

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 می باشد. 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، موش های Balb/c در سه دوره، فرمولاسیون های مختلف واکسن را به صورت زیر پوستی و با فاصله دو هفته دریافت نمودند. سپس از موش ها خون گیری به عمل آمد و سطح آنتی بادی ضد HBs Ag با روش الایزا بررسی شد. سایتوکاین های IFN- γ ، IL-4 و IL-2 و نسبت IL-4/IFN- γ با روش الایزا از سوپ روئی کشت سلول های طحال بررسی شد. داده های 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. آنتی بادی توتال پس از تزریق سوم در بعضی رقت ها در واکسن تجاری نسبت به واکسن با MF59 افزایش بیشتری داشت. **نتیجه گیری:** کاهش معنادار IL-4 و آنتی بادی ها نشان می دهد که تمایل واکسن فرموله شده با MF59 برای القای پاسخ ایمنی سلولی نسبت به هومورال بیشتر بوده به علاوه ایمن بودن و کمبود عوارض جانبی ادجوانت MF59 را نیز می توان مزیتی دیگر به شمار آورد.

واژه های کلیدی: ادجوانت آلوم، ادجوانت MF59، واکسن هپاتیت B

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 ایمنولوژی انیستیتو پاستور تهران، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۲۶۹۰۲۶۸۵، پست الکترونیکی: mahdavi@pav.ac.ir، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

مقدمه

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

سالانه حدود ده هزار نفر در کشور به این ویروس مبتلا شده و هپاتیت B یکی از اصلی ترین بیماری های کبدی در ایران به شمار می رود (۲). واکسیناسیون را باید یکی از موفقیت آمیزترین روش های پزشکی در مبارزه با بیماری های عفونی دانست. جای هیچ تردیدی نیست که استراتژی واکسن بسیار مقرون به صرفه تر از استراتژی درمان می باشد و هزینه ای که واکسیناسیون برای هر بیماری دارد به مراتب کمتر از هزینه درمانی با داروهای موثر می باشد، بنابراین استراتژی واکسن را باید بهترین راهکار برای مقابله با عفونت های میکروبی از جمله هپاتیت دانست. امروزه جهت پیش گیری از عفونت هپاتیت B، از واکسن بر پایه پروتئین نوترکیب هپاتیت استفاده می شود که در ادجوانت هیدروکسید آلوم فرموله شده است. واکسن هایی که امروزه برای پیش گیری از عفونت HBV مورد استفاده قرار می گیرند شامل پروتئین S و پروتئین pre-S2 (پروتئین M) می باشند. پاسخ مناسب بر علیه HBs Ag به شدت وابسته به همکاری سلول های T می باشد و برای ایجاد پاسخ ایمنی مطلوب برهم کنش سلول های T کمکی با لنفوسیت های B ضروری است. در مدل های موشی ثابت شده که بسیاری از هاپلو تیپ های MHC-II، برای عرضه HBsAg سازگار نیستند به عبارتی HBsAg دارای ساختار مناسبی برای این هاپلو تیپ ها نبوده و MHCها قابلیت اتصال به شاخص های آنتی ژنیک ویژه سلول های T و عرضه آن را نخواهند داشت (۳،۴). تزریق واکسن بدون استفاده از ادجوانت کارایی لازم را نخواهد داشت.

ادجوانت ها موادی هستند که ایمونوژنیسیته ایمونوژن ها را افزایش می دهند (۵). ادجوانت ها در ابتدای دهه ۱۹۲۰ معرفی شدند و تا به امروز تعداد و عملکردهای معرفی شده آنها بسیار گسترش یافته است. ادجوانت آلوم پراستفاده ترین ادجوانت تاریخ می باشد 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 تشکیل دهنده این ادجوانت عبارتند از اسکوالن، و سورفکتانت که شامل Tween80 و Span85 است. ادجوانت MF59 اولین بار در سال ۱۹۹۷ در واکسن آنفلونزای فصلی استفاده شد؛ این ادجوانت ایمنی زایی را در نوجوانان و افراد مسن به طور قابل ملاحظه ای افزایش می دهد (۶).

ادجوانت MF59 در فرمولاسیون واکسن هایی 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 می شود، ماکروفاژها در محل آسیب دیده سریعاً ترشح شده و مونوسیت ها و گرانولوسیت ها که از جمله آن ها می توان نوتروفیل ها را نام برد به محل تزریق فراخوانی شده و انواع سایتوکاین ها 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 سلول ها از جمله سلول های B، T و سلول های کشنده طبیعی اثر کرده و آن ها را نیز فعال می کند. فراخوانی گرانولوسیت ها در این ادجوانت برخلاف ادجوانت آلوم باعث ترشح کموکاین هایی از جمله CCL2، CCL3، CCL4 می شود (۹). از

زیرپوستی صورت گرفت. ۱۱ روز پس از آخرین تزریق آزمایشات بررسی پاسخ‌های ایمنی در گروه‌های تجربی انجام شد.

بررسی پاسخ‌های 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 در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, Germany) کامل با تراکم 4×10^6 در میلی لیتر تنظیم شده و سپس در پلیت ۲۴ خانه‌ای (Nunc, Denmark) کشت داده و آنتی ژن به غلظت $5 \mu\text{g/ml}$ اضافه گردید و بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO_2 ، مابع رویی چاهک‌ها پس از سانتریفیوژ در دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، جمع‌آوری و جهت سنجش سایتوکاین‌ها استفاده گردید.

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

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

بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال

ده روز پس از تزریق آخر از همه موش‌ها خون‌گیری 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 ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه تهیه و در دمای ۲۰- درجه تا زمان آزمایش نگهداری شد.

جمله مزیت‌های دیگر ادجوانت MF59 نسبت به سایر ادجوانت‌های روغنی و از جمله آلوم می‌توان به پاسخ‌دهی سریع یا Fast protection و هم‌چنین دپو نکردن آنتی ژن در محل تزریق نام برد (۱۰). در مطالعه حاضر ادجوانت MF59 در فرمولاسیون واکسن هیپاتیت B استفاده شده و سپس توان ایمنی‌زایی این واکسن با واکسن تجاری مقایسه می‌گردد. اعتقاد ما بر این است که فرمولاسیون جدید توان ایمنی‌زایی بیشتری داشته باشد و پاسخ‌های 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 امولسیون روغن در آب O/W (Oil in Water) بوده که با نسبت ۵۰:۵۰ پروتئین HBsAg نوترکیب مخلوط می‌شود. 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 موش‌های آزمایشگاهی

تعداد ۵۵ سر موش BALB/c ماده Inbred از انستیتو پاستور خریداری شد. سن این موش‌ها ۶-۸ هفته بوده با وزن تقریبی ۲۰ گرم و در بخش اتاق حیوانات انستیتو پاستور در دمای ۲۰-۲۲ 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 گروه‌های 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 را گرفتند ۵ میکروگرم بوده است و تزریقات ۳ بار و با فاصله ۲ هفته به صورت

ملاحظات اخلاقی

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

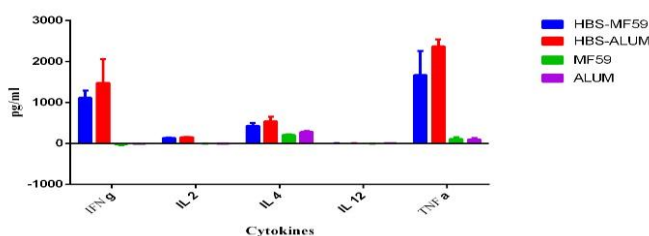
نتایج

نتایج سایتوکاین IL-2

بررسی نتایج سایتوکاین IL-2 نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه HBs-MF59 و HBs-Alum و نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند ($p < 0.0001$). بررسی نتایج سایتوکاین IL-2 در مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان داده است ($p < 0.0001$). (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 و نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند ($p < 0.016$). بررسی نتایج سایتوکاین IL-4 در مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان داده است ($p = 0.016$). (نمودار ۱)



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 $P < 0.05$ به مفهوم معنی‌داری بوده است.

نتایج سایتوکاین IFN-γ

بررسی نتایج سایتوکاین IFN-γ نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت‌کننده HBs-MF59 و HBs-Alum و نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند ($p < 0.0001$). بررسی نتایج سایتوکاین IFN-γ در مورد گروه

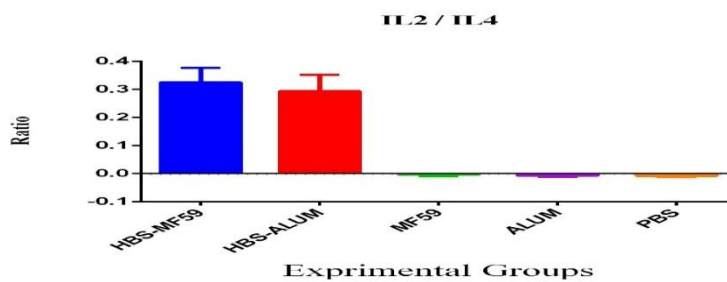
بررسی نتایج سایتوکاین IFN-γ نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت‌کننده

کننده HBS-MF59 و HBS-Alum نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان می‌دهند ($p < 0.0001$). 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 ($p < 0.0002$). (نمودار ۱).

دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان نداده است ($p = 0.15$). (نمودار ۱)

نتایج آنالیز سایتوکاین TNF- α

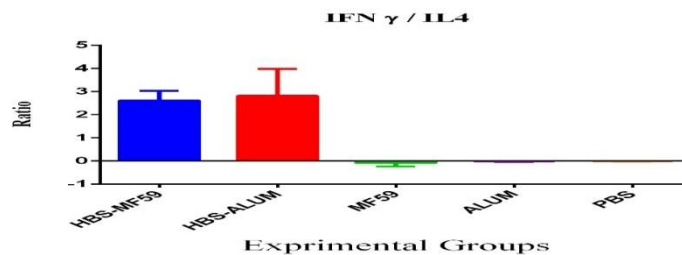
بررسی نتایج سایتوکاین TNF- α نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت



می‌دهند ($p < 0.0001$). 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 ($p = 0.43$). (نمودار ۲).

نتایج آنالیز نسبت سایتوکاین IL-2/IL-4

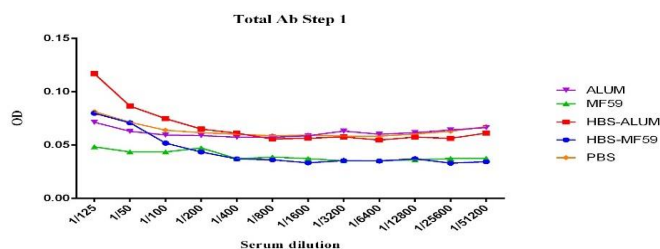
بررسی نتایج نسبت سایتوکاین IL-2/IL-4 نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت‌کننده HBS-Alum و HBS-MF59 نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان



می‌دهد ($p < 0.0001$). 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 ($p = 0.96$). (نمودار ۳)

نتایج نسبت IFN- γ /IL-4

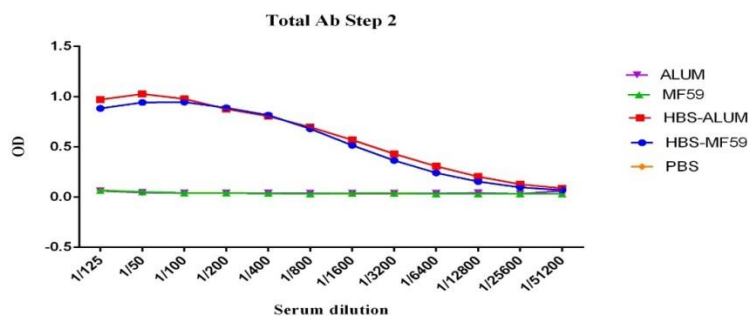
بررسی نتایج نسبت سایتوکاین IFN- γ /IL-4 نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن شامل گروه دریافت‌کننده HBS-Alum و HBS-MF59 نسبت به گروه‌های کنترل شامل MF59 و Alum و PBS افزایش معناداری را نشان



نتایج Total IgG بعد از تزریق اول

بین دو گروه اصلی دریافت کننده واکسن شامل فرمولاسیون HBs-MF59 و HBs-Alum از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد ($p < 0.0001$). از رقت ۱:۱۰۰ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف بین این دو گروه معنادار نبود

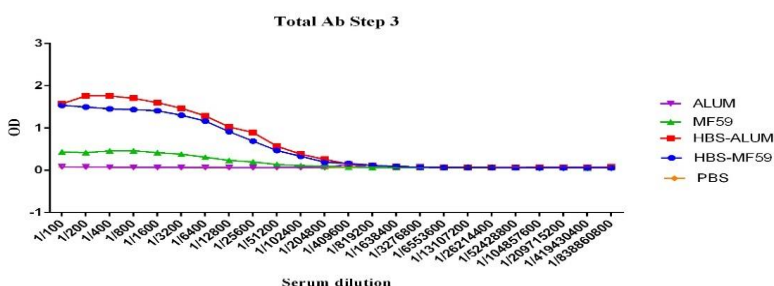
($p > 0.047$). بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون HBs-Alum و گروه دریافت کننده کنترل MF59 از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد ($p < 0.01$). (نمودار ۴)



نتایج Total IgG بعد از تزریق دوم

بین دو گروه اصلی دریافت کننده واکسن شامل فرمولاسیون HBs-MF59 و HBs-Alum از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p > 0.049$). بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون HBs-MF59 و گروه دریافت کننده کنترل MF59 از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۶۴۰۰ اختلاف معناداری

مشاهده شد ($p < 0.0008$) بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون HBs-MF59 و گروه دریافت کننده کنترل Alum از رقت ۱:۲۵ تا رقت ۱:۶۴۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد ($p < 0.01$). از رقت ۱:۱۲۸۰۰ تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف بین این دو گروه معنادار نبود ($P > 0.038$). (نمودار ۵).

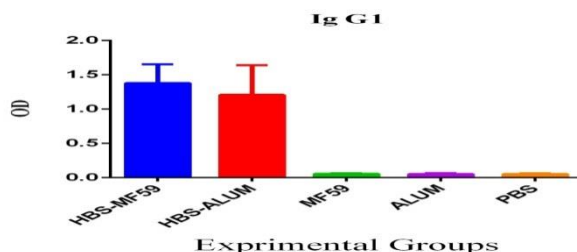


نتایج Total IgG بعد از تزریق سوم

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

دریافت کننده کنترل Alum از رقت ۱:۱۰۰ تا رقت ۱:۱۰۲۴۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد ($p < 0.03$). در سایر رقت‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد. (نمودار ۶)

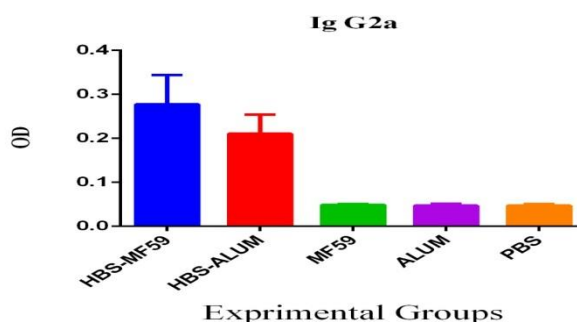
هم‌چنین در رقت ۱:۵۱۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد. در سایر رقت‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBS-MF59 و گروه



مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM نسبت به و گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 افزایش معناداری نشان نداده است ($p = 0.66$). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG1 در مورد گروه‌های کنترل منفی نسبت به یکدیگر افزایش معناداری نداشته است ($p > 0.99$). (نمودار ۷)

نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG1

بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG1 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 ($p < 0.001$). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG1 در



نسبت به یکدیگر افزایش معناداری نداشته است ($p > 0.99$). (نمودار ۸)

نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG2a

بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG2a 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 ($p < 0.001$). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG2a در مورد گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-MF59 نسبت به و گروه دریافت‌کننده واکسن با فرمولاسیون HBS-ALUM افزایش معناداری نشان داده است ($p = 0.02$). بررسی نتایج آنالیز ایزوتایپ IgG2a در مورد گروه‌های کنترل منفی

بحث

واکسن نو ترکیب هیپاتیت B با القای تیتر بالایی از آنتی‌بادی و فعال کردن ایمنی هومورال و تحریک 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

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 پاسخ‌های ایمنی را به سمت Th2 هدایت می‌کند 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 Traquinina و همکاران بر روی میمون‌ها انجام دادند مشاهده گردید که فرمولاسیون واکسن در ادجوانت MF59 به صورت قابل ملاحظه‌ای پاسخ آنتی‌بادی‌ها را افزایش می‌دهد (۱۷). در مورد سایتوکاین اینترفرون گاما بین گروه‌های واکسن اختلاف معنی‌داری 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 پاسخ‌های 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 شکل‌گیری پاسخ‌های 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

سیستم ایمنی نیاز به ماده تحریک‌کننده‌ای 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 آلومینیوم 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 آنتی‌بادی کمی دارند یا اصلاً پاسخ ندارند. موارد غیر پاسخ‌گو به این واکسن، در افراد دارای نقص ایمنی ناشی از افزایش اوره در خون گزارش شده است (۱۳). بنابراین به نظر می‌رسد باید در فرمولاسیون واکسن هپاتیت B تغییراتی صورت پذیرد تا کارایی 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 پاسخ‌های ایمنی مقایسه گردد.

بررسی سایتوکاین IL-2 نشان داد که واکسن تجاری نسبت به واکسن فرموله شده در ادجوانت MF59 در القا این سایتوکاین کارا تر می‌باشد. سایتوکاین IL-2 بیانگر تکثیر لنفوسیتی است که نشان می‌دهد در گروه HBs Alum لنفوسیت‌های T پاسخ‌گو 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 SurrenderKhurana بر روی سوبه آنفلونزای H5N1 انجام شد افزایش ادجوانت IL-2 در واکسن فرموله شده با ادجوانت MF59 مشاهده گردید (۱۵). نتایج این تحقیق در تضاد با یافته‌های مطالعه حاصل می‌باشد که احتمالاً به دلیل تفاوت در ماهیت آنتی‌ژن در دو مطالعه می‌تواند باشد.

نتایج سایتوکاین IL-4 نشان می‌دهد که HBs Alum نسبت به MF59 پاسخ بهتری در القا سایتوکاین IL-4 از خود نشان می‌دهد. سایتوکاین IL-4 بیانگر الگوی Th2 می‌باشد و این نشان می‌دهد که در فرمولاسیون آلوم نسبت به ادجوانت MF59 هدایت به سمت پاسخ ایمنی هومورال بیشتر است و در

در گروه واکسن فرموله شده در ادجوانت MF59 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه آلود مشاهده شد. با توجه به این که ایزوتیپ IgG2a بیانگر الگوی Th1 می‌باشد (۲۲). این یافته علمی می‌تواند تأییدی 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 هم‌خوانی دارد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ادجوانت MF59 توان القا آنتی‌بادی IgG2a را دارد که با یافته‌های پژوهش حاضر منطبق باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج کلی بررسی نشان می‌دهد که ادجوانت MF59 در مقایسه با آلود با کاهش سایتوکاین IL-4 هر چند که پاسخ آنتی‌بادی از آلود کمتر بوده اما پاسخ‌دهی با آنتی‌بادی 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 آلود ایمن‌تر بوده و می‌تواند در مورد انسان استفاده شود (۲۳) و همین مزیت ایمن و سالم بودن این ادجوانت را می‌توان به عنوان مورد برای مطالعه قرار داد که چه اثری روی واکسن هیپاتیت B برای استفاده انسانی خواهد داشت.

سپاسگزاری

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

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

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

هم‌چنین بررسی نتایج نسبت سایتوکاینی IL-2/IL-4 و IL-4/IFN- γ در گروه‌های تجربی اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است. نتایج کلی سایتوکاین‌ها نشان می‌دهد که ادجوانت MF59 با ادجوانت Alum اختلاف واضحی نشان نداده است و تنها ادجوانت آلود سطوح بیشتری IL-4 ترشح نموده و در گروه MF59 کاهش معنی‌دار IL-4 نشان داده است که این نشان می‌دهد MF59 بیشتر از آلود تمایل به پاسخ Th1 دارد و این نتیجه‌گیری 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 می‌باشد تایید می‌گردد (۲۱).

نتایج پاسخ آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در تزریق اول و دوم پاسخ آنتی‌بادی در HBs Alum از HBs MF59 قوی‌تر بوده و در دو تزریق تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده و در تزریق سوم در بعضی رقت‌ها آلود از MF59 بیشتر بوده است.

از این مطالعه نتیجه می‌شود که ادجوانت آلود برتری‌هایی را نسبت به ادجوانت MF59 در پاسخ آنتی‌بادی‌ها داشته است. در این مطالعه آنتی‌بادی‌ها به عنوان شاخص ایمنی هومورال در نظر گرفته شد و باز هم ادجوانت آلود نسبت به ادجوانت MF59 بهتر بوده است؛ اما در مطالعه‌ای که Traquinina و همکاران بر روی میمون‌ها انجام دادند نشان از آن دارد که MF59 به صورت قابل ملاحظه‌ای پاسخ آنتی‌بادی‌ها را افزایش می‌دهد (۱۷). این تفاوت در نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان دوز تزریق شده، نوع میزبان که در این مطالعه موش و در مطالعه Traquinina بر روی میمون‌ها بوده است. هم‌چنین نتایج ایزوتیپ آنتی‌بادی‌ها نشان داده است که در القا IgG1 بین دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد اما در القا IgG2a

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 2011; 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*

- 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

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

Reyhaneh Mirzaei¹, Fahimeh Nemati Mansour², Mehdi Mahdavi^{*3}

Original Article

Introduction: Hepatitis is a systemic disease that 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 Sci 2018; 26(7): 553-64.

¹Department of Biotechnology, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran Iran- Islamic Azad University

²Department of Biotechnology, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran Iran- Islamic Azad University

³Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran Iran- Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran,

*Corresponding author: Tel: 09126850269, email: mahdavivac@gmail.com