

Preparation of conjugate vaccine of *Haemophilus influenzae* type b polyribosylribitol phosphate with keyhole limpet hemocyanin protein and poly lactic-co-glycolic acid nanoparticle and its immunological evaluation in animal model

Yavari H(M.Sc)¹, Siadat SD(PhD)², Shapouri R(PhD)¹, Shafiee Ardestani M(PhD)^{2*}

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences and Medicine, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

2- Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences and Medicine, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

Received: 27 Aug 2012, Accepted: 5 Dec 2012

Abstract

Background: Today, the use of nano-materials is one of the most common methods of making modern medications; these materials are very useful in increasing the accessibility of drugs to target. The aim of this study is to obtain immunogenic nano-vaccine against meningitis caused by *Haemophilus influenzae*.

Materials and Methods: In this experimental study, the PRP (polyribosylribitol phosphate) antigen of *Haemophilus influenzae* was conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH), a powerful immunogen molecule, and a nanoparticle with high adsorption called poly lactic co-glycolic acid (PLGA). The two-part and three-part conjugated antigens were injected into male SW1 race mice. The animals were randomly divided into five groups, which received PRP, PRP+KLH, PRP-KLH, PRP-KLH-PLGA, and PRP-TT intramuscularly together with complete Freund's adjuvant, respectively. Twenty eight days after injection, blood samples were obtained and increases in serum antibody titer were determined with ELISA technique. For evaluation of the amount of the produced antigen cell entrance into immune cells, immune cells uptake assay and flow cytometry technique were used.

Results: The results showed increases in serum IgG antibody titers of animals immunized with conjugate vaccines. The findings also suggest the higher phagocytosis of conjugated triplex-containing nanoparticle by host immune cells.

Conclusion: The findings of this study indicate that antigen-containing PLGA has considerably higher absorption and immunogenicity and can be more powerful vaccines against *Haemophilus meningitis*.

Keywords: Conjugate antigen, *Haemophilus influenzae*, meningitis, vaccine

*Corresponding author:

Address: Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Email: Shafieeardestani@gmail.com

تهیه واکسن کوئزوگه پلی ریپوزیل ریبتول فسفات هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b با پروتئین Keyhole Limpet Hemocyanin و نانوذره Poly lactic-co-glycolic acid و ارزیابی ایمنی آن در مدل حیوانی

حامد یآوری¹، سید داور سیادت²، رضا شاپوری³، مهدی شفیعی اردستانی^{4*}

- 1- کارشناسی ارشد زیست شناسی - میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
- 2- دانشیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- 3- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
- 4- استادیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/6/6 تاریخ پذیرش: 91/9/15

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از نانومواد از پرکاربردترین روش‌های ساخت داروهای نوین است؛ این مواد در افزایش قابلیت دسترسی داروها به هدف بسیار مفیدند. هدف از این مطالعه دستیابی به نانواکسنی ایمونوژن علیه مننژیت ناشی از باکتری هموفیلوس آنفلوانزا است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، آنتی ژن کوئزوگه‌ای از پلی ریپوزیل ریبتول فسفات (PRP) هموفیلوس آنفلوانزا و یک مولکول ایمونوژن قوی به نام Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) و نانو ذره‌ای با قابلیت جذب سطحی بالا به نام Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) ساخته شد. جهت بررسی قدرت آنتی ژنیسیته، کوئزوگه دو قسمتی و سه قسمتی حاصل به موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد SW1 تزریق شد. بدین منظور موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند که به ترتیب PRP، PRP+KLH، PRP-KLH، PRP-KLH-PLGA و PRP-TT را به همراه ادجوانت کامل فروند به صورت درون عضلانی دریافت کردند. در روز 28 بعد از تزریق، خون‌گیری انجام و نمونه‌های خونی از نظر افزایش تیتراژ آنتی بادی اختصاصی با تکنیک الایزا مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی میزان ورود به سلول آنتی ژن تولیدی در سلول‌های ایمنی از Immune Cell Uptake Assay و تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند تیتراژ آنتی بادی IgG در سرم حیوانات ایمن شده با واکسن‌های کوئزوگه افزایش می‌یابد. یافته‌ها همچنین حاکی از افزایش ورود به سلول کوئزوگه سه قسمتی حاوی نانو ذره در سلول‌های ایمنی میزبان است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بیان‌گر این واقعیت است که آنتی ژن حاوی PLGA به مراتب قدرت جذب و ایمنی‌زایی بیشتری داشته و می‌تواند واکسن قوی‌تری علیه مننژیت هموفیلوسی باشد.
واژگان کلیدی: آنتی ژن کوئزوگه، هموفیلوس آنفلوانزا، مننژیت، واکسن

*نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه هپاتیت و ایدز

Email:Shafieeardestani@gmail.com

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا یک باکتری گرم منفی و پلی مورفیسیم (چند شکلی) است و می توان آن را به اشکال کوکونید، کوکوباسیل، باسیل و یا رشته ای مشاهده نمود (3-1). 75 درصد سویه های این باکتری فاقد کپسول هستند؛ این در حالی است که اکثر سویه های مهاجم و بیماری زای جدا شده از بیماران، دارای کپسول تیپ b هستند. جنس پلی ساکارید در سرو تیپ b از قندهای 5 کربنه (پنتوز) بوده و از واحدهای پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات (Polyribosyl ribitol phosphate-PRP) تشکیل شده است. این باکتری باعث مهار فعالیت باکتریسیدالی و اپسونوفاگوستوزی وابسته به کمپلمان در بیماران می شود (4، 5). مهم ترین بیماری های عفونی ناشی از این سویه ها، مننژیت است که در آن، قطعات لیپو الیگوساکارید و پپتیدو گلیکان باکتری منجر به افزایش تراوایی سد خونی-مغزی و التهاب مننژ می گردد. در واقع مننژیت، التهاب پرده عنکبوتیه و فضای زیر عنکبوتیه و گاهی سخت شامه است (4).

به طور کلی میزان مرگ و میر ناشی از مننژیت باکتریال در کودکان، 3 تا 20 درصد گزارش شده و هموفیلوس آنفلوانزا مهم ترین عامل این نوع مننژیت در کودکان زیر 5 سال است (4). این باکتری از نازوفارنکس به بدن وارد شده، پس از کلونیزاسیون در این ناحیه به خون راه یافته و خود را به مننژ رسانده و با تکثیر در فضای زیر عنکبوتیه و آزاد سازی سایتوکین های التهابی و در نهایت ایجاد ادم در این نواحی منجر به کاهش جریان خون مغزی - نخاعی و از کار افتادن خود تنظیمی رگ های مغزی و مرگ می شود. آنتی بادی محافظت کننده علیه PRP (از کلاس IgG)، از راه جفت به جنین قابل انتقال است و تا حداکثر 6 ماه پس از تولد می تواند نوزاد را در برابر عفونت های مهاجم ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا حفظ نماید، پس از این سن، سطح آنتی بادی محافظت کننده به شدت کاهش یافته و نوزاد مستعد عفونت های منتشر و مهاجم به ویژه مننژیت می گردد. لذا واکسیناسیون در فاصله سنی بین 15-2 ماهگی از اهمیت بالایی برخوردار است (4، 5).

در سال 1970 واکسیناسیون با کپسول پلی ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزا باعث پیش گیری مننژیت در کودکان بالای 20 ماه شد ولی این واکسن در نوزادان زیر 2 سال کارایی ندارد چرا که PRP خالص در این سنین، عیار کمی از آنتی بادی را القا می نماید؛ از دیگر معایب این واکسن القای آنتی بادی هایی است که بیش از 90 درصدشان از نوع IgM هستند و نیز تغییر ایزوتیپ باکتری به IgG به ندرت اتفاق می افتد (6). به دلیل تمام محدودیت های واکسن حاوی PRP خالص، تحقیقات در جهت تولید واکسن های موثرتر ادامه یافت و در اوایل دهه 80، محققان موفق به تولید واکسن های کونژوگه علیه هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b شدند؛ در این واکسن ها PRP به صورت هاپتن به طور شیمیایی به یک حامل پروتئینی متصل می شد (7، 8). هاپتن ها ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که به تنهایی ایمنوژن نبوده اما با اتصال به یک پروتئین حامل، ایمنوژن می شوند (9). با کشف این روش پروتئین های مختلفی در کونژوگاسیون مورد مطالعه قرار گرفتند. در این میان تحقیقات روی Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) بسیار شاخص تراند. کونژوگاسیون موفق KLH با پروتئین های سطحی استرپتوکوکوس (10)، زیر واحد B شیگا توکسین (11)، کپسول آلتریناتی سودوموناس آئروژینوزا (12)، پروتئین های سطحی پولیوماویروس (13)، فسفاتیدیل اینوزیتول مانوزید سطح مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (14)، اپی توپ های دیواره باسیلوس آنتراسیس (15) و بسیاری مطالعات دیگر منجر شد در بیست و چهارمین کنگره سرطان در آلمان واکسن های کونژوگه KLH به عنوان ابزار جدید درمانی بیماری های مختلف مطرح شود (16). با وجود ایمنوژنیسته بیشتر PRP کونژوگه با پروتئین های حامل، محققان همواره به دنبال راهی در افزایش جذب سطحی واکسن ها هستند و علم نانوتکنولوژی در این زمینه بسیار موثر بوده است. لذا در این پژوهش ضمن کونژوگاسیون PRP با KLH آن را با PLGA (Poly lactic-co-glycolic acid) که نانوذره ای با قابلیت جذب سطحی بالاست همراه نمودیم. PLGA

معمولاً در چرخه‌های سلولی اختلالی ایجاد نمی‌کند و زمان قرارگیری دارو بر روی سلول و مسیر اندوسیتوزی را کاهش می‌دهد. در واقع در یک جمله می‌توان گفت که نانوذرات سدهای بیولوژیک را در می‌نوردند (17).

در این تحقیق سعی شد آنتی‌ژن کونژوگه‌ای از PRP باکتری هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b با KLH و PLGA ساخته و تاثیرات آن را در مدل حیوانی مورد ارزیابی‌های ایمونولوژیکی قراردهیم، تا شاید در راستای مبارزه با مننژیت هموفیلوسی کودکان، واکسنی قوی‌تر را در مقایسه با مطالعات پیشین ارائه دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، جهت تولید انبوه باکتری، هموفیلوس آنفلوانزای تیپ batCC1623 از کلکسیون سویه‌های استاندارد انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. به طور خلاصه این سویه ابتدا در محیط کشت آگار خون دار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 ساعت کشت داده شد و سپس به منظور تهیه بذر سلولی، محیط کشت اختصاصی هموفیلوس مورد استفاده قرار گرفت. فرایند فرمانتاسیون به منظور تهیه توده سلولی هموفیلوس آنفلوانزا در محیط کشت حاوی Soybean pepton (10 گرم بر لیتر)، dextrose (5 گرم بر لیتر)، Heminchloride (10 گرم بر لیتر)، NAD (10 میلی‌گرم بر لیتر)، yeast extract (10 میلی‌لیتر بر لیتر) در pH=7/3 صورت گرفت. بذر سلولی تهیه شده به مخزن 60 لیتری فرمانتور Flow Contact (b.v.bilthovan unit) صنعتی حاوی محیط کشت فوق تلفیح و در نهایت توده سلولی حاصل برای استخراج PRP مورد استفاده قرار گرفت (8، 18).

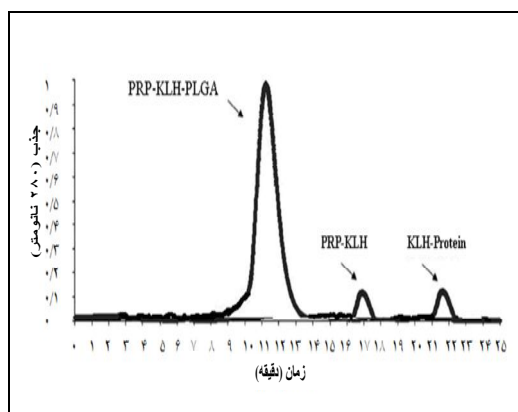
جهت استخراج و خالص سازی PRP، عمل غیر فعال‌سازی باکتری‌ها با استفاده از محلول 0/35-0/37 درصد (حجمی/حجمی) از فرمالین صورت گرفت. محلول رویی (Supernatant) آخرین انتقال محیط کشت جمع‌آوری و تا غلظت نهایی 4 درصد، استات سدیم به آن افزوده شد. سپس تحت شرایط سرما (4 درجه سانتی‌گراد)

اتانول به آرامی به آن اضافه و pH در محدوده 6-2 تنظیم شد؛ پس از یک شب نگهداری در یخچال، سانتریفیوژ شده و PRP خام تهیه گردید. PRP خام به دست آمده در آب مقطر آپیروژن حل شده و پس از جدا کردن مواد زاید، ستاولن به آن اضافه شد. رسوب حاصل در کلرید سدیم 0/3 مولار حل و مواد غیر محلول آن نظیر کمپلکس اسیدهای نوکلئیک - ستاولن جدا شدند. در نهایت پس از چند مرحله سانتریفیوژ و رسوب گذاری الکی، حل کردن در آب مقطر و افزودن هیدروکسی آپتایت به PRP، سوپرناتانت حاصله از فیلتر میلی پور عبور داده شد و پس از دیالیز، PRP تخلیص و لیوفلیزه گردید (19).

برای آماده سازی PRP جهت کونژوگاسیون، 1 میلی‌لیتر آن در بافر فسفات حل و سپس با 0/1 میلی‌مول سیانوژن بروماید ترکیب شد؛ آنگاه 1 میلی‌مول اتیل دی متیل آمین پروپیل کربوآمید (EDAC) به عنوان کاتالیزور و سولفو-N- هیدروکسی سوکسینامید (sulfo-NHS) جهت پایداری واکنش آمیداسیون به آن اضافه شد. در مرحله بعد 1 میلی‌مول آدیپیک اسید دی هیدرازید (ADH) به عنوان لینکری برای اتصال بین دو ترکیب PRP و KLH به ظرف واکنش اضافه و به مدت نیم ساعت در 10000 دور سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل حاوی PRP متصل به ADH یا PRP فعال است. 0/1 میلی‌مول KLH را با 0/1 میلی‌مول EDAC و 0/1 میلی‌مول sulfo-NHS ترکیب و سپس PRP فعال شده به صورت قطره قطره به آن اضافه گردید و کمپلکس PRP-KLH ساخته شد. در مرحله بعد 1 میلی‌مول محلول کونژوگه حاصل با ترکیب PEG3400-sulfo-PLGA در حضور 1 میلی‌مول EDAC و sulfo-NHS واکنش داده شد. بدین ترتیب کونژوگه PRP-KLH-PLGA به دست آمد که با استفاده از روش کروماتوگرافی سفادکس G75 خالص سازی شد.

جهت آزمودن قدرت ایمنی‌زایی واکسن تولید شده، از موش‌های نر 28-32 گرمی نژاد SW1 استفاده شد. موش‌ها از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات انیستیتو پاستور ایران تهیه و در اتاق حیوانات با دمای کنترل شده 23 ± 2

سفادکس (G75) انجام شد. با توجه به این که در سیستم سفادکس G75 مولکولهای درشت تر، زودتر خارج می شوند به طور تئوریک کونژوگه 3 قسمتی زودتر خارج شده و پیک اول و بلندتر نمودار شدت جذب را به خود اختصاص می دهد (شکل 1). در این سیستم تنها پروتئین ها جذب دارند، PRP و PLGA چون ساختار پروتئینی ندارند فاقد جذب UV هستند.



شکل 1. جداسازی ماکرومولکولهای 3 قسمتی از ماکرومولکولهای 2 قسمتی و غیر کونژوگه

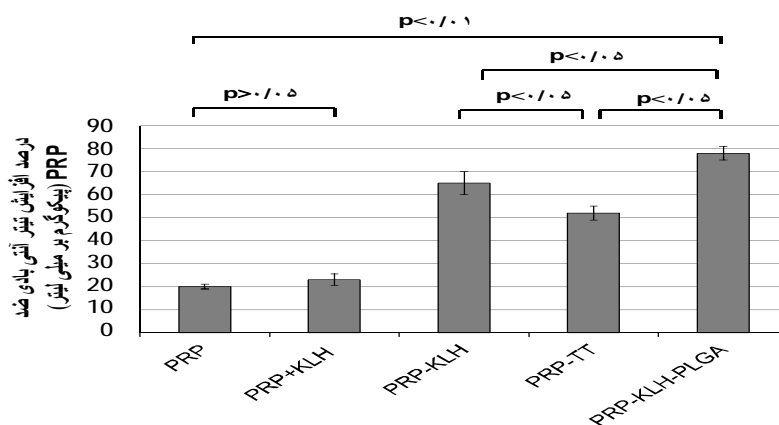
نتایج تست الیزا حاکی از آن است که تیتراآنتی بادی اختصاصی بعد از دریافت آنتی ژن در گروه های PRP و PRP+KLH افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل (PRP-TT) نداشته؛ در مقابل تیتراآنتی بادی در گروه دریافت کننده کونژوگه PRP-KLH به طور معنی داری افزایش یافته است. بررسی ها هم چنین نشان داد که نانوواکسن (PRP-KLH-PLGA) القا کننده بالاترین تیتراآنتی بادی در مقایسه با دیگر گروه ها است. این افزایش در مقایسه با گروه کنترل و گروه PRP-KLH با $p < 0/05$ ، و در مقایسه با گروه PRP با $p < 0/01$ معنی دار بود.

سانتی گراد و دو رهنوری 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند. آزمایشات روی تمامی گروه های مورد بررسی در شرایط کاملاً یکسان و مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر مبنای بیانیه هلسینکی صورت گرفت. حیوانات به 5 گروه 6 تایی تقسیم شدند؛ این گروه ها به ترتیب 30 میکروگرم PRP، PRP+KLH، PRP-KLH، PRP-KLH-PLGA و PRP-TT را به همراه ادجوانت کامل فروند به صورت درون عضلانی دریافت کردند. 14 روز بعد از تزریق اول دوز یاد آور به حیوانات تزریق شد، در روز 28 خون گیری از موش ها انجام شد. خون گرفته شده، سانتریفیوژ و سرم حاصله از نظر تیترا Total IgG توسط تکنیک الیزا مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی میزان ورود به سلول آنتی ژن تولیدی در سلول های ایمنی از تست Immune Cell Uptake Assay و ارزیابی آن با فلوسایتومتری انجام شد. در این آزمایش نوتروفیل های جداسازی شده از خون حیوانات را با 50 میکرولیتر محلول 1 مولار نانو کونژوگه مخلوط کرده و به مدت 60 دقیقه در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. در ادامه نمونه ها به مدت 5 دقیقه در سانتریفیوژ 1800 دور قرار گرفتند و رسوب تهیه شده با بافر فسفات شستشو و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر آنالیز گردید.

داده های خام حاصل از آزمایشات با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون واریانس یک طرفه با تست Post Hoc Tukey با سطح معنی داری $p < 0/05$ آنالیز و به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند.

یافته ها

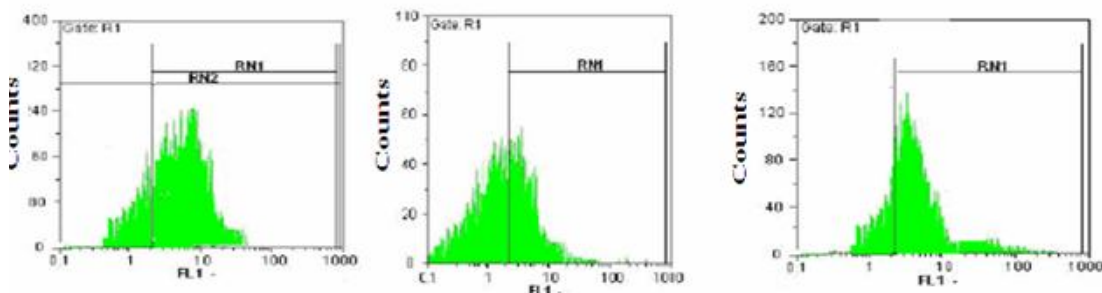
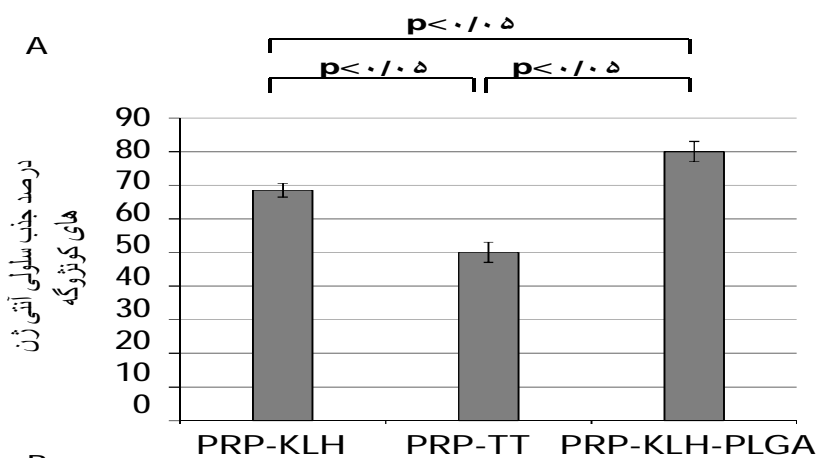
در این مطالعه جداسازی ماکرومولکول کونژوگه از غیر کونژوگه با استفاده از کروماتوگرافی



شکل 2. افزایش تیتر آنتی بادی اختصاصی (IgG) در گروه‌های مورد آزمایش. همان طور که می‌بینید کونزوگاسیون PRP با KLH میزان ترشح آنتی بادی اختصاصی را به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش داده است؛ این افزایش در مورد آنتی ژن کونزوگه PRP-PLGA به مراتب بیشتر ($p < 0/01$) بوده است.

نتایج حاصل از تست Immune Cell Uptake Assay حاکی از افزایش معنی‌دار ($p < 0/05$) ورود به سلول شدن آنتی ژن‌های کونزوگه در سلول‌های ایمنی نسبت به PRP-TT بود (شکل 3). با این حال آنتی ژن حاوی نانوذره PRP-KLH-PLGA نسبت به آنتی ژن PRP-KLH جذب سلولی (فاگوسیتوز) بیشتری داشته و با $p < 0/05$ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه PRP-KLH نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از تست Immune Cell Uptake Assay حاکی از افزایش معنی‌دار ($p < 0/05$) ورود به سلول شدن آنتی ژن‌های کونزوگه در سلول‌های ایمنی نسبت به PRP-TT بود (شکل 3). با این حال آنتی ژن حاوی نانوذره PRP-KLH-PLGA نسبت به آنتی ژن PRP-KLH جذب سلولی (فاگوسیتوز) بیشتری داشته و با $p < 0/05$ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه PRP-KLH نشان می‌دهد.



شکل 3. بررسی میزان ورود به سلول آنتی‌ژن‌های کونزوگه (تکنیک فلوسایتومتری). A: مقایسه میزان cellular uptake آنتی‌ژن‌های کونزوگه. B: تصاویر دستگاه فلوسایتومتر از ورود آنتی‌ژن‌های کونزوگه به درون سلول‌های ایمنی (فاگوسیتوز). آنتی‌ژن حاوی نانوذره جذب سلولی یا فاگوسیتوز بیشتری را نشان داده است.

بحث

در تحقیق حاضر، اثر ایمنی زایی تزریق کپسول پلی ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b به تنهایی و همراه با KLH و PLGA بررسی شد. نتایج حاکی از آن است که PRP به تنهایی ایمنونویسیته پایینی داشته ولی ترکیب PRP-KLH ایمنی زایی آن را به مراتب افزایش می‌دهد؛ از طرفی همراه نمودن این کونزوگه دو قسمتی با نانو ذره PLGA به دلیل توانایی اندرکنش بیشتر با سلول‌های ایمنی باعث بالا بردن تیتراژ آنتی بادی اختصاصی شده است.

PRP جزء آنتی ژن‌هایی است که برای ایجاد پاسخ ایمنی علیه آن، نیاز به حضور لئوسیت‌های B است و از طرف دیگر در نوزادان سلول‌های B کمتر تکامل یافته‌اند، بنابراین بیشتر کودکان کمتر از دو سال پاسخ ایمنی ضعیفی نسبت به آنتی ژن PRP دارند. واکسن موثر باید آنتی‌بادی‌هایی با میل پیوندی بالا و تشکیل سلول B خاطره را القا کند، هر دو این واکنش‌ها تنها در صورتی اتفاق می‌افتد که واکسن بتواند سلول‌های T کمکی (T-helper) را فعال سازد (20). سلول‌های کمکی فعال شده توسط آنتی ژن، CD40L را بروز می‌دهند که به CD40 روی لئوسیت‌های B و ماکروفاژها متصل می‌شود و این سلول‌ها را فعال می‌سازد (21). واکسن‌های اولیه علیه هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b که تنها حاوی PRP بودند به دلیل ماهیت فیزیکی و شیمیایی خود قادر به تحریک ایمنی سلولی و لئوسیت‌های T نبوده و جز آنتی ژن‌های مستقل از سلول T طبقه‌بندی می‌شوند (22)، لذا توانایی ایجاد مصونیت در مقابل مننژیت هموفیلوسی نوزادان را نداشتند. یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها در سوئیچ پاسخ‌های مستقل از سلول T به سمت پاسخ‌های وابسته به T، ایجاد کونزوگه هاپتن- ناقل Hapten-Carrier Complex است (23، 24). در واقع در بعضی از عفونت‌ها که در آن، آنتی ژن، یک پلی ساکارید کپسولی است، پلی ساکارید به صورت کوآلان به یک پروتئین خارجی متصل می‌شود، این گونه واکسن‌ها که واکسن‌های کونزوگه نامیده می‌شوند سریع‌تر از واکسن‌های پلی ساکاریدی فاقد پروتئین‌های متصل شونده،

آنتی‌بادی‌های با میل پیوندی بالا و خاطره ایمنولوژیک را القا می‌کنند (20). از جمله ایمنونژن‌ترین این حامل‌های پروتئینی که کارآمدی‌اش در افزایش ایمنی‌زایی واکسن‌های پلی ساکاریدی در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است KLH است که به دلیل داشتن اسید آمینه‌های لایزین در ساختارش برای کونزوگاسیون بسیار مناسب است.

در مطالعه حاضر مکانیسم افزایش ایمنی‌زایی آنتی ژن کونزوگه PRP-KLH نسبت به PRP ایجاد پاسخ ایمنی وابسته به T و تولید آنتی بادی‌هایی با میل پیوندی بالا و تشکیل سلول B خاطره است.

در سال 2006 نوگبائورو همکاران دریافتند کونزوگه نمودن KLH با پروتئین‌های سطحی پولیوماویروس آن را بسیار ایمنونژن‌تر می‌کند (13). بونیاراتانا کالو همکاران در سال 2008 کونزوگه KLH با فسفاتیدیل اینوزیتول مانوزید سطح مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را به عنوان کاندید جدید واکسن بیماری سل مطرح کردند (14). در سال 2009 نیز کونزوگه KLH به اپی توپ‌های دیواره باسیلوس آنتراسیس به عنوان واکسن بسیار قوی‌تری علیه این باکتری عنوان شد (15). یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات پیشین در اتصال KLH به دیگر آنتی‌ژن‌های باکتریایی کاملاً مطابقت داشته و مطالعات مخالفی در این زمینه تاکنون گزارش نشده است.

امروزه در راستای ساخت واکسن‌هایی موثرتر به دنبال افزایش جذب سطحی آنتی‌ژن‌های طراحی شده توسط سلول‌های ایمنی هستند، نانوتکنولوژی در این زمینه ابزاری بسیار کارآمد است. در مطالعه‌ای در سال 2010 اثبات شد که آنتی ژن‌ها و فاکتورهای رشد انسانی به طور موفقیت‌آمیزی در نانوذره PLGA یا بستری از آن ترکیب می‌شوند. از سال 1999 اداره غذا و داروی آمریکا استفاده از PLGA را در داروهای مختلف و به خصوص در داروهای ضد سرطانی مورد تایید قرار داده است (26).

در این پژوهش نیز این نانوذره جهت همراهی با PRP-KLH و ساخت نانو آنتی ژن کونزوگه به کار گرفته شد. نتایج حاصل از تست‌الایزا، Immune Cell Uptake Assay و فلوسایتومتری حاکی از افزایش معنی‌دار تیتراژ آنتی

کاهش میزان شیوع مننژیت باکتریال در جهان انجام شده است و امید است در جهت تحقق شعار این سازمان که گفته است: "هیچ کودکی در هیچ جای جهان نباید در اثر یک بیماری قابل پیش‌گیری صدمه ببیند یا کشته شود" قدمی برداشته باشد.

تشکر و قدر دانی

مولفین مراتب سپاس و قدردانی خود از مدیریت محترم انیستیتو پاستور ایران که منابع مالی و امکانات مورد نیاز این پروژه را تامین نمودند اعلام می‌دارند. هم‌چنین از سرکار خانم مرضیه قاسمی به خاطر مشاورت علمی شان بسیار سپاسگزاریم.

منابع

- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Mosby; 2005.
- Peltola H. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clinical Microbiology Reviews. 2000;13(2):302-17.
- Jawetz M, editor. Adelberg's Medical Microbiology. Twenty; 2007.
- Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. Immunology. 2004;113(2):163-74.
- Cripps AW, Foxwell R, Kyd J. Challenges for the development of vaccines against Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis. Current opinion in immunology. 2002;14(5):553-7.
- Li W, Sydney Chung S. Flow cytometric evaluation of leukocyte function in rat whole blood. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2003;39(10):413-9.
- Eskola J, Ward J, Dagan R, Goldblatt D, Zepp F, Siegrist C-A. Combined vaccination of Haemophilus influenzae type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis. Lancet. 1999;354(9195):2063-8.
- Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P, Crane D, Belgrave D, Corbel MJ. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO International Standard for Haemophilus influenzae b capsular polysaccharide. Biologicals. 2007;35(4):235-45.

بادی اختصاصی (IgG) و هم‌چنین موید جذب سطحی بیشتر آنتی ژن سه قسمتی در مقایسه با PRP-TT (واکنس متداول کونزوگه شده با توکسوئید تتانوس) و PRP-KLH است. در واقع اضافه شدن PLGA به کونزوگه PRP-KLH باعث افزایش نفوذپذیری و جذب آن در سلول‌های ایمنی شده است. مکانسیم عملکرد اینواکنس در افزایش ایمنی‌زایی، نانسایز بودن، قابلیت ترکیب بالا با نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها برای ترشح آنتی‌بادی بیشتر است که می‌توان آن را به دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل و قطبی فراوان در سطح مولکول کروی PLGA نسبت داد.

کابا و همکاران در سال 2009 نشان دادند نانوپارٹیکل‌ها همانند سلول‌های دندریتیک در افزایش عرضه آنتی‌ژنی در جهت پاسخ‌های آنتی‌بادی و فاگوسیتوز آنتی‌ژن‌ها توسط سلول‌های ایمنی و CTLs (لنفوسیت‌های T سایتولیک) عمل می‌کنند (27). در تحقیقی که در سال 2011 انجام شد PLGA به عنوان حامل مناسبی برای انتشار تسهیل یافته آنتی‌ژن‌ها با قابلیت لیگاند شدن اختصاصی با مولکول‌های هدف و افزایش تیترا ایمونوگلوبولین‌ها و افزایش معنی‌دار پاسخ‌های ایمنی مطرح شد (28). این مطالعات با نتایج پژوهش ما مطابقت داشته و تأییدی بر صحت نتایج به دست آمده در این پژوهش است.

محدودیت مطالعه حاضر ناشی از کمبود مطالعات همه‌جانبه در زمینه به کارگیری PLGA با هدف ساخت نانواواکنس‌ها است و این امر از نوپایی عرصه نانو در تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی نشأت می‌گیرد.

نتیجه گیری

کونزوگاسیون PRP هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b با KLH قادر است ایمنی‌زایی و فاگوسیتوز آن را افزایش دهد؛ ولی کونزوگاسیون این آنتی ژن دو قسمتی با نانوذره PLGA به دلیل افزایش قدرت فاگوسیتوز شدن آنتی ژن توسط سلول‌های ایمنی باعث افزایش قابل توجه‌ای در ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی اختصاصی در بدن میزبان می‌شود. در واقع این نانواآنتیژن، واکنس‌ایمونوژن تر و قوی‌تری علیه مننژیت هموفیلوسینوزا داناست. این تحقیق در راستای اهداف بلندپایه سازمان بهداشت جهانی مبنی بر

- and their functionalization with model ligands. *Journal of controlled release*. 2006;111(1):135-44.
18. Takagi M, Zangirolami TC, Tanizaki MM, Crespo J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenzae* type b. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Microbiology*. 2007:602-8.
19. Merritt J, Allard G, O'Toole L, Swartz R, Licari P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae*. *Journal of biotechnology*. 2000;81(2):189-97.
20. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and molecular immunology* Saunders Elsevier. International Edition, 6th. 2007.
21. Tiwari S, Goyal AK, Mishra N, Khatri K, Vaidya B, Mehta A, et al. Development and characterization of novel carrier gel core liposomes based transmission blocking malaria vaccine. *Journal of controlled release*. 2009; 140(2): 157-65.
22. Tiwari SH, Goyal A. Development and characterization of novel carrier gel core liposomes based transmission blocking malaria vaccine. *Nanomedicine*. 2009; 140:157-65.
23. DelVecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA, Kraycer JA, Estock F, et al. *Brucella proteomes-a review*. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):593-603.
24. Delvecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA, Kraycer JA, Estock F, Elzer P, et al. *Brusella proteome-a review*. *Vet Microbial*. 2002; 90(1-4):539-603.
25. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(3):170-83.
26. Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(2):140-57.
27. Bandyopadhyay A, Fine RL, Demento S, Bockenstedt LK, Fahmy TM. The impact of nanoparticle ligand density on dendritic-cell targeted vaccines. *Biomaterials*. 2011; 32(11): 3094-105.
9. Rappuoli R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. *Vaccine*. 2001;19(17):2319-22.
10. McMillan DJ, Batzloff MR, Browning CL, Davies MR, Good MF, Sriprakash KS, et al. Identification and assessment of new vaccine candidates for group A streptococcal infections. *Vaccine*. 2004;22(21):2783-90.
11. Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. *Infection and immunity*. 2005;73(10):6523-9.
12. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infection and immunity*. 2003; 71(7): 3875-84.
13. Neugebauer M, Walders B, Brinkman M, Ruehland C, Schumacher T, Bertling WM, et al. Development of a vaccine marker technology: Display of B cell epitopes on the surface of recombinant polyomavirus-like pentamers and capsids induces peptide-specific antibodies in piglets after vaccination. *Biotechnology journal*. 2006;1(12):1435-46.
14. Boonyarattanakalin S, Liu X, Michieletti M, Lepenies B, Seeberger PH. Chemical synthesis of all phosphatidylinositol mannoside (PIM) glycans from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(49):16791-9.
15. Loeff C, Saile E, Rauvolfova J, Quinn CP, Hoffmaster AR, Zhong W, et al. Secondary cell wall polysaccharides of *Bacillus anthracis* are antigens that contain specific epitopes which cross-react with three pathogenic *Bacillus cereus* strains that caused severe disease, and other epitopes common to all the *Bacillus cereus* strains tested. *Glycobiology*. 2009; 19(6): 665-73.
16. Schumacher K. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) conjugate vaccines as novel therapeutic tools in malignant disorders. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2001;127:1-2.
17. Fischer S, Foerg C, Ellenberger S, Merkle HP, Gander B. One-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles