immunized twice on days 0 and 14. Two weeks after the last immunization, immune responses to *S. typhimurium* were assessed.

***Results*:** Administration of the alum-ICI mixture as an adjuvant increased the ability of the HKST vaccine after administration of sub-lethal doses of bacteria in reduction of the colony count after liver and spleen cultures, increased *S. typhimurium* specific IgG and IgG2a and the survival rate after challenge with lethal doses of bacteria in the mouse model.

***Conclusion*:** Administration of the alum-ICI mixture in combination with the HKST vaccine enhanced humoral and cellular immunity in a mouse model.

***Keywords*:** *S. typhimurium*, Vaccination, Adjuvant, ICI 118,551, Alum, Mouse

Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran ***Tel***: +989143464234
E-mail: n_jazani@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014: 24(11): 861 ISSN: 1027-3727

[6] *M.Sc of Microbiology, Islamic Azad University, Arak Central Research Science Unit, Arak, Iran*
[7] *Associate professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[8] *Associate Professor of Immunology, Department of Immunology and Genetics, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[9] *M.Sc of Parasitology, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*