مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره هفت، مهر ۱۳۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۱

فرمولاسیون آنتی ژن HBs در ادجوانت MF59 و مقایسه ایمنی زایی آن با واکسن تجاری هپاتیت B

ریحانه میرزایی[۱]، فهیمه نعمتی منصور[۲]، مهدی مهدوی[*۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: هپاتیت B بیماری سیستمیک است که موجب التهاب کبد می شود. راه مقابله با این عفونت، واکسیناسیون است. واکسن متداول برای مقابله، واکسن فرموله شده با Alum می‌باشد. این واکسن قادر به ایجاد پاسخ و مصونیت کامل در برخی افراد نیست. در این مطالعه پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال واکسن تجاری هپاتیت B با واکسن HBs فرموله شده با ادجوانت MF59 مقایسه شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های Balb/c در سه دوره، فرمولاسیون‌های مختلف واکسن را به صورت زیر پوستی و با فاصله دو هفته دریافت نمودند. سپس از موش‌ها خون گیری به عمل آمد و سطح آنتی‌بادی ضد HBs Ag با روش الایزا بررسی شد. سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4 و IL-2 و نسبت IFN-γ/ IL-4 با روش الایزا از سوپ روئی کشت سلول های طحال بررسی شد. داده‌های خام با استفاده از نرم افزار Graph pad prism و آنالیز آماری با آزمون آماری ANOVA انجام شد.

نتایج: میزان IL-4 به طور معناداری در واکسن با آلوم بیشتر از واکسن فرموله شده با MF59 بوده هم چنین میزان سایتوکاین IFN-Y اختلاف معناداری را بین دو گروه اصلی نشان نداد. سایتوکاین TNF-α در واکسن با آلوم نسبت به واکسن با MF59 بیشتر ترشح شده است. آنتی‌بادی توتال پس از تزریق سوم در بعضی رقت‌ها در واکسن تجاری نسبت به واکسن با MF59 افزایش بیشتری داشت.

نتیجه‌گیری: کاهش معنادار IL-4 و آنتی بادی ها نشان می‌دهد که تمایل واکسن فرموله شده با MF59 برای القای پاسخ ایمنی سلولی نسبت به هومورال بیشتربوده به علاوه ایمن بودن و کمبود عوارض جانبی ادجوانت MF59 را نیز می‌توان مزیتی دیگر به شمار آورد.

واژه‌های کلیدی:: ادجوانت آلوم، ادجوانت MF59، واکسن هپاتیتB

ارجاع: میرزایی ریحانه، نعمتی منصور فهیمه، مهدوی مهدی. **فرمولاسیون آنتی ژن HBs در ادجوانت MF59 و مقایسه ایمنی زایی آن با واکسن تجاری هپاتیت B**.مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶(۷): ۶۴-۵۵۳

۱-گروه بیوتکنولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم، ایران
۲-گروه بیوتکنولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم، ایران
۳-بخش ایمنی شناسی، انیستیتو پاستور ایران،تهران، ایران- بخش ایمونولوژی انیستیتو پاستور تهران،ایران
*(نویسنده مسئول)؛تلفن: ۰۹۱۲۶۸۵۰۲۶۹ ، پست الکترونیکی: mahdavivac@gmail.com,کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

مقدمه

ویروس هپاتیت B عامل بیماری هپاتیت سرمی در انسان است. این ویروس از خانواده هپادناویریده با ژنوم DNA دو رشته ای نسبی به قطر ۴۲ نانومتر و دارای دو پوشش خارجی است که در کبد همانند سازی می کند و موجب نارسائی کبدی می‌شود. پوشش خارجی ویروس از لیپید و آنتی‌ژن سطحی (HBsAg)، تشکیل یافته است. هپاتیت ویروسی یک بیماری سیستمتیک است که عمدتاً کبد را درگیر کرده موجب التهاب کبد، تب، تهوع، استفراغ و در نهایت یرقان می‌شود (۱).

سالانه حدود ده هزار نفر در کشور به این ویروس مبتلا شده و هپاتیت B یکی از اصلی‌ترین بیماری های کبدی در ایران به شمار می رود (۲). واکسیناسیون را باید یکی از موفقیت آمیزترین روش‌های پزشکی در مبارزه با بیماری‌های عفونی دانست. جای هیچ تردیدی نیست که استراتژی واکسن بسیار مقرون به صرفه‌تر از استراتژی درمان می‌باشد و هزینه‌ای که واکسیناسیون برای هر بیماری دارد به مراتب کمتر از هزینه درمانی با داروهای موثر می‌باشد، بنابراین استراتژی واکسن را باید بهترین راهکار برای مقابله با عفونت‌های میکروبی از جمله هپاتیت دانست. امروزه جهت پیش گیری از عفونت هپاتیت B، از واکسن بر پایه پروتیین نوترکیب هپاتیت استفاده می‌شود که در ادجوانت هیدروکسید آلوم فرموله شده است. واکسن هایی که امروزه برای پیش گیری از عفونت HBV مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل پروتئینS و پروتئین pre-S2 (پروتئینM) می‌باشند. پاسخ مناسب برعلیه HBs Ag به شدت وابسته به همکاری سلول های‌T می‌باشد و برای ایجاد پاسخ ایمنی مطلوب برهم کنش سلول های T کمکی با لنفوسیت های B ضروری است. درمدل‌های موشی ثابت شده که بسیاری از هاپلوتیپ‌های MHC- II، برای عرضه HBsAg سازگار نیستند به عبارتی HBsAg دارای ساختار مناسبی برای این هاپلوتیپ‌ها نبوده و MHCها قابلیت اتصال به شاخص‌های آنتی‌ژنیک ویژه سلول‌های‌T و عرضه آن را نخواهند داشت (۳،۴). تزریق واکسن بدون استفاده از ادجوانت کارایی لازم را نخواهد داشت.

ادجوانت‌ها موادی هستند که ایمونوژنیسیته ایمونوژن‌ها را افزایش می‌دهند (۵). ادجوانت‌ها در ابتدای دهه ۱۹۲۰ معرفی شدند و تا به امروز تعداد و عملکردهای معرفی شده آنها بسیار گسترش یافته است. ادجوانت آلوم پراستفاده‌ترین ادجوانت تاریخ می‌باشد که قادر است پاسخ های ایمنی هومورال قدرتمندی ایجاد نماید اما توان تحریک ایمنی سلولی را نداشته و هم چنین با عوارضی چون تب و لرز و بیماری های مرتبط با اعصاب مرتبط است. هم چنین واکسن تجاری هپاتیت در درصدی از دریافت کنندگان واکسن هپاتیت B از کارایی لازم برخوردار نیست. از این رو به نظر می رسد تغییر فرمولاسیون واکسن هپاتیت B شاید کارایی واکسن را در این دسته از افراد افزایش دهد. ادجوانت MF59 یک ادجوانت روغن در آب می باشد. اجزای تشکیل‌دهنده این ادجوانت عبارتند از اسکوآلن، و سورفکتانت که شامل Tween80 و Span85 است.ادجوانت MF59 اولین بار در سال ۱۹۹۷ در واکسن آنفلونزای فصلی استفاده شد؛ این ادجوانت ایمنی‌زایی را در نوجوانان و افراد مسن به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد (۶).

ادجوانت MF59 در فرمولاسیون واکسن‌هایی از قبیل H1N1 در سال ۲۰۰۹ استفاده شده است (۷). عملکرد این ادجوانت به گونه ای است که با افزایش و تحریک هرچه بیشتر ایمنی ذاتی باعث افزایش ایمنی هومورال و سلولی می شود (۸). هنگامی که ادجوانت MF59 در واکسن آنفلونزا بر بدن تزریق می‌شود، ماکروفاژها در محل آسیب دیده سریعاً ترشح شده و مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها که از جمله آن ها می توان نوتروفیل‌ها را نام برد به محل تزریق فراخوانی شده و انواع سایتوکاین‌ها از جمله IL-2 می شود که در واقع این سایتوکاین از لنفوسیت T فعال تولید می شود و باعث پیشبرد لنفوسیت ها از فاز G1 چرخه رشد سلولی به فاز S می شود و بر روی سایر سلول‌ها از جمله سلول های B، T و سلول های کشنده طبیعی اثر کرده و آن ها را نیز فعال می کند. فراخوانی گرانولوسیت‌ها در این ادجوانت برخلاف ادجوانت آلوم باعث ترشح کموکاین هایی از جمله CCL2، CCL3، CCL4 می‌شود (۹). از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

جمله مزیت‌های دیگر ادجوانتMF59 نسبت به سایر ادجوانت های روغنی و از جمله آلوم می‌توان به پاسخ دهی سریع یا Fast protection و هم چنین دپو نکردن آنتی ژن در محل تزریق نام برد (۱۰). در مطالعه حاضر ادجوانت MF59 در فرمولاسیون واکسن هپاتیت B استفاده شده و سپس توان ایمنی‌زایی این واکسن با واکسن تجاری مقایسه می گردد. اعتقاد ما بر این است که فرمولاسیون جدید توان ایمنی‌زایی بیشتری داشته باشد و پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی قدرتمندتری ایجاد نماید.

روش بررسی

فرمولاسیون واکسن

این مطالعه از نوع مطالعه تجربی است. واکسن تجاری و پروتیین نوترکیب HBsAg از آن از تولیدات سال ۱۳۹۵ از انستیتو پاستور کرج تهیه گردید که در این مطالعه تجربی استفاده شد. ادجوانت MF59 یک ادجوانت امولسیونی روغن در آب (Oil in Water) O/W بوده که با نسبت ۵۰:۵۰ با پروتئین HBsAg نوترکیب مخلوط می شود. جهت فرمولاسیون واکسن، ادجوانت MF59 به پروتئین نوترکیب HBsAg در اتاق Clean اضافه شد و به مدت ۴ تا ۵ دقیقه فرمولاسیون را روی ورتکس قرار داده شد تا کاملاً مخلوط گردد.

آماده سازی موش های آزمایشگاهی

تعداد ۵۵ سر موش BALB/c ماده Inbred از انستیتو پاستور خریداری شد. سن این موش‌ها ۸-۶ هفته بوده با وزن تقریبی ۲۰ گرم و در بخش اتاق حیوانات انستیتو پاستور دردمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دارای تهویه مناسب نگهداری شدند و جهت کار نمودن با حیوان آزمایشگاهی و کشتن موش‌ها از روش‌هایی استفاده می‌گردد که حداقل استرس به حیوان وارد شود.

گروه بندی و تزریق واکسن به گروه های موشی

جهت واکسیناسیون، با توجه به تعداد موش و این که حجم تزریق هر موش ۱۰۰ میکرولیتر با دوز ۵ میکروگرم بود. دوز واکسن در تمامی گروه‌هایی که HBs Ag راگرفتند ۵ میکروگرم بوده است و تزریقات ۳ بار و با فاصله ۲ هفته به صورت زیرپوستی صورت گرفت. ۱۱ روز پس از آخرین تزریق آزمایشات بررسی پاسخ‌های ایمنی در گروه‌های تجربی انجام شد .

بررسی پاسخ های سایتوکاینی

جهت بررسی پاسخ‌های سایتوکاینی، ابتدا موش‌ها نخاعی شده سپس با الکل ۷۰٪ استریل و به زیر هود منتقل شد. در شرایط استریل طحال موش‌ها از پهلوی چپ خارج شد و به صورت سوسپانسیون درآمد. در مراحل بعد با استفاده از بافر لیز، گلبول‌های قرمز حذف شده و در نهایت درصد سلول‌های زنده تعیین شد. سلول‌ها درمحیط کشت RPMI-1640 (Gibco, Germany) کامل با تراکم ۴×۱۰^{۶} در میلی لیتر تنظیم شده و سپس در پلیت ۲۴ خانه‌ای (Nunc, Denmark) کشت داده و آنتی ژن به غلظت ۵µg/ml اضافه گردید و بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO2، مایع رویی چاهک‌ها پس از سانتریفیوژ در دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، جمع‌آوری و جهت سنجش سایتوکاین ها استفاده گردید.

بررسی سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4 وIL-2به روش الایزا

جهت بررسی غلظت سایتوکاین‌ها از کیت الایزاکمی تجاریIFN-γ و IL-4 و IL-2 موشی (Mabtech, Sweden) استفاده شد. جهت انجام الایزا از پروتوکل استاندارد موجود در کیت استفاده شد، هم چنین از استانداردهای هر یک از سایتوکاین‌ها برای سنجش کمی استفاده شد. نتایج سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4 وIL-2 بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر ارائه شد و هم چنین نسبت IL-4 /IFN-γ هر موش از تقسیم نمودن مقادیر کمی IFN-γ هر موش به IL-4 همان موش به‌دست آمد.

بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال

ده روز پس از تزریق آخر از همه موش ها خون گیری به وسیله پیپت پاستور و از گوشه چشم موش‌ها انجام شد. سپس سرم نمونه‌های خون با انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت یک ساعت و سپس سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰به مدت ۱۵ دقیقه تهیه و در دمای ۲۰- درجه تا زمان آزمایش نگه‌داری شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

جهت سنجش آنتی بادی IgG توتال اختصاصی، در ابتدا آنتی ژن HBs در غلظت 5µg/ml در بافر PBS تهیه شد و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های پلیت الایزای ۹۶ خانه‌ای (Greiner Germany) اضافه و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه انکوبه شد. سپس با بافر شستشو (PBS حاوی۰/۰۵٪ Tween 20) شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه با بافر بلاک‌کننده (PBS حاوی۲٪ شیر خشک فاقد چربی و ۰/۰۵٪Tween 20) انکوبه شد. پس از شستشوی مجدد، به چاهک‌های مورد نظر ۱۰۰ میکرولیتر (بعد از تزریق اول و دوم از رقت ۱/۲۵ تا رقت ۱/۵۱۲۰۰ و بعد از تزریق سوم از رقت۱۰۰ /۱ تارقت ۱/۸۳۸۸۶۰۸۰۰) از سرم‌های رقیق شده اضافه گردید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. چاهک‌ها ۵ بار شستشو داده شدند و به آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی متصل به HRP اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. چاهک‌ها ۵ بار دیگر شستشو داده شدند و به آنها ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB(تکسا طب) در تاریکی اضافه شد و ۳۰ دقیقه انکوبه شد. واکنش با اسیدسولفوریک ۲ نرمال متوقف و شدت جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط الیزاریدر قرائت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

از تمامی داده‌های دوتائی مربوط به هر آزمایش میانگین به دست آورده شد و سپس از میانگین‌های به دست آمده در آنالیز آماری استفاده گردید. آنالیز آماری با آزمون آماری ANOVA و با استفاده از نرم افزار Graph pad prism انجام شد، حدود اطمینان ۹۵٪ و عدد P<۰/۰۵ به مفهوم معنی‌داری بوده است.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه .علوم پزشکی تهران- دانشکده داروسازی وعلوم دارویی.تائید شده است (کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1397.215).

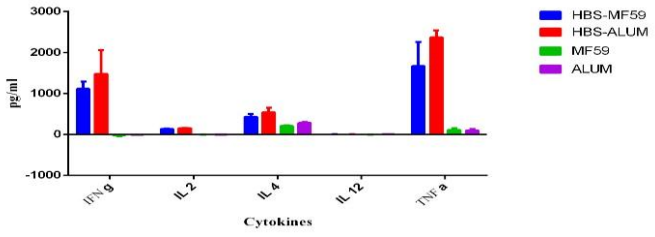
نتایج

نتایج سایتوکاین IL-2

بررسی نتایج سایتوکاین IL-2 نشان می‌دهد که تمامی گروه های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۰۱). بررسی نتایج سایتوکاین IL-2 در مورد گروه دریافت کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان داده است (p<۰/۰۰۰۱). (نمودار ۱)

نتایج سایتوکاین IL-4

بررسی نتایج سایتوکاین IL-4 نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت‌کننده HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند (p<۰/۰۱۶). بررسی نتایج سایتوکاین IL-4 در مورد گروه دریافت کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان داده است (p=۰/۰۱۶). (نمودار ۱)



نتایج سایتوکاین IFN-γ

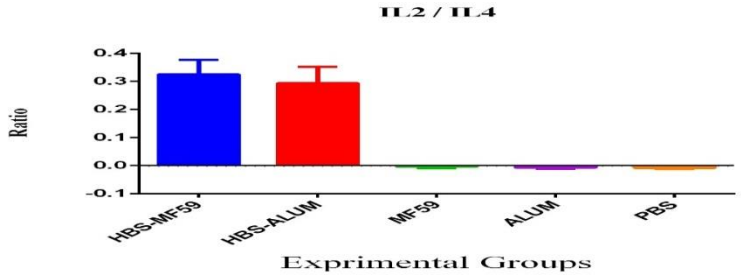
بررسی نتایج سایتوکاین IFN-γ نشان می‌دهد که تمامی گروه های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت‌کننده HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۰۱). بررسی نتایج سایتوکاین IFN-γ در مورد گروه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

دریافت کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان نداده است (p=۰/۱۵). (نمودار ۱)

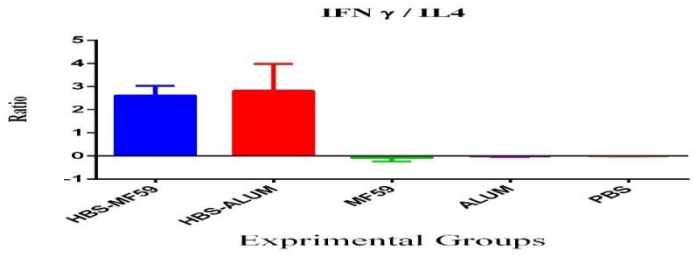
نتایج آنالیز سایتوکاین TNF-α

بررسی نتایج سایتوکاین TNF-α نشان می‌دهد که تمامی گروه های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت کننده HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۰۱). بررسی نتایج سایتوکاین TNF-α در مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان داده است (p<۰/۰۰۰۲). (نمودار ۱).



نتایج آنالیز نسبت سایتوکاین IL-2/IL-4

بررسی نتایج نسبت سایتوکاین IL-2/IL-4 نشان می‌دهد که تمامی گروه های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت کننده HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۰۱). بررسی نتایج سایتوکاین IL-2/IL-4 در مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به و گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 اختلاف معناداری نشان نداده است (p=۰/۴۳). (نمودار ۲).

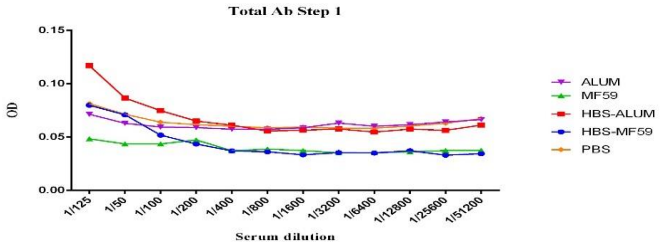


نتایج نسبت IFN-γ/IL-4

بررسی نتایج نسبت سایتوکاین IFN-γ/IL-4 نشان می‌دهد که تمامی گروه های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت کننده HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۰۱). بررسی نتایج سایتوکاین IFN-γ/IL-4 در مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان نداده است (p=۰/۹۶). (نمودار ۳)

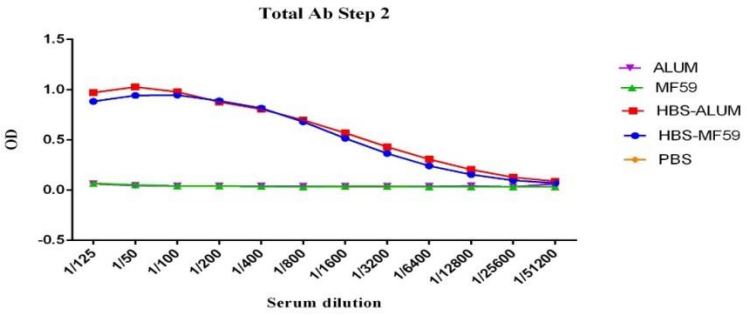
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]



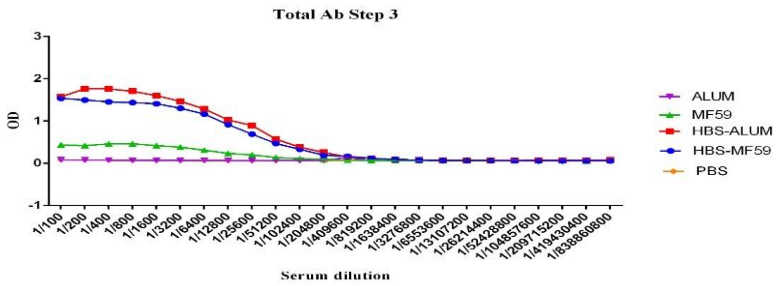
نتایج Total IgG بعد از تزریق اول

بین دو گروه اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل فرمولاسیون HBs-MF59 و HBs-Alum از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۰۰۱). از رقت ۱:۱۰۰ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف بین این دو گروه معنادار نبود (p>۰/۴۷). بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBs-Alum و گروه دریافت کننده کنترل MF59 از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۱). (نمودار ۴)



نتایج Total IgG بعد از تزریق دوم

بین دو گروه اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل فرمولاسیون HBs-MF59 و HBs-Alum از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده نشد (p>۰/۴۹). بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBs-MF59 و گروه دریافت کننده کنترل MF59 از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۶۴۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۰۸) بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBs-MF59 و گروه دریافت‌کننده کنترل Alum از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۶۴۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۱) . از رقت ۱:۱۲۸۰۰ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف بین این دو گروه معنادار نبود (P>۰/۳۸).(نمودار۵).



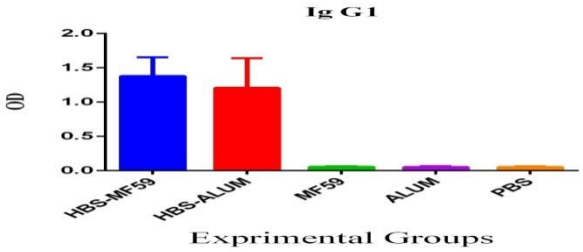
نتایج Total IgG بعد از تزریق سوم

بین دو گروه اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل فرمولاسیون HBs-MF59 و HBs-Alum از رقت ۱:۲۰۰ تا رقت ۱:۸۰۰ و

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

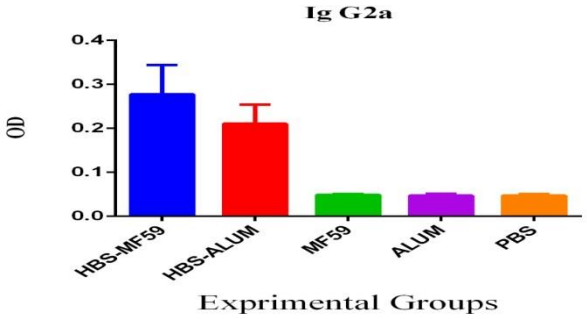
[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

هم چنین در رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۳). در سایر رقت‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBs-MF59 و گروه دریافت کننده کنترل Alum از رقت ۱:۱۰۰ تا رقت ۱:۱۰۲۴۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۳). در سایر رقت‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد. (نمودار ۶)



نتایج آنالیز ایزوتایپIgG1

بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپIgG1 نشان می‌دهد که تمامی گروه های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت کننده HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۰۱). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپIgG1 در مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به و گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان نداده است (p=۰/۶۶). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپIgG1 در مورد گروه‌های کنترل منفی نسبت به یکدیگر افزایش معناداری نداشته است (p>۰/۹۹). (نمودار ۷)



نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG2a

بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG2a نشان می‌دهد که تمامی گروه های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت کننده HBs-MF59 و HBs-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۰۱). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپIgG2a در مورد گروه دریافت کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 نسبت به و گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM افزایش معناداری نشان داده است (p=۰/۰۲). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG2a در مورد گروه‌های کنترل منفی نسبت به یکدیگر افزایش معناداری نداشته است (p>۰/۹۹). (نمودار ۸)

بحث

واکسن نوترکیب هپاتیت B با القای تیتر بالایی از آنتی‌بادی و فعال کردن ایمنی هومورال وتحریک سلول‌های Th2 قادر است از بدن محافظت نماید؛ با این حال این واکسن قادر به القاء پاسخ ایمنی سلولی (CMI) اختصاصی علیه HBsAg در حیوانات آزمایشگاهی و انسان نیست (۱۱). از آن جایی که همه از آن جایی که همه واکسن‌ها برای تحریک بیشتر و بهتر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

سیستم ایمنی نیاز به ماده تحریک کننده‌ای به نام ادجوانت دارند و در این میان واکسن نوترکیب هپاتیت B نیز از این قاعده مستثنی نمی‌باشد. ادجوانتی که به طور معمول در اغلب واکسن‌ها و از جمله واکسن هپاتیت B استفاده می‌شود ادجوانت آلوم بوده، که به دو صورت نمک آلومینیم هیدروکساید و آلومینیوم فسفات می‌باشد (۱۲). واکسن هپاتیت B قادر به تحریک ایمنی سلولی و سلول‌های Th1 نمی‌باشد و ۱۰٪ افراد نسبت به آن یا پاسخ آنتی بادی کمی دارند یا اصلاً پاسخ ندارند. موارد غیر پاسخ گو به این واکسن، در افراد دارای نقص ایمنی ناشی از افزایش اوره در خون گزارش شده است (۱۳). بنابراین به نظر می رسد باید در فرمولاسیون واکسن هپاتیت B تغییراتی صورت پذیرد تا کارائی واکسن افزایش یابد. در این مطالعه، پروتئین نوترکیب هپاتیت B در ادجوانت روغن در آب MF59 فرموله گردید تا این فرمولاسیون با واکسن تجاری از نظر الگوی پاسخ های ایمنی مقایسه گردد.

بررسی سایتوکاین IL-2 نشان داد که واکسن تجاری نسبت به واکسن فرموله شده در ادجوانت MF59 در القا این سایتوکاین کاراتر می باشد. سایتوکاین IL-2 بیانگرتکثیر لنفوسیتی است که نشان می‌دهد در گروه HBs Alum لنفوسیت های T پاسخ گو به واکسن دچار تکثیر بیشتری شدند که ممکن است به دلیل توان ادجوانت آلوم در رسوب واکسن در موضع تزریق باشد (۱۰) که این حالت در ادجوانت MF59 وجود ندارد (۱۴). در تحقیقی که توسط SurenderKhurana بر روی سویه آنفلونزای H5N1 انجام شد افزایشادجوانت IL-2 در واکسن فرموله شده با ادجوانت MF59 مشاهده گردید (۱۵). نتایج این تحقیق در تضاد با یافته های مطالعه حاصل می باشد که احتمالاً به دلیل تفاوت در ماهیت آنتی ژن در دو مطالعه می تواند باشد.

نتایج سایتوکاین IL-4 نشان می دهد که HBs Alum نسبت به HBs MF59 پاسخ بهتری در القا سایتوکاین IL-4 از خود نشان می دهد. سایتوکاین IL-4 بیانگر الگوی Th2 می باشد و این نشان می دهد که در فرمولاسیون آلوم نسبت به ادجوانت MF59 هدایت به سمت پاسخ ایمنی هومورال بیشتر است و در ادجوانت MF59، IL-4 کاهش یافته و بیانگر این است که ادجوانت MF59 تمایل بیشتری به هدایت پاسخ به سمت ایمنی سلولی دارد. مطالعات گسترده‌ای وجود دارد که ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم پاسخ های ایمنی را به سمت Th2 هدایت می کند مطالعه انجام شده توسط HuilinOu و همکارانش در سال ۲۰۱۶ برای فرمولاسیون ویروس آنفلونزا نوع H7N9 در ادجوانت MF59 در مقایسه با فرمولاسیون این آنتی‌ژن با ادجوانت Alum بر روی موش‌های BALB/c انجام شد بیانگر افزایش ترشح سایتوکاین IL-4 از سلول‌های Th2 و هدایت به سمت پاسخ ایمنی هومورال می‌باشد و این تفاوت شاید به علت تفاوت در نوع آنتی‌ژن دو مطالعه باشد (۱۶). کاهش IL-4 در گروه واکسن فرموله شده در ادجوانت MF59 بیانگر تمایل این فرمولاسیون در تعدیل به سمت Th1 است.

در مطالعه‌ای که Traqunina و همکاران بر روی میمونها انجام دادند مشاهده گردید که فرمولاسیون واکسن در ادجوانت MF59 به صورت قابل ملاحظه ای پاسخ آنتی بادی‌ها را افزایش می دهد (۱۷). در مورد سایتوکاین اینترفرون گاما بین گروه های واکسن اختلاف معنی داری مشاهده نشد. سایتوکاین اینترفرون گاما بیانگر الگوی پاسخ ایمنی سلولی می‌باشد که عدم تفاوت در گروه می‌تواند بیانگر آن باشد که فرمولاسیون جدید از مسیرهای دیگری جهت تقویت پاسخ های ایمنی سلولی استفاده می‌کند. بر اساس یافته‌ها در این مطالعه، کاهش سایتوکاین IL-4 به عنوان یکی از این مسیرها می‌تواند مطرح باشد.

بررسی سایتوکاین TNF-α نشان داد که این سایتوکاین در HBs Alum از MF59 بیشتر بوده است و این افزایش در HBs Alum شاید به این دلیل باشد که در گروه آلوم آنتی ژن رسوب واکسن در موضع تزریق موجب شکل گیری پاسخ های التهابی گردیده است (۱۸). که این خصوصیت در ادجوانت MF59 وجود ندارد (۱۹). مطالعات اثر دو ادجوانت آلوم و MF59 بر روی دو گروه خرگوش نیز نشان داده است که در فرمولاسیون MF59 کاهش سایتوکاین TNF-α نسبت به فرمولاسیون آلوم

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

مشاهده گردید که مزیت کاهش التهاب در ادجوانت MF59 را نشان می دهد (۲۰).

هم چنین بررسی نتایج نسبت سایتوکاینی IL-2/IL-4 و IL-4IFN-γ/ در گروه های تجربی اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است. نتایج کلی سایتوکاین ها نشان می دهد که ادجوانت MF59 با ادجوانت Alum اختلاف واضحی نشان نداده است و تنها ادجوانت آلوم سطوح بیشتری IL-4 ترشح نموده و در گروه MF59 کاهش معنی دار IL-4 نشان داده است که این نشان می دهد MF59 بیشتر از آلوم تمایل به پاسخ Th1 دارد و این نتیجه گیری با افزایش IFN-γ مشاهده نشد بلکه با کاهش سایتوکاین IL-4 نشان داده شده است. این یافته علمی با برخی مطالعات دیگر که نشان دهنده القا پاسخ ایمنی سلولی در فرمولاسیون واکسن با MF59 می باشد تایید می گردد (۲۱).

نتایج پاسخ آنتی بادی نشان می دهد که در تزریق اول و دوم پاسخ آنتی بادی در HBs Alum از HBs MF59 قوی تر بوده و در دو تزریق تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده و در تزریق سوم در بعضی رقت ها آلوم از MF59 بیشتر بوده است.

از این مطالعه نتیجه می شود که ادجوانت آلوم برتری‌هایی را نسبت به ادجوانت MF59 در پاسخ آنتی‌بادی ها داشته است. در این مطالعه آنتی‌بادی‌ها به عنوان شاخص ایمنی هومورال در نظر گرفته شد و باز هم ادجوانت آلوم نسبت به ادجوانت MF59 بهتر بوده است؛ اما در مطالعه‌ای که Traqunina و همکاران بر روی میمون‌ها انجام دادند نشان از آن دارد که MF59 به صورت قابل ملاحظه ای پاسخ آنتی بادی‌ها را افزایش می دهد (۱۷). این تفاوت در نتایج می تواند به دلیل تفاوت در میزان دوز تزریق شده، نوع میزبان که در این مطالعه موش و در مطالعه Traqunina بر روی میمون‌ها بوده است. هم چنین نتایج ایزوتیپ آنتی بادی ها نشان داده است که در القا IgG1 بین دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده نشد اما در القا IgG2a در گروه واکسن فرموله شده در ادجوانت MF59 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه آلوم مشاهده شد. با توجه به این که ایزوتیپ IgG2a بیانگر الگوی Th1 می باشد (۲۲). این یافته علمی می‌تواند تائیدی باشد بر این که الگوی پاسخ ایمنی در ادجوانت MF59 به سمت Th1 تعدیل شده است که با کاهش سایتوکاین IL-4 در این گروه هم خوانی دارد. مطالعات متعددی نشان داده اند که ادجوانت MF59 توان القا آنتی بادی IgG2a را دارد که با یافته های پژوهش حاضر منطبق باشد.

نتیجه گیری

نتایج کلی بررسی نشان می‌دهد که ادجوانت MF59 در مقایسه با آلوم با کاهش سایتوکاین IL-4 هر چند که پاسخ آنتی‌بادی از آلوم کمتر بوده اما پاسخ‌دهی با آنتی بادی هم در این ادجوانت به قوت خود باقی است با این تفاوت که تمایل ادجوانت MF59 برای تحریک پاسخ ایمنی سلولی و Th1 بیشتر است. ادجوانت MF59 نسبت به ادجوانت آلوم ایمن‌تر بوده و می تواند در مورد انسان استفاده شود (۲۳) و همین مزیت ایمن و سالم بودن این ادجوانت را می توان به عنوان مورد برای مطالعه قرار داد که چه اثری روی واکسن هپاتیت B برای استفاده انسانی خواهد داشت.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل کار پژوهشی پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده داروسازی و علوم دارویی – دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران می‌باشد. بخشی از هزینه‌های مربوط به این پایان نامه کارشناسی ارشد توسط دانشگاه فوق‌الذکر تامین گردیده است. بدین وسیله نویسندگان از همکاری‌های علمی سرکار خانم فاطمه عسگر حلوایی تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارضی در منافع حاصل از این مقاله بین نویسندگان وجود ندارد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

References:

1- Zoutendijk R, Reijnders JG, Zoulim F, Brown A, Mutimer DJ, Deterding K, et al. ***Virological response to entecavir is associated with a better clinical outcome in chronic hepatitis B patients with cirrhosis.*** Gut 201; 62(5): 760-5.

2-Merat S, Malekzadeh R, Rezvan H, Khatibian M. ***Hepatitis B in Iran***. Arch Iran Med. 2000 Jan 1; 3(4): 192-201.

3-Hervás-Stubbs S, Berasain C, Golvano J, Lasarte JJ, Prieto I, Sarobe P, et al. ***Overcoming class II-linked non-responsiveness to hepatitis B vaccine***. Vaccine 1994;12(10): 867-71.

4-Alper C. ***Genetic Prediction Of Non-Response To Hepatitis B Vaccine.*** The Pediatric Infectious Disease J 1990; 9(8): 603.

5-Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, et al. ***CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults***. Aids 2005; 19(14): 1473-79.

6-Tsai TF. ***MF59® Adjuvanted Seasonal and Pandemic Influenza Vaccines***. Yakugaku Zasshi 2011; 131(12): 1733-41.

7-Khurana S, Verma N, Yewdell JW, Hilbert AK , Castellino F, Lattanzi M, et al. ***MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines.*** Sci Transl Med 2011; 3(85): 85ra48.

8-Higgins DA, Carlson JR, Van Nest G. ***MF59 adjuvant enhances the immunogenicity of influenza vaccine in both young and old mice***. Vaccine 1996; 14(6): 478-84.

9-Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, et al. ***Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection***. Cellular immunology 1998; 186(1): 18-27.

10- Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J, Hennig R. ***Safety of MF59™ adjuvant***. Vaccine 2008; 26(26): 3209-22.

11- Wang S, Liu X, Caulfield MJ. ***Adjuvant synergy in the response to hepatitis B vaccines*** . Vaccine 2003; 21(27-30): 4297-306.

12- Zhang X, He P, Hu Z, Wang X, Liang Z. ***Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen and HB vaccine.*** Virol J 2011; 8(1): 78.

13- Sönmez E, Sönmez AS, Bayindir Y, Coskun D, Aritürk S. ***Antihepatitis B response to hepatitis B vaccine administered simultaneously with tetanus toxoid in nonresponder individuals***. Vaccine 2002; 21(3-4): 243-6.

14- Glenny A, Buttle G, Stevens MF. ***Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea- pigs: Toxoid precipitated with alum.*** J Pathology 1931; 34(2): 267-75.

15- Khurana S, Chearwae W, Castellino F, Manischewitz J, King LR, Honorkiewicz A, et al. ***Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

pandemic avian H5N1 influenza virus. Sci Transl Med 2010; 2(15): 15ra5-ra5.

16- Ou H, Yao H, Yao W, Wu N, Wu X, Han C, et al. ***Analysis of the immunogenicity and bioactivities of a split influenza A/H7N9 vaccine mixed with MF59 adjuvant in BALB/c mice.*** Vaccine 2016; 34(20): 2362-70.

17- Traquina P, Morandi M, Contorni M, Van Nest G. ***MF59 adjuvant enhances the antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen vaccine in primates*** .J Infect Dis 1996; 174(6): 1168-75.

18- Guy B. ***The perfect mix: recent progress in adjuvant research.*** Nat Rev Microbiol 2007; 5(7) 505-17.

19- Mosca, Flaviana. ***Activation of innate immunity by human vaccine adjuvants at injection site.*** Diss alma 2009.

20- Nouri A, Laraba-Djebari F. ***Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against Androctonus australis hector envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants.*** Vaccine 2015; 33(43): 5756-63.

21- Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, Manini I, Nuti S, Tavarini S, et al. ***Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice***. Vaccine 2008; 26(4): 552-61.

22- Ko EJ, Lee YT, Kim KH, Jung YJ, Lee Y, Denning TL, et al. ***Effects of MF59 Adjuvant on Induction of Isotype-Switched IgG Antibodies and Protection after Immunization with T-Dependent Influenza Virus Vaccine in the Absence of CD4+ T Cells***. J virology 2016; 90(15): 6976-88.

O'Hagan D, Ott G, De Gregorio E, Seubert A. ***The mechanism of action of MF59–an innately attractive adjuvant formulation***. Vaccine 2012; 30(29):4341-8

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26| NO 7 | Sep 2018
Received: 31 Dec 2017
Accepted: 10 Feb 2018

Formulation of hepatitis B vaccine in MF59 adjuvant and comparison of its immunization with Iran's commercial hepatitis B vaccine

Reyhaneh Mirzaei[1], Fahimeh Nemati Mansour[2], Mehdi Mahdavi[*3]

Original Article

Introduction: Hepatitis is a systemic diseasethat causes liver inflammation. The prevention of this infection is a vaccination. The commonly used vaccine to fight this disease is to use the vaccine formulated with Alum. This vaccine cannot provide immune response and complete productivity in some people. In this study, cellular and humoral immune responses of hepatitis B vaccine were compared with hepatitis B vaccine formulated in MF59 adjuvant.

Methods: In this experimental study, Balb/c mice received different formulations of the vaccine subcutaneously three times with a two-week interval. Then, the mice were bled and the levels of anti-HBs Ag were determined by the ELISA method. IFN-γ, IL-4, IL-2 and IFN-γ / IL-4 cytokines were examined by the ELISA method from the soup of spleen cells culture. The data were analyzed using the GraphPad prism software ANOVA.

Results: IL-4 levels were significantly higher in alum vaccine than the vaccine formulated in MF59, also the IFN-γ cytokine level showed no significant difference between two main groups. TNF-α cytokine shows that alum vaccine is more secreted due to the high inflammation compared with the vaccine with MF59. Total antibody in the third injection, in some dilutions of the commercial vaccine was more than vaccine with MF59.

Conclusion: Significant decrease in IL-4 and antibodies indicates that the tendency of vaccine formulated in MF59 to induce cellular immune responses is higher than humoral immune responses. In addition, the safety and lack of side effects of the MF59 adjuvant can also be considered as another advantage.

Keywords: Hepatitis B Vaccine, MF59 adjuvant, Alum adjuvant.

Citation: Mirzaei R, Nemati Mansour F, Mahdavi M. **Formulation of hepatitis B vaccine in MF59 adjuvant and comparison of its immunization with Iran's commercial hepatitis B vaccine.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci2018; 26(7): 553-64.

[1]Department of Biotechnology, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran Iran- Islamic Azad University
[2]Department of Biotechnology, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran Iran- Islamic Azad University
[3]Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran Iran- Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran,
***Corresponding author: Tel:** 09126850269,**email:** mahdavivac@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i7.206]