ارزیابی الگوی سایتوکاینی واکسن دوگانه دیفتری-کزاز در مدل حیوان آزمایشگاهی

آزاده فردی پور[۱]، تقی زهرایی صالحی[۲*]، مجید تبیانیان [۳]، رامک یحیی رعیت[۲]

چکیده

به منظور دست یافتن به راهکارهای مناسب جهت تنظیم پاسخ‌های ایمنی که منجر به افزایش کارآیی واکسن شود، در این مطالعه الگوی پاسخ ایمنی متعاقب تزریق واکسن دوگانه دیفتری-کزاز در موش مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از واکسن های تک ظرفیتی دیفتری و کزاز و واکسن دوگانه دیفتری - کزاز که در مجاورت ادجوانت (ژل فسفات آلومینیوم) و بدون ادجوانت، فرموله شده بود، استفاده گردید. واکسن‌های فرموله شده در ۵ مرحله به ٦ گروه از موش های Balb/c تزریق شد. دو هفته بعد از آخرین تزریق، طحال موش‌ها خارج شده و سلول های طحالی در مجاورت آنتی ژن های موردنظر قرار گرفتند و میزان سایتوکاین های) IL-4 (Interleukin 4و IFN-ɣ (Interferon gamma)در مایع رویی کشت سلولی اندازه گیری گردید. میزان IL-4 در موش هایی که واکسن های با ادجوانت را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه بدون ادجوانت و نیز گروه کنترل، افزایش مشخصی را نشان داد. درحالی‌که این افزایش در مورد IFN-ɣ معنی دار نبوده است. نتایج فوق نشان داد که جهت گیری پاسخ های ایمنی بیشتر به سمت پاسخ های ایمنی زیررده Th2 (T helper 2) است که علت این امر می تواند به ماهیت آنتی ژن، نحوه فرمولاسیون واکسن و درصد جذب آنتی ژن در ژل آلوم مرتبط باشد که در نهایت بر روی گرایش پاسخ ایمنی تأثیر خواهد گذاشت.

واژگان کلیدی: *واکسن دیفتری-کزاز، ایمنی زایی، پاسخ ایمنی، سایتوکاین.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۳

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی از سال ۱۹۷٤ واکسیناسیون بر علیه سه بیماری دیفتری، کزاز و سیاه سرفه را جزو برنامه گسترده ایمن سازی قرار داده است و اکثر کشورها از این برنامه تبعیت می‌کنند (۱). نتیجه این برنامه کاهش مرگ و میر کودکان و نوزادان براثر سه بیماری مهلک دیفتری، کزاز و سیاه سرفه است. تاریخچه ایمن سازی با این واکسن در ایران به سال ۱۳۲۰ بر می گردد. از سال ۱۳۲۰ واکسن توأم دیفتری و کزاز و از سال ۱۳۲۸ واکسن سه گانه دیفتری، کزاز و سیاه سرفه (واکسن ثلاث) توسط موسسه واکسن و سرم سازی رازی تولید گردید و همگام با روش های تولید واکسن در دنیا ارتقا یافته است (۲). در دنیا واکسن کزاز اولین بار سال ۱۹۲٤ تولید و تزریق گردید و واکسن دوگانه دیفتری کزاز سال ۱۹٤۰ تولید و به شکل وسیعی مورد استفاده قرار گرفت (۳). واکسن دوگانه دیفتری- کزاز خردسالان که واکسن دو بیماری دیفتری و کزاز می‌باشد در ایران برای ایمن سازی نوزادان و کودکان بین سنین ٦ هفتگی تا ٦ سالگی در کودکان حساس به واکسن ثلاث استفاده می‌شود. بیماری کزاز در کشورهای توسعه یافته به علت داشتن برنامه واکسیناسیون مؤثر بیماری نادری است اما هنوز در بالغین و در جمعیت هایی که واکسیناسیون کافی و مؤثری در مورد آن‌ها صورت نگرفته بیماری دیده می‌شود (٤, ۵). کلستریدیوم تتانی باکتری گرم مثبت بی هوازی است که در محیط زندگی می کند و بیماری کزاز توسط نوروتوکسینی که از این باکتری در شرایط بی هوازی در زخم های آلوده تولید می‌شود ایجاد خواهد شد. این توکسین سیستم اعصاب خودکار را تحت تأثیر قرار داده و اسپاسم و تشنج عضلانی ایجاد خواهد کرد (٦). دیفتری بیماری باکتریایی حادی است که توسط باسیل گرم مثبتی به نام کورینه باکتریوم دیفتریه ایجاد می‌شود. دیفتری اغلب توسط قطرات و ذرات تنفسی انسان منتقل می‌شود. سویه های توکسین زای کورینه باکتریوم دیفتریه باعث عفونت در حلق، میوکاردیت، آسیب به اعصاب و عوارض سیستمیک و

۱-گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۲- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران(tsalehi@ut.ac.ir)

۳- بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳-انستیتو پاستورایران،تهران، ایران

نیز عفونت پوست می شوند. غشای کاذب سفید رنگی که به دنبال این بیماری در حلق ایجاد می شود تنفس را دچار اختلال کرده و باعث انسداد مجاری هوایی و زجر تنفسی در بیماران خواهد شد. بیماری دیفتری در کشورهای توسعه یافته به ندرت دیده می‌شود اما در کشورهای در حال توسعه دیده شده و از طریق قطرات تنفسی به سایرین بخصوص اطفال منتقل می‌شود (۷). واکسن دوگانه دیفتری و کزاز جز دسته واکسن های کشته از نوع واکسن های توکسوئیدی است که در واقع حاوی توکسین غیرفعال شده است. در مورد این واکسن ها نیاز به دوزهای یادآور است که باید تزریق واکسن هر ۱۰ سال یک‌بار تکرار شود. به‌طور کلی برای اینکه واکسن‌های کشته ایمنی کافی و به مدت طولانی ایجاد کنند باید این واکسن ها ابتدا در چند نوبت تزریق گردند و برای جلوگیری از کاهش سطح آنتی بادی و ادامه ایمنی، اغلب لازم است تزریق واکسن در آینده به عنوان دوز یادآور تکرار شود (۸). واکسن دوگانه دیفتری و کزاز خردسالان حاوی توکسوئید دیفتری به مقدار حدود (Limit of flocculation) Lf/ml 40 و توکسوئید کزاز به مقدار حدود Lf/ml 12 و تیومرسال به‌عنوان ماده نگهدارنده به مقدار ۰٫۰۱ ٪ ±۰٫۰۰۱۵ و ژل فسفات آلومنیوم به عنوان ادجوانت با مقدار آلومنیوم (Single Human Dose) mg/SHD ≤ 6/. است. هر دو دسته واکسن های زنده و کشته می‌توانند حاوی ادجوانت یا یاور باشند، ادجوانت جهت تقویت سیستم ایمنی در فرمولاسیون واکسن بکار می رود که در این مورد ژل فسفات آلومنیوم، آنتی ژن را در ساختار خود جذب می کند و به تدریج آزاد کرده و ارائه آنتی ژن توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن را تقویت می‌کند.یکی از مهم‌ترین نکات در طراحی واکسن و یا ارزیابی آن، بررسی پاسخ های ایمنی متعاقب تجویز واکسن است (۹). از آنجا که هر واکسن تمایل به تحریک قسمتی از پاسخ های ایمنی خواهد داشت فرمولاسیون و تهیه واکسنی که بتواند پاسخ طولانی مدت و با کیفیت بالاتری ایجاد کند منجر به افزایش کارایی واکسن از نظر طول مدت و نوع پاسخ ایمنی خواهد شد، لذا درک صحیح از پاسخ های به وجود آمده از واکسن بسیار اهمیت خواهد داشت تا در صورت ناکارآمدی آن بتوان تغییرات مناسب را در فرمولاسیون یا تهیه آنتی ژن انجام داد (۱۰). در این مطالعه الگوی پاسخ ایمنی متعاقب تزریق واکسن دوگانه خردسال در موش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این طرح می‌تواند منجر به شناسایی رفتار سیستم ایمنی به دنبال تزریق واکسن شود در نتیجه دست یافتن به راهکارهای مناسب جهت تنظیم پاسخ‌های ایمنی منجر به افزایش کارآیی واکسن از نظر طول مدت و نوع پاسخ ایمنی خواهد شد.

مواد و روش‌کار

تهیه واکسن

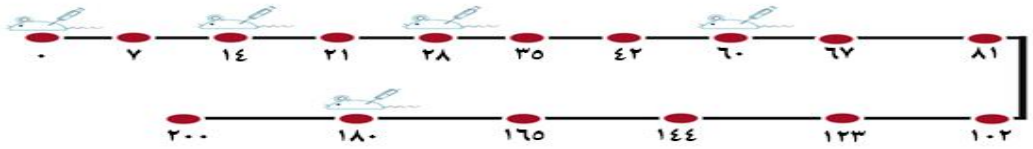
سوش های واکسینال کورینه باکتریوم دیفتریه و کلستریدیوم تتانی در محیط کشت‌های اختصاصی کشت داده شد سپس توکسین های تولید شده در مجاورت فرمالدهید به توکسویید تبدیل شده و ژل فسفات آلومینیوم به عنوان ادجوانت و تیومرسال به‌عنوان ماده نگهدارنده به آن‌ها اضافه گردید. فرمولاسیون واکسن دو گانه دیفتری- کزاز و واکسن مونووالان دیفتری و واکسن مونووالان کزاز به‌صورت جداگانه صورت گرفت که هر کدام از این واکسن‌ها در دو حالت با ادجوانت فسفات آلومنیوم و بدون ادجوانت ساخته شد (۱۱).

مراحل تزریق واکسن و خون‌گیری

گروه های مطالعه شامل واکسن دوگانه دیفتری- کزاز، واکسن دیفتری، واکسن کزاز بود که به دوصورت همراه با ادجوانت فسفات آلومینیم و بدون ادجوانت فرموله گردیدند. در عین حال گروه کنترل منفی و کنترل اجوانت (که شامل اجوانت همراه با تیومرسال بود) نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند(جدول ۱) .

جدول ۱. گروه های واکسن های مورد مطالعه

نام گروه	واکسن تزریقی	تعداد حیوان	نحوه تزریق
واکسن با ادجوانت	دوگانه دیفتری-کزاز	۲٤	داخل عضلانی
	دیفتری مونووالان	۲٤	داخل عضلانی
	کزاز مونووالان	۲٤	داخل عضلانی
	کنترل ادجوانت(ادجوانت+تیومرسال)	۲٤	داخل عضلانی
واکسن بدون ادجوانت	دوگانه دیفتری-کزاز	۲٤	داخل عضلانی
	دیفتری مونووالان	۲٤	داخل عضلانی
	کزاز مونووالان	۲٤	داخل عضلانی
کنترل منفی	-	۲٤	داخل عضلانی



نگاره۱. برنامه ایمن سازی با واکسن

تعداد ۱۹۲ سر موش ماده نژاد Balb/c با سن ٦ تا ۸ هفته برای ایمن سازی با واکسن در نظر گرفته شد که به هر گروه ۲٤ سر موش اختصاص داده شد. مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق پژوهشی در مورد استفاده و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی، تمامی موش ها تحت شرایط استاندارد در دمای ۳± ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. چرخه روشنایی و تاریکی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برقرار بود . هر حیوان فقط یک بار مورد آزمایش قرار گرفت و در طی آزمایش ها، آب و غذای کافی در اختیار حیوانات قرار داشت. فرایند ایمن سازی گروه های تحت مطالعه در ۵ مرحله در روزه های صفر، ۱٤، ۲۸، ٦۰ و ۱۸۰ با استفاده ۱۰۰ میکرولیتر از واکسن فرموله شده و به روش تزریق داخل عضلانی صورت گرفت (15-12) . (نگاره شماره ۱).

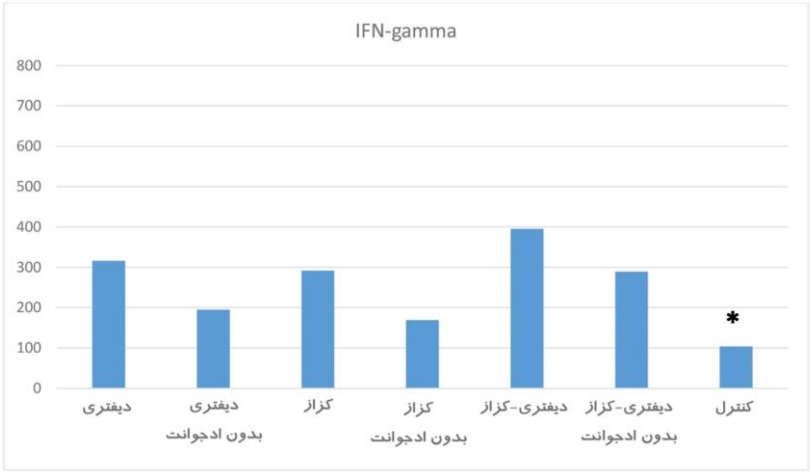
نتایج

بررسی الگوی سایتوکاینی تولید شده متعاقب تجویز واکسن دوگانه دیفتری – کزاز

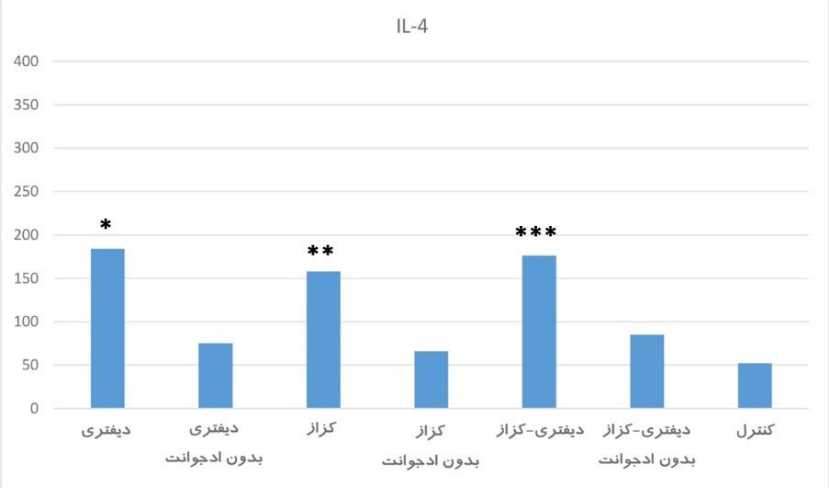
متعاقب تجویز واکسن های تک ظرفیتی و دو ظرفیتی دیفتری و کزاز که همراه با ادجوانت یا بدون حضور ادجوانت تجویز شده بودند، میزان سایتوکاین های IFN-ɣ و IL-4 ترشح شده از سلول های طحالی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. برطبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، در مورد واکسن های با ادجوانت دیفتری مونو والان، کزاز مونو والان و واکسن دوگانه دیفتری و کزاز در مقایسه با مدل بدون ادجوانت و نیز گروه کنترل، میزان IFN-ɣ به مقدار ناچیزی افزایش داشته است که این افزایش معنی دار نیست ($p>0.05$) (نمودار شماره ۱). میزان IL-4 در مورد واکسن های با ادجوانت دیفتری مونو والان، کزاز مونو والان و واکسن دوگانه دیفتری و کزاز در مقایسه با مدل بدون ادجوانت به صورت معنی داری افزایش نشان داده است($p<0.05$) (نمودار شماره ۲).

بحث

در داخل کشور تا کنون مطالعه ای که پاسخ های ایمنی سلولی متعاقب تجویز واکسن دوگانه دیفتری - کزاز خردسالان را در برگیرد انجام نشده است و اکثر مطالعات انجام شده در این زمینه مربوط به ارزیابی ایمنی هومورال و میزان آنتی بادی تولید شده به دنبال تزریق واکسن‌ها بوده است. البته در خارج از کشور مطالعات زیادی در زمینه های مختلف در رابطه با ایمنی زایی واکسن دیفتری و کزاز صورت گرفته است که بیشتر مطالعات در زمینه بررسی عوارض جانبی واکسن ها (موضعی و سیستمیک)، بررسی زمان مناسب جهت تزریق دوزهای یادآور و نیز ضرورت ایمن سازی با واکسن در بالغین و سالمندان بوده است. همچنین مطالعات گسترده ای در مورد استفاده از ادجوانت های مختلف در واکسن و نقش آن‌ها در تحریک بیشتر سیستم ایمنی صورت گرفته است. مطالعات قبلی که در زمینه بررسی پاسخ های ایمنی صورت گرفته اند، توصیه کرده اند که بهترین الگو برای سنجش پاسخ های ایمنی، بررسی پروفایل سایتوکاینی مرتبط با Th1/Th2 می باشد که در این مورد ساده ترین روش اندازه گیری سایتوکاین های IL-4 (به عنوان یکی از سایتوکاین های تولید شده Th2) و IFN-ɣ (به عنوان یکی از سایتوکاین های تولید شده از Th1) می باشد. در این مورد توصیه شده که سایتوکاین های فوق به صورت اختصاصی برعلیه آنتی ژن های مورد استفاده بررسی شوند که به همین منظور از تحریک سلول های طحالی در مجاورت آنتی ژن های مورد نظر استفاده شده است. لازم به ذکر است که اندازه گیری سایتوکاین های موجود در سرم به صورت غیراختصاصی می باشد و نمی تواند به عنوان شاهد معتبری برای کارکرد ایمنولوژیک آنتی ژن محسوب شود (۱۶–۱۸). در ارتباط با پاسخ ایمنی سلولی، مطالعات قبلی نشان داده اند که واکسن های حاوی ادجوانت آلوم با تحریک ترشح IL-4 و فعال کردن سلول های Th2 پاسخ ایمنی هومورال را تحریک می کنند. البته در مطالعات اخیر نشان داده شده که تحریک هم‌زمان هردو بازوی سیستم ایمنی در اثرگذاری بهتر واکسن مؤثر است. در ارتباط با بررسی پاسخ های ایمنی سلولی پس از تجویز واکسن دیفتری و کزاز در ایران مطالعه ای صورت نگرفته و در خارج از کشور نیز در ارتباط با پاسخ ایمنی سلولی علیه واکسن دیفتری مطالعه ای یافت نشد و در ارتباط با واکسن کزاز نیز مطالعات بسیار کمی صورت گرفته است. Ibrahim و همکاران پروفایل سایتوکاینیTh2/Th1 در رت های



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان اینترفرون گامای تولید شده (برمبنای پیکو گرم/ میلی لیتر) از سلول های طحال حیوانات تحت مطالعه متعاقب تجویز واکسن ها * میزان اختلاف سایتوکاین IFN-Y در بین تمامی گروه های دارای ادجوانت در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بوده است



نمودار شماره ۲: مقایسه میزان IL-4 تولید شده (برمبنای پیکو گرم/ میلی لیتر) از سلول های طحال حیوانات تحت مطالعه متعاقب تجویز واکسن ها* دارای اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه دیفتری بدون ادجوانت ** دارای اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کزاز بدون ادجوانت *** دارای اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه دوگانه دیفتری-کزاز بدون ادجوانت

ندارد (۱۹). Cooper و همکاران پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی پس از واکسیناسیون انسان با واکسن کزاز را مورد بررسی قرار دادند نتایج مطالعه نشان داد میزان ایمن شده با واکسن کزاز را مورد بررسی قرار دادند. میزان IL-4 و IFN-γ در گروه واکسینه شده برابر با گروه کنترل (واکسینه نشده) بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی

IFN-ɣ قبل از واکسیناسیون با واکسن کزاز ۱۱۸ پیکوگرم/میلی لیتر(۳۳۵-۰) و ٦ ماه پس از واکسیناسیون با واکسن کزاز ۵۲۹ پیکوگرم/میلی لیتر(۸۷۲-۳۰۲) بود و میزان IL-4 قبل از واکسیناسیون با واکسن کزاز صفر(١٦/٦-۰) و ٦ ماه پس از واکسیناسیون با واکسن کزاز ١٤/٢ پیکوگرم/میلی لیتر(۳۳/۳-۰) بود که نتایج نشان دهنده پاسخ ایمنی سلولی قوی علیه واکسن کزاز بود(20) .میزان IL-4 در موش هایی که واکسن های با ادجوانت را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه بدون ادجوانت و نیز گروه کنترل، افزایش مشخصی را نشان داد. درحالی که این افزایش در مورد IFN-ɣ معنی دار نبوده است($p>0.05$). مطالعه حال حاضر برروی واکسن تجربی دوگانه دیفتری و کزاز نشان داد که واکسن فوق قابلیت تحریک پاسخ های ایمنی سلولی را دارد. نتایج بدست آمده نشان داد که شیب پاسخ های ایمنی به سمت پاسخ های ایمنی هومورال و زیررده Th2، بیشتر از نوع سلولی و زیررده Th1 بوده است. علت این امر می تواند به ماهیت آنتی ژن، نحوه فرمولاسیون واکسن و درصد جذب آنتی ژن در ژل آلوم مرتبط باشد که در نهایت بر روی پاسخ ایمنی و گرایش آن به سمت بازوی هومورال تأثیر خواهد گذاشت.

فهرست منابع

1- WHO. Vaccine preventable deaths and the Global Immunization Vision and Strategy, 2006-2015. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2006;55(18):511.
2- Nazari F, Mirchamsy H, Alé-Agha S, Mahinpour M. A model for developing countries of mass serological survey of children vaccinated against diphtheria and tetanus. J biol Stand. 1976;4:329-33.
3- Di Pasquale A, Wolter J, Schuerman L. Management of pertussis in adolescents and adults: the role of a reduced-antigen content combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis (dTpa) vaccine. Journal of preventive medicine and hygiene. 2005;46(1):33-41.
4- Kitchin NR. Review of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines in clinical development. Expert review of vaccines. 2011;10(5):605-15.
5- Luo P, Qin L, Mao X, Chen L, Yu S, Li Q, et al. Identification of a novel linear epitope in tetanus toxin recognized by a protective monoclonal antibody: Implications for vaccine design. Vaccine. 2012;30(45):6449-55.
6- Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C .Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences. 1999;354(1381):259-68.
7- Holmes RK. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. Journal of Infectious Diseases. 2000;181(Supplement_1):S156-S67.
8- Embree J, Law B, Voloshen T, Tomovici A. Immunogenicity, safety, and antibody persistence at 3, 5, and 10 years postvaccination in adolescents randomized to booster immunization with a combined tetanus, diphtheria, 5-component acellular pertussis, and inactivated poliomyelitis vaccine administered with a hepatitis B virus vaccine concurrently or 1 month apart. Clin Vaccine Immunol. 2015;22(3):282-90.
9- WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report: World Health Organization; 2017.
10- WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-Third Report: World Health Organization; 2014.
11- WHO. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. World Health Organization; 2013.
12- Yamamoto A, Nagata N, Ochiai M, Kataoka M, Toyoizumi H, Okada K, et al. Enhanced sensitisation of mice with diphtheria tetanus

acellular pertussis vaccine to local swelling reaction to the booster immunisation. Vaccine. 2002;20(25-26):3088-94.
13- Silva GP, Cruz SdC, Cruz AC, Milagres LG. Short-term and long-term antibody response by mice after immunization against Neisseria meningitidis B or diphtheria toxoid. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2013;46(2):148-53.
14- Gupta R, Griffin JP, Rivera R, Siber G. Development of an animal model to assess the immunogenicity of single-dose tetanus and diphtheria vaccines based on controlled release from biodegradable polymer microspheres. Developments in biological standardization. 1998;92:277-87.
15- Ding Z, Van Riet E, Romeijn S, Kersten G, Jiskoot W, Bouwstra J. Immune modulation by adjuvants combined with diphtheria toxoid administered topically in BALB/c mice after microneedle array pretreatment. Pharmaceutical research. 2009; 26(7):1635-43.
16- Rowe J, Macaubas C, Monger T, Holt BJ, Harvey J, Poolman JT, Loh R, Sly PD, Holt PG. Heterogeneity in Diphtheria-Tetanus–Acellular Pertussis Vaccine–Specific Cellular Immunity during Infancy: Relationship to Variations in the Kinetics of Postnatal Maturation of Systemic Th1 Function. The Journal of Infectious Diseases. 2001; 184: 80-88.
17- Rowe J, Macaubas C, Monger TM, Holt BJ, Harvey J, Poolman JT, Sly PD, Holt PG. Antigen-specific responses to diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in human infants are initially Th2 polarized. 2000; 68: 3873-3877.
18- Holt PG, Rudin A, Macaubas C, Holt BJ, Rowe J, Loh R, Sly PD. Development of immunologic memory against tetanus toxoid and pertactin antigens from the diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in atopic versus nonatopic children. Journal of allergy and clinical immunology. 2000; 105: 1117-1122.
19- Ibrahim EH, Kilany M, Mostafa OM, Shaker KH, Alshehri M, Alsyaad KM, et al. TH1/TH2 chemokines/cytokines profile in rats treated with tetanus toxoid and Euphorbia tirucalli .Saudi journal of biological sciences. 2019;26(7):1716-23.
20- Cooper P, Espinel I, Paredes W, Guderian R, Nutman T. Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. The Journal of infectious diseases. 1998;178(4):1133-8.