

مقاله پژوهشی

اثرات ترکیب آلود و ملاتونین بر پاسخ‌های ایمنی در موش سفید آزمایشگاهی ایمن شده با سالمونلا تیفی موریوم کشته‌شده

زهرا جوادی، سید میثم ابطی فروشانی*، ملاح احمدی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: ملاتونین از جمله ترکیبات ایمونومودولاتور است. هدف این پژوهش، امکان‌سنجی بهبود پاسخ‌های ایمنی، به دنبال استفاده هم‌زمان از ملاتونین در واکسن ساخته‌شده از فرم کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم و آلود بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی شامل ۵۰ موش سفید آزمایشگاهی نر بود که به‌طور تصادفی در ۵ گروه مساوی قرار گرفتند. موش‌ها به ترتیب با باکتری کشته‌شده (10^6 CFU)، باکتری کشته‌شده در همراهی با ادجوانت آلود، باکتری کشته‌شده و ملاتونین (100 mg/kg)، باکتری کشته‌شده همراه با ملاتونین و ادجوانت آلود و یا PBS به‌صورت زیر جلدی، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند. نیمی از موش‌ها یک هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی مورد ارزیابی ایمونولوژیک قرار گرفتند. نیمی دیگر از موش‌ها به‌منظور ارزیابی اثرات حفاظتی واکسن با 10^7 CFU باکتری زنده به‌صورت داخل صفاقی چالش شدند.

نتایج: واکسن ترکیبی موجب بهبود منحنی بقاء هم‌زمان با افزایش معنی‌دار پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری و همچنین شاخص تکثیر لنفوسیتی به دنبال چالش با آنتی‌ژن باکتریایی در مقایسه با سایر گروه‌ها شد ($P < 0.05$). گروه دریافت‌کننده آلود نسبت گروه ملاتونین منجر به افزایش تیتراژ بیشتری در تست ویدال در ارتباط با آنتی‌ژن‌های O و H شد. البته باوجود افزایش تیتراژ آنتی‌بادی‌ها در تست ویدال گروه ترکیبی، تغییر یادشده نسبت به گروه آلود تغییر معنی‌داری نبود. نتیجه‌گیری: ترکیب ملاتونین و آلود موجب افزایش قابل‌توجه ایمنی‌زایی و اثرات حفاظتی واکسن کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم شده است.

کلمات کلیدی: سالمونلا تیفی موریوم، واکسن، ادجوانت، آلود، ملاتونین

مقدمه

عفونت از فردی به فرد دیگر را تسهیل می‌کند. سالمونلا تیفی موریوم اغلب به شکل عفونت‌های روده‌ای با علائمی از قبیل اسهال یا اسهال هموراژیک روی می‌دهد. علائم بیماری ناشی از این باکتری در مدل موش، علائم حصبه در انسان را تقلید می‌کند (۱).

در ایجاد ایمنی حفاظت‌کننده علیه سالمونلا تحریک هر دو جزء سیستم ایمنی اختصاصی هومورال و سلولار ضروری است (۲-۴). برخلاف واکسن‌های زنده ضعیف شده واکسن‌هایی که حاوی جسم سلولی باکتری کشته‌شده می‌باشند، سطح بالایی از ایمنی حفاظت‌کننده را ایجاد نموده و جهت کارایی بیشتر نیازمند همراهی در تجویز با ادجوانت‌ها هستند (۵). با این حال همیشه دسترسی به چنین امری ممکن نیست. ادجوانت‌ها

سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی و داخل سلولی اختیاری است که در جنس سالمونلا و خانواده انتروباکتریاسه قرار می‌گیرد. این باکتری عامل ایجادکننده عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای در انسان، دام و پرندگان است. انتشار این باکتری از حیوان به حیوان دیگر و استفاده از مواد غذایی دامی آلوده به سالمونلا توجیه‌کننده این مطلب است که حیوانات به‌عنوان مخزن باکتری می‌باشند. عفونت‌های سالمونلا به‌راحتی با مصرف غذا یا آب آلوده تهیه‌شده توسط فرد آلوده به انسان منتقل می‌شوند و دارای دوز عفونی پایینی هستند که این عامل انتشار

*نویسنده مسئول: سید میثم ابطی فروشانی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir
<https://orcid.org/0000-0003-2579-6618>



(۹) تولید می‌شود. در گذشته به‌خوبی نشان داده‌شده است که ملاتونین علیه بسیاری از بیماری‌های عفونی دارای اثرات محافظت بخش و تقویت‌کننده ایمنی است، به‌طور مثال نشان داده‌شده است که افزودن ملاتونین به محیط کشت منوسیت‌ها موجب افزایش قابلیت دفاعی این سلول‌ها در مقابله با باکتری مایکوباکتریوم شده به‌طوری‌که این سلول‌ها توان بیشتری در تحریک پاسخ‌های Th1 شده است. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که در زمان زمستان و آغاز بهار میزان دریافت نور نسبت به سایر اوقات سال کمتر است و میزان عفونت مایکوباکتریومی نیز افزایش می‌یابد (۹-۱۱). بنابراین به‌خوبی مشخص است که تغییرات جوی و فصلی در درازمدت ممکن است بر روی قابلیت‌های پاسخ‌دهی سیستم ایمنی از طریق تغییر سطح ملاتونین مؤثر باشد. به‌عنوان یک شاهد دیگر در مورد اهمیت ملاتونین در دفاع ضد باکتریایی می‌توان به افزایش $IFN-\gamma$ (سایتوکاین اصلی Th1) در حیوانات مبتلا به کلامیدیا و دریافت‌کننده ملاتونین اشاره کرد (۱۰). بر اساس نتایج مطالعات گذشته سطح خونی ملاتونین در افراد مسلول نسبت به افراد سالم به‌مراتب پایین‌تر است (۱۲). بنابراین ممکن است که افزودن ماده ملاتونین به ادجوانت آلوم به‌عنوان یک راهکار مناسب جهت تقویت پاسخ‌های ادجوانتی آلوم به‌خصوص در جهت تولید واکنش‌های کارآمد برای عفونت‌های داخل سلولی یا آنتی‌ژن توموری منجر گردد. باین‌حال تاکنون در مورد خاصیت ادجوانتی ملاتونین تحقیق مناسبی صورت نگرفته است.

با توجه به مطالب فوق این پژوهش در راستای طراحی و ارزیابی واکنش سالمونلوز در همراهی با ترکیب ادجوانت آلوم-ملاتونین در جهت تحریک هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هومورال علیه سالمونلا تیفی موریوم و دست یافتن به واکنشی مؤثر علیه عفونت‌های سالمونلا انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه، شامل ۵۰ سر موش سفید آزمایشگاهی نژاد NMRI با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته بود که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. پس از طی زمان مورد نیاز جهت تطابق (۱ هفته)، از موش‌های خریداری جهت انجام سه سری آزمایش‌های مجزا استفاده خواهد شد. ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس دستورالعمل وزارت بهداشت،

ترکیباتی هستند که به‌منظور تحریک بهتر سیستم ایمنی در جهت ایجاد پاسخ‌های مؤثرتر در برابر آنتی‌ژن‌های کشته‌شده، استفاده می‌شوند. ادجوانت آلوم تنها ادجوانتی است که توسط اداره کل غذا و داروی آمریکا اجازه استفاده در همراهی با واکسن-های انسانی را دارد. متأسفانه ادجوانت آلوم در ایجاد پاسخ‌های ایمنی به‌عنوان ادجوانت ضعیفی عمل می‌کند و تنها قادر به تقویت پاسخ‌های ایمنی هومورال است (۱) و به‌طور مثال در برانگیختن پاسخ ایمنی سلولی وابسته به Th1 که برای کنترل پاتوژن‌های داخل سلولی از قبیل سالمونلا ضروری بوده ناتوان است (۲). بنابراین مطالعه بر روی طراحی یک واکنش مؤثر برای پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری در مدل موش می‌تواند راهگشای طراحی یک واکنش موفق جهت پیشگیری و کنترل بیماری تیفوئید در انسان باشد.

ایمنی و بی‌خطر بودن یکی از پارامترهای موردنظر برای انتخاب ادجوانت مناسب به‌ویژه برای واکنش‌های انسانی است. شمار زیادی از ادجوانت‌ها برای مدل‌های حیوانی استفاده شده‌اند، گرچه بیشتر آن‌ها به خاطر سمیتی که دارند برای انسان غیرقابل استفاده هستند (۳).

تحقیقات نشان داده است که سیستم عصبی دارای ارتباط تنگاتنگی با سیستم ایمنی است و محیطی که توسط واسطه-گرهای عصبی فراهم می‌شود نقش مهمی در جهت‌گیری پاسخ-های ایمنی به سمت پاسخ‌های ایمنی سلولی (Th1) یا هومورال (Th2) دارد (۴). ملاتونین (ان استیل ۵ متوکسی تریپتامین)^۱ یک ترکیب ایندول آمینی بوده که به‌طور گسترده‌ای در انواع اشکال حیات از قبیل باکتری‌ها، یوکاریوت‌های تک‌سلولی، بی‌مهرگان، مهره‌داران، جلبک‌ها، گیاهان، قارچ‌ها و حتی مواد غذایی مورد استفاده حیوانات یافت می‌شود (۵). در پستانداران، ملاتونین یک ترکیب ترشحی به‌وسیله غده پینه آل است که از کشف آن حدود ۴۰ سال می‌گذرد و در تنظیم برخی از اعمال فیزیولوژیک و پاتولوژیک شرکت می‌کند (۶). در برخی از آزمایش‌ها نشان داده‌شده که ملاتونین علاوه بر خاصیت هورمونی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن از خود بروز می‌دهد (۷). تحقیقات متعددی نشان می‌دهد که ملاتونین یک تعدیل‌کننده ایمنی^۲ است که نه‌تنها از غده پینه آل بلکه به‌وسیله شبکه، روده و سلول‌های کارآمد ایمنی یعنی سلول‌های مغز استخوان (۸) و لنفوسیت‌ها

² Immunomodulator

¹ Melatonin(N-acetyl-5-methoxy tryptamine)

الف) ارزیابی واکنش‌های ازدیاد حساسیت تأخیری: دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی مقدار 10^5 باکتری کشته‌شده به کف پای چپ ۵ موش از هر گروه تزریق شد. سپس میزان واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری از این رابطه سنجیده شد:

$$\text{مقدار تورم پای راست} - \text{مقدار تورم پای چپ} = \text{شاخص واکنش ایمنی سلولی}$$

مقدار تورم پای راست

ب) **ارزیابی ایمنی هومورال:** بعد از سنجش ایمنی سلولی از موش‌ها خون‌گیری شده و تیترا آنتی‌بادی به شیوه سرو-آگلوتیناسیون (تست ویدال) سنجیده شد.

ج) **ارزیابی شاخص تکثیر لنفوسیتی:** هم‌زمان طحال موش‌ها در شرایط استریل خارج شده و میزان تکثیر لنفوسیتی در پاسخ به آنتی‌ژن باکتریایی به شیوه MTT سنجیده خواهد شد (۱۲). به‌طور خلاصه ۲ هفته بعد از آغاز درمان اقدام به نخاعی کردن موش‌ها شد. طحال موش‌ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه‌قطعه شدن در ۵ml محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma - آمریکا) حاوی ۱۰٪ FBS (شرکت Gibco - آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر عبور داده شد. سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰g پس از سانتریفیوژ شدند. سپس به‌منظور حذف RBCها، بر روی رسوب سلولی به‌دست‌آمده ۵ml بافر لیز کننده افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ml محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در ۲۰۰g بار دیگر سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS به حالت سوسپانسیون درآورده شد. به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسونی حاوی $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ تهیه شد و $100 \mu\text{l}$ از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور پیکره کشته‌شده ($4 \times 10^4 / 5$ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر) و سه تکرار بدون حضور باکتری شده انجام شد. به‌عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 به هر چاهک $25 \mu\text{l}$ محلول MTT (۵ mg/ml در PBS) افزوده‌شده، به مدت ۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری گردید. در این مدت احیاء ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت

درمان و آموزش پزشکی جمهوری اسلامی ایران صورت گرفت. کلیه مراحل تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه با کد ۴۳۶/ت.د.ت/۳ مورد تأیید قرار گرفت.

گروه‌بندی: موش‌ها به‌طور تصادفی در ۵ گروه به‌صورت زیر قرار گرفتند:

گروه باکتری کشته: شامل ۱۰ سر موش بود که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۱۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه باکتری کشته + آلوم: شامل ۱۰ سر موش است که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در همراهی با ادجوانت آلوم در حجم ۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه باکتری کشته + ملاتونین: شامل ۱۰ سر موش است که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در همراهی با ملاتونین (100 mg/kg) در حجم ۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه باکتری کشته + آلوم + ملاتونین (گروه ترکیبی): شامل ۱۰ سر موش است که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۵۰ میکرولیتر در همراهی با ملاتونین (100 mg/kg) در حجم ۵۰ میکرولیتر و ادجوانت آلوم در حجم ۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه PBS (سالن): شامل ۱۰ سر موش است که دو بار به فاصله دو هفته هر بار ۱۵۰ میکرولیتر PBS^3 به‌صورت زیر جلدی دریافت کردند.

تهیه باکتری کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم: پس از تهیه سوش استاندارد باکتری (ATCC 14028) در محیط بلاد آگار به مدت یک‌شب کشت داده شد. کلنی‌های باکتری برداشت‌شده و پس از ۳ بار شستشو در PBS، در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. بعد از طی این مرحله مرگ باکتری‌ها به‌وسیله کشت آن‌ها در محیط بلاد آگار اثبات شد. آنگاه تعداد باکتری‌ها در نهایت به شیوه نفلومتری مک فارلند در طول موج ۵۹۰ سنجیده شد و سوسپانسون موردنظر تهیه شد.

ارزیابی‌های ایمونولوژیک: این ارزیابی بر روی ۵ موش از هر گروه انجام شد.

³Phosphate-buffered saline

استفاده شد. سایر منحنی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft office ویراست ۲۰۱۶ رسم شد. سطح $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

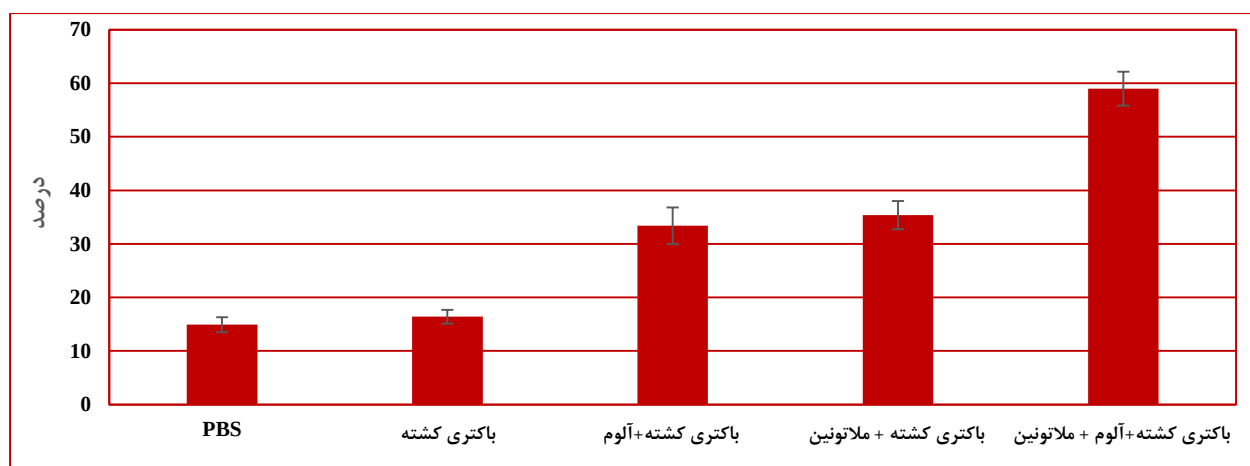
ارزیابی میزان بقاء موش‌های واکسینه پس از چالش با سویه زنده سالمونلاتیفی موریوم: همان‌طور که انتظار می‌رفت، میزان تلفات در موش‌هایی که واکسن دریافت نکرده بودند، پس از چالش با سویه زنده سالمونلاتیفی موریوم به صورت قابل توجهی بالا بود به طوری در ظرف یک هفته کلیه این موش‌ها تلف شدند (نمودار ۱). میزان تلفات در گروه دریافت کننده واکسن به صورت باکتری کشته شده نیز بالا بود، به طوری که کلیه حیوانات این گروه نیز تا روز دوازدهم

محلول در آمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ nm تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید.

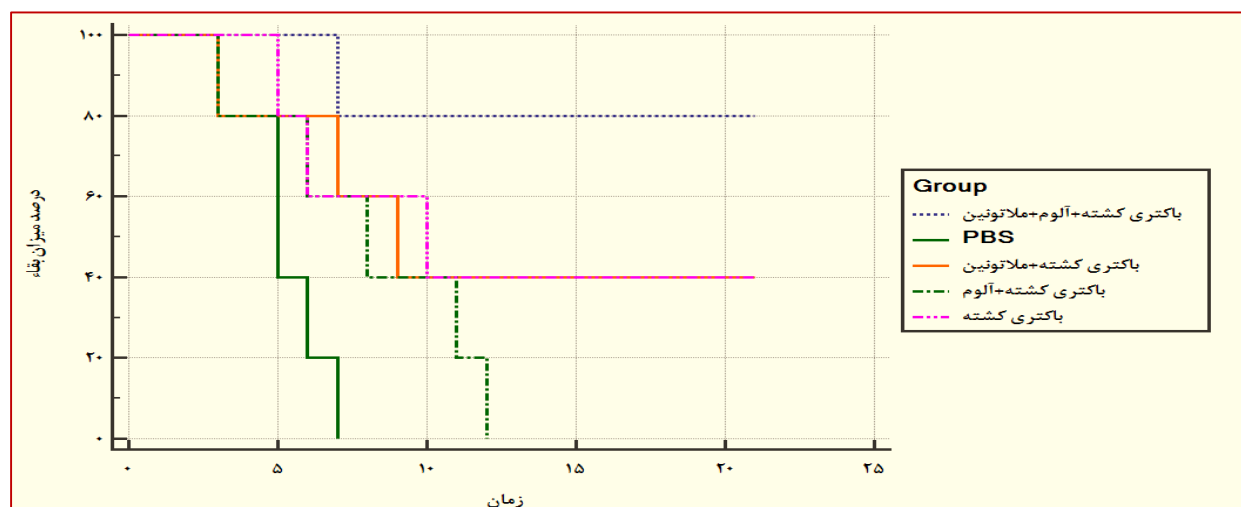
$$\text{اندکس تحریک} = \frac{\text{بلانک OD} - \text{OD باکتری}}{\text{OD در عدم حضور باکتری OD}}$$

تعیین میزان حفاظت بخشی موش‌ها: این ارزیابی بر روی ۵ موش از هر گروه انجام شد. به این منظور دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی، 10^7 CFU باکتری زنده به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. موش‌ها به مدت ۳ هفته نگاهداری شده و تلفات آن‌ها ثبت گشت.

روش آماری: جهت رسم منحنی زنده‌مانی از نرم‌افزار Medcalc ویراست ۱۵ و آزمون آماری kaplan-Meier استفاده شد. جهت مقایسه سایر داده‌ها از آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه one-way-anova و تست tukey در نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۱



نمودار ۱- ارزیابی شدت واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.001$ است.



شکل ۱- ارزیابی میزان بقاء موش‌های واکسینه پس از چالش با سویه زنده سالمونلاتیفی موریوم.

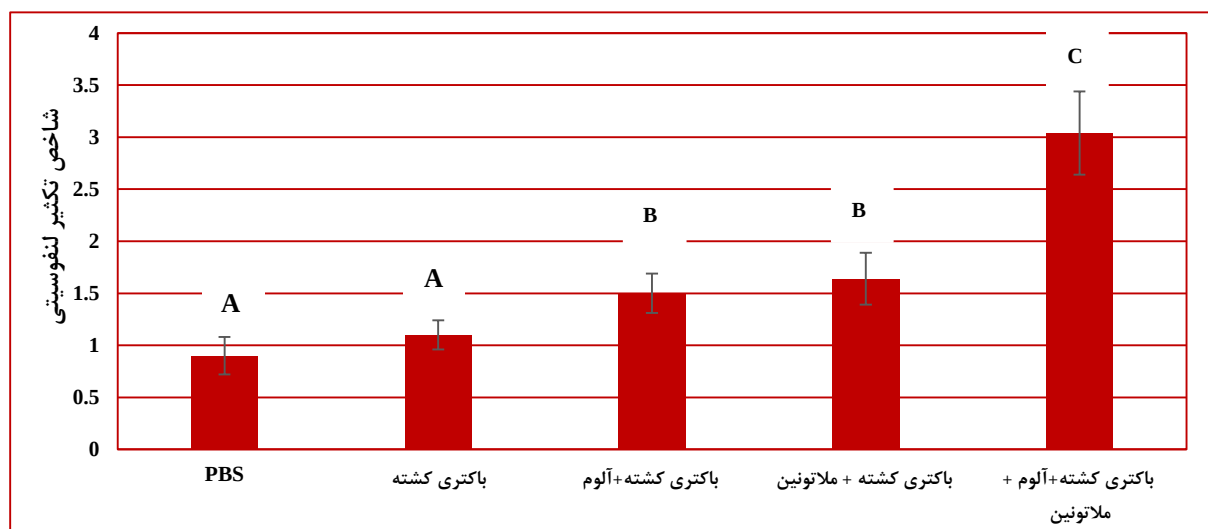
پس از چالش تلف شده بودند (شکل ۱). به نظر نمی‌رسد که بین میزان بقاء دوگروهی که ترکیب ملاتونین و باکتری کشته شده یا آلوم و باکتری کشته شده را دریافت نمودند اختلاف معناداری وجود داشته باشد. میزان بقاء این در پایان دوره چالش ۲۱ روزه ۲۰٪ بود (نمودار ۱). بر اساس نتایج مشخص است که میزان بقاء موش‌هایی که دریافت کننده واکسن ترکیبی بودند، به طور قابل توجهی نسبت به سایر گروه‌ها بهبود معنی‌داری یافته است، به طوری که تنها در این گروه، شاهد یک مورد تلفات در روز ۷ بودیم و بدین ترتیب میزان بقا در پایان دوره چالش ۲۱ روزه ۸۰٪ بود (شکل ۱).

ارزیابی واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری: دریافت باکتری کشته شده به تنهایی توسط موش‌ها موجب افزایش مختصری در شدت واکنش DTH نسبت به گروه دریافت کننده PBS به تنهایی شد. هر چند که تغییر یاد شده از نظر آماری معنادار نبود (نمودار ۱). واکنش DTH در دو گروه دریافت کننده ترکیب آلوم و باکتری کشته شده یا ملاتونین و باکتری کشته شده به ترتیب به میزان ۲/۴ و ۲/۳ به طور معناداری نسبت به گروه دریافت کننده PBS افزایش یافت. با این حال بیشترین افزایش مربوط به گروه دریافت کننده واکسن ترکیبی به میزان متوسط ۴ برابر افزایش

جدول ۱- ارزیابی میزان تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های O و H در گروه‌های واکسینه

تیتر آنتی‌بادی گروه	آنتی‌ژن O	آنتی‌ژن H
PBS	$25/6 \pm 8/76^A$	$51/2 \pm 17/52^B$
باکتری کشته شده	$89/6 \pm 35/05^B$	$153/6 \pm 35/24^B$
باکتری کشته شده + آلوم	$307/2 \pm 114/48^C$	$409/6 \pm 140/21^B$
باکتری کشته شده + ملاتونین	$204/8 \pm 70/1^D$	$307/2 \pm 114/48^C$
باکتری کشته شده + آلوم + ملاتونین	$614/4 \pm 168/97^E$	$819/2 \pm 280/43^D$

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ است.



نمودار ۲- ارزیابی شدت تکثیر لئوسیتی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.01$ است.

یافت (نمودار ۱).

ارزیابی تیتر آنتی‌بادی:

تیتر آنتی‌بادی در این پایان نامه به شیوه سروآگلوتیناسیون

ارزیابی‌های ایمنولوژیک واکسن:

این ارزیابی‌ها بر روی ۵ موش هر گروه پس از دریافت ۲ بار

واکسن انجام شد.

واکسن ترکیبی قابلیت تکثیر لنفوسیت‌ها به نحو قابل توجهی افزایش یافت. به‌طوری‌که نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS افزایش ۳/۴ برابری نشان داد که حاکی از گسترش قابل توجه لنفوسیت‌های اجرایی در این گروه است (نمودار ۲).

بحث

بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که با توجه به ماهیت درون سلولی سالمونلاها، استفاده از ملاتونین به‌عنوان یکی از معروف‌ترین ترکیبات نرواندوکراین در همراهی با ادجوانت آلوم، موجب افزایش قابل توجه ایمنی‌زایی و اثرات حفاظتی واکسن کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم شده است. تأثیر عوامل مؤثر بر مسیرهای نوراندوکراین در جهت‌گیری پاسخ‌های ایمنی، در برخی از مطالعات گذشته نشان داده‌شده است. به‌طور مثال در مطالعه‌ای که توسط حسینی جزنی و همکاران صورت گرفت اثر ترکیب آلوم-نالوکسان (آنت آگونیست اپیوئیدی) به‌عنوان ادجوانت در تحریک مؤثر پاسخ ایمنی سلولار و هومورال در پاسخ به سالمونلا تیفی موریوم نشان داده‌شده است. بر این اساس ترکیب آلوم-نالوکسان منجر به تقویت تکثیر پاسخ اختصاصی لنفوسیت‌ها به همراه پلاریزه کرده پاسخ‌ها به سمت Th1 و افزایش تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی سالمونلا شده است (۲). همچنین در مطالعه دیگری اثر ترکیب آلوم-پروپرانول (یک آنتاگونیست گیرنده بتا-آدرنرژیک) به‌عنوان ادجوانت جدید در تحریک پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به جسم سلولی کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم (HKST) به‌عنوان یک مدل واکسن بررسی شده است (۴). سمیه حسینی و همکاران، از مخلوط آلوم-ICI 118,551 به‌عنوان ادجوانت در القاء پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار نسبت به جسم سلولی کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم به‌عنوان واکسن استفاده کردند و نتایج مثبتی گرفتند (۱۳). در هر دو مورد گروه ترکیبی پاسخ‌های ایمنی بهتری را بلاخص از نظر ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و اثرات محافظت بخش به دنبال چالش با شکل زنده باکتری نشان داده‌شده است (۴ و ۱۰).

ماهیت چربی‌دوست ملاتونین این امکان را به هورمون می‌دهد که وارد بسیاری از سلول‌ها و غلظت بالایی را در موضع ایجاد کند. این هورمون همچنین توانایی عبور از سد‌های فیزیولوژیکی را دارد (۱۴). در رابطه با نقش ملاتونین در سیستم ایمنی بدن این نکته حائز اهمیت است که در برخی شرایط مثل برداشتن

ویدال برای آنتی‌ژن‌های O و H به‌صورت مجزا سنجیده شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت کمترین میزان تیتراژ آنتی‌بادی برای هر دو آنتی‌ژن O و H مربوط به گروه دریافت‌کننده PBS بود. تیتراژ آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن O در گروه دریافت‌کننده باکتری کشته‌شده افزایش معناداری را نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS نشان داد. باین‌حال افزایش تیتراژ آنتی‌ژن H در این گروه نسبت به گروه شاهد معنادار نبود (جدول ۱).

هر دو تیتراژ مربوط به آنتی‌ژن‌های O و H در دو گروه دریافت‌کننده آلوم و باکتری کشته‌شده یا ملاتونین و باکتری کشته‌شده نسبت به گروه شاهد و یا گروه دریافت‌کننده باکتری کشته‌شده افزایش معناداری یافت (جدول ۱). باین‌حال تیتراژ آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن O در گروه باکتری کشته‌شده و آلوم از گروه ملاتونین و باکتری کشته‌شده بیشتر بود (جدول ۱). بیشترین میزان تغییر آنتی‌بادی که نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معناداری در مورد آنتی‌ژن‌های O و H افزایش‌یافته بود، مربوط به گروه دریافت‌کننده واکسن ترکیبی بود به‌طوری‌که تیتراژ آنتی‌بادی O به میزان ۲۸٪ و تیتراژ آنتی‌بادی در رابطه با آنتی‌ژن H به میزان ۴۵٪ نسبت به گروهی که تنها واکسن کشته‌شده را دریافت نموده بود افزایش یافت (جدول ۱). ارزیابی میزان تکثیر لنفوسیتی:

تست احیاء MTT که در این مطالعه از آن استفاده شد به‌عنوان شاخص قابلیت تکثیر لنفوسیت‌ها کاربرد دارد. ماده MTT پس از برداشت توسط لنفوسیت‌ها در اثر فعالیت میتوکندریایی تبدیل به کریستال‌های آبی‌رنگ فورمازون می‌شود که با افزودن DMSO کریستال‌ها حل‌شده و توسط اسپکتوفتومتر سنجیده می‌شود. طبیعی است که پس از گذشت ۷۲ ساعت هرچقدر تعداد سلول‌های تکثیر یافته بیشتر باشد؛ میزان تبدیل MTT به فورمازون نیز بیشتر خواهد بود. براین اساس کمترین میزان پاسخ تکثیر لنفوسیت‌ها در گروه دریافت‌کننده PBS مشاهده شد (نمودار ۲). دریافت باکتری کشته‌شده در موش‌ها توانست به میزان محدودی تکثیر لنفوسیتی را نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS افزایش دهد، هرچند که تغییر یادشده معنادار نبود (نمودار ۲). دو گروه دریافت‌کننده آلوم و باکتری کشته‌شده یا ملاتونین و باکتری کشته‌شده افزایش تکثیر لنفوسیتی به ترتیب در حدود ۱/۷ و ۱/۸ برابری نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS نشان دادند که تغییرات یادشده نسبت به هر دو گروه دریافت‌کننده PBS یا باکتری کشته‌شده معنادار بود (نمودار ۲). در گروه دریافت‌کننده

ملاتونین باعث تحریک تولید اینترفرون گاما توسط لنفوسیت‌های Th1 می‌شود (۲۳، ۲۴).

در منابع مختلف ذکر شده است که تجویز ملاتونین فعالیت غدد لنفاوی، طحال و سلول‌های مغز استخوان (۲۱، ۲۲) و عملکرد ایمنی ذاتی و اکتسابی را افزایش می‌دهد (۲۳، ۲۴). در همین راستا نشان داده شده است که ملاتونین باعث بازگرداندن فعالیت سلول‌های T کمکی معیوب در موش‌هایی که سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب شده بود شده است (۱۷). نقش تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی و آنتی‌آپوپتوزی ملاتونین عمدتاً با اثراتی که روی تیموس، T سل، NK سل، منوسیت و لکوسیت‌های ائوزینوفیل دارد مشخص می‌شود (۸). به نحو جالب توجهی نشان داده شده است که تجویز ملاتونین اگزوزنوس باعث تزاید لنفوسیت‌های T و افزایش ارائه آنتی‌ژن توسط ماکروفاژها برای سلول‌های T کمکی به وسیله افزایش بیان مولکول‌های MHCII می‌شود (۲۵). افزودن ملاتونین به رژیم غذایی موش‌ها منجر به افزایش تعداد کلی لنفوسیت‌های خون همراه با افزایش قابلیت تکثیری آن‌ها در پاسخ به میتوزن شده است (۲۶). در همین راستا افزایش قابل توجه شدت تکثیر اختصاصی به سالمونلا را ما در گروه دریافت‌کننده آلود و ملاتونین مشاهده نمودیم.

بر اساس مهم‌ترین نتیجه‌ای که در این تحقیق به دست آمده به نظر می‌رسد که ترکیب ملاتونین با آلود منجر به تقویت قابلیت‌های آلود به‌ویژه در ایجاد پاسخ‌های مناسب‌تر سلولی گردد. گرچه آلود تنها ادجوانت مجاز برای استفاده در واکنش‌های انسانی است و امروزه در بسیاری از واکنش‌ها به‌طور وسیع و موفقیت‌آمیزی استفاده شده است اما مهم‌ترین محدودیت ادجوانت آلود عدم توانایی آن در ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی است و باعث شیف‌ت پاسخ ایمنی به سمت Th2 و تقویت ایمنی هومورال می‌گردد، بنابراین ادجوانت مناسبی برای تحریک سیستم ایمنی علیه پاتوژن‌هایی که ایمنی مؤثر علیه آن‌ها پاسخ‌های Th1 و ایمنی سلولی است نیست (۲۷).

طبیعی است که دفاع مؤثر و کارآمد علیه یک باکتری داخل سلولی از قبیل سالمونلا نیازمند همکاری مؤثر سلول‌های Th1 و ماکروفاژها و دندریتیک است. نتایج منحنی بقاء به‌خوبی نشان داد که پس از دو بار دریافت واکنس کشته‌شده سالمونلاتیفی موریوم در همراهی با ترکیب ادجوانت آلود و ملاتونین منجر به بقاء مؤثرتر حیوانات به میزان ۸۰٪ پس از چالش با باکتری زنده سالمونلاتیفی موریوم می‌شود. ارزیابی‌های ایمونولوژیک نیز در این

غده پینه آل، مهار تولید و ترشح ملاتونین در شرایطی مثل قطع عصب رسانی غده و یا قرارگیری در روشنایی مداوم، باعث سرکوب ایمنی در دو بخش سلولی و هومورال می‌شود (۱۷-۱۵). در زمینه استفاده از ملاتونین به‌عنوان ادجوانت در ساخت واکنس تجربیات خاصی وجود ندارد. با این حال در مطالعات پیشین نشان داده شده است که تجویز زیرپوستی ملاتونین به حیوانات واکنسینه شده علیه عامل گندیدگی سم موجبات افزایش تیر اختصاصی آنتی‌بادی علیه باکتری *Dichelobacter nodosus* شده است (۱۰). همچنین افزایش موفقیت واکنسیناسیون علیه انگل شیس‌توزوما مانسونی به دنبال تجویز چندروزه ملاتونین پس از تزریق واکنس ساخته‌شده با آنتی‌ژن‌های انگلی در هامستر گزارش شده است (۱۰ و ۱۱).

در گذشته نشان داده شده است که تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی توسط ملاتونین ارتباط تنگاتنگی با آزاد شدن IL-2 دارد. چراکه جلوگیری از سنتز ملاتونین باعث کاهش در تولید و بیان گیرنده‌ی IL-2 است که با تجویز ملاتونین هم تولید IL-2 و هم بیان IL-2R افزایش می‌یابد. این یافته‌ها نشان می‌دهند علاوه بر غده‌ی پینه آل، سلول‌های لنفوفیدی یکی دیگر از منابع مهم تولید ملاتونین هستند و این ملاتونین می‌تواند در تنظیم سیستم ایمنی دخالت داشته باشد (۱۸، ۱۹). در همین راستا نتایج ما نیز به‌خوبی نشان دادند که استفاده از ملاتونین در زمان شکل‌گیری پاسخ‌های ایمنی، توانسته است که منجر به پاسخ‌های ایمنی سلولی قوی‌تری و ایجاد ازدیاد حساسیت تأخیری بیشتری گردد. در پاسخ‌های ایمنی سلولی علیه باکتری‌های داخل سلولی، در پاسخ به شناسایی میکروب درون سلولی، ماکروفاژها اقدام به تولید IL-12 می‌نمایند. در این شرایط لنفوسیت‌های Th از طریق تولید اینترفرون گاما موجب تقویت سازوکاری ضد میکروبی ماکروفاژها می‌گردند که نمود آن را می‌توان در پاسخ‌های ازدیاد حساسیت تأخیری یافت (۲۰). به‌خوبی نشان داده شده است که ملاتونین موجب تحریک تولید IL2 از لنفوسیت‌های T هم‌زمان با تحریک تولید IL12 از سلول‌های دندریتیک می‌گردد. در همین راستا پیشنهاد شده که افزودن ملاتونین به‌صورت یک مکمل ممکن است که موجب پیشبرد تولید IL2 و IL12 و در نهایت تقویت پاسخ‌های Th1 شود (۲۱). همچنین ثابت شده است که ملاتونین موجب کاهش تولید سایتوکاین ضدالتهابی IL10 هم‌زمان با کاهش تولید IL4 (سایتوکاین پلاریزه‌کننده Th2) در محیط کشت می‌گردد (۲۲). به‌علاوه، در رابطه با پاسخ‌های سایتوکاینی،

جهت تولید پاسخ‌های Th1 از طریق تقویت بروز مولکول‌های کمک تحریکی مولکول‌های MHC و به‌خصوص سایتوکاین پیش التهابی IL12 در زمان عرضه آنتی‌ژن است (۲۸).

نتیجه‌گیری

از مجموعه مطالب فوق و همچنین نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق اهمیت ملاتونین در تقویت پاسخ ایمنی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی مشخص به نظر می‌رسد؛ بنابراین ممکن است که افزودن ماده ملاتونین به ادجوانت آلوم به‌عنوان یک راهکار مناسب جهت تقویت پاسخ‌های ادجوانتی آلوم به‌خصوص در جهت تولید واکنش‌های کارآمد برای عفونت‌های داخل سلولی یا آنتی‌ژن توموری منجر گردد. به‌رحال در مطالعه حاضر یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده مطالعات بیشتری با استفاده از آنتی‌ژن‌های دیگر نیز صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم زهرا جوادی در مقطع کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی (به شماره پایان‌نامه ۴۳۶/ت.د.۳) دانشگاه ارومیه بوده که با حمایت مادی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه بوده انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

شرایط نشان داد که حیواناتی که واکنش ترکیبی دریافت نمودند به‌طور قابل‌توجهی افزایش سطح آنتی‌بادی، پاسخ‌های ازدیاد حساسیت تأخیری (که نمودی از عملکرد لنفوسیت‌های Th1 و ماکروفاژها است) و پاسخ‌های بلاستوژنیک لنفوسیت‌های T به میتوز را نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از ملاتونین به‌عنوان یک ادجوانت تقریباً به‌اندازه ادجوانت استاندارد و تأییدشده آلوم توانسته است که موجب افزایش بقاء موش‌ها پس از چالش با باکتری زنده *سالمونلاتیفی* موریوم شود. مؤلفه‌های ایمونولوژیک از قبیل شدت پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری، تیترا آنتی‌بادی، قابلیت پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها و تولید آنتی‌بادی نیز تقریباً بین دو گروه دریافت‌کننده آلوم و ملاتونین به‌عنوان ادجوانت در همراهی با باکتری کشته‌شده *سالمونلاتیفی* موریوم مشابه بود؛ بنابراین به نظر می‌رسد که ملاتونین به‌عنوان یک ترکیب ایمن قادر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی همپای ادجوانت آلوم است.

با توجه به اینکه مشخص شده است که ادجوانت آلوم از طریق اثرات دپویی خود با افزایش نگهداشت آنتی‌ژن موجب افزایش زمان بقاء آنتی‌ژن جهت ایجاد پاسخ‌های ایمنی می‌شود. همچنین به‌عنوان یک تخریب‌گر ملایم موجب ایجاد آسیب بافتی محدودشده و بدین ترتیب از طریق تولید الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (DAMP) موجب بروز مولکول‌های کمک تحریکی و راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی می‌شود. از طرفی عمده اثرات ملاتونین از طریق تأثیرگذاری بر روی گیرنده‌های سطح سلولی بوده و منجر به تحریک سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن

References

1. Allison AC, Byars NE. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular immunology*. 1991;28(3):279-84.
2. Jazani NH, Parsania S, Sohrabpour M, Mazloomi E, Karimzad M, Shahabi S. Naloxone and alum synergistically augment adjuvant activities of each other in a mouse vaccine model of *Salmonella typhimurium* infection. *Immunobiology*. 2011;216(6):744-51.
3. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 1995;13(14):1263-76.
4. Mazloomi E, Jazani NH, Shahabi S. A novel adjuvant, mixture of alum and the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol, elicits both humoral and cellular immune responses for heat-killed *Salmonella typhimurium* vaccine. *Vaccine*. 2012;30(16):2640-6.

5. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *Journal of pineal research*. 2003;34(4):233-41.
6. Canyilmaz E, Uslu GH, Bahat Z, Kandaz M, Mungan S, Hacıislamoglu E, et al. Comparison of the effects of melatonin and genistein on radiation-induced nephrotoxicity: Results of an experimental study. *Biomedical Reports*. 2016;4(1):45-50.
7. Reiter RJ, Tan D-x, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell biochemistry and biophysics*. 2001;34(2): 237-56.
8. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni GJ. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *Journal of pineal research*. 2000;28(4):193-202.
9. Thorpe LE, Frieden TR, Laserson KF, Wells C, Khatri GR. Seasonality of tuberculosis in India: is it real and what does it tell us? *The Lancet*. 2004;364(9445):1613-4.
10. Kotb Elmahallawy E, Ortega Luque J, Saleh Aloweidi A, Gutierrez-Fernandez J, Sampedro-Martinez A, Rodriguez-Granger J, et al. Potential relevance of melatonin against some infectious agents: A Review and Assessment of Recent Research. *Current medicinal chemistry*. 2015;22(33):3848-61.
11. Ozkan E, Yaman H, Cakir E, Deniz O, Oztosun M, Gumus S, et al. Plasma melatonin and urinary 6-hydroxymelatonin levels in patients with pulmonary tuberculosis. *Inflammation*. 2012;35(4):1429-34.
12. Jahangiri S, Abtahi Froushani SM, Delirzh N. Combination immunotherapy with extract of heated 4T1 and naloxone in mouse model of breast cancer. *Turk J Med Sci*. 2016 17;46(2):518-23.
13. Hasani S, Hosseini Jazani N, Shahabi S, Karamati S A. Evaluation of the effects of ICI118, 551, a beta adreno-receptor antagonist and alum, as adjuvant for increasing THE protection of vaccination against *Salmonella typhimurium*. *J Urmia Univ Med Sci*. 2014; 24 (11):851-861 [In Persian].
14. Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari M. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. *Journal of radiation research*. 2007;48(4):263-72.
15. Skwarlo-Sonta K. Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuro endocrinology letters*. 2002;23:61-6.
16. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Current topics in medicinal chemistry*. 2002;2(2):167-79.
17. Maestroni GJ, Zammaretti F, Pedrinis E. Hematopoietic effect of melatonin involvement of type 1 K-opioid receptor on bone marrow macrophages and interleukin. *Journal of pineal research*. 1999;27(3):145-53.
18. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, GARCÍA S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *The FASEB Journal*. 2004;18(3):537-9.
19. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave Is, Calvo JR, Karasek M, et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(2):992-1000.
20. Abtahi Froushani SM, Galeh HE. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2014;17(9):632-7.
21. Esteban-Zubero E, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Ochoa-Moneo P, Buisac-Ramón C, Rivas-Jiménez M, et al. Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: A review. *Life Sciences*. 2016;17 (1): 72-81
22. Najafi M, Shirazi A, Motevaseli E, Geraily G, Norouzi F, Heidari M, et al. The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. *Biophysical reviews*. 2017;9(2):1-10.
23. García-Mauriño S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life sciences*. 1999;65(20):2143-50.
24. Liu F, Ng T, Fung M. Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. *Journal of neural transmission*. 2001;108(4):397-405.
25. Andersen L. The analgesic effects of exogenous melatonin in humans. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 2016;60(7):1024-5.
26. Haldar C, Rai S, Singh R. Melatonin blocks dexamethasone-induced immunosuppression in a seasonally breeding rodent Indian palm squirrel, *Funambulus pennanti*. *Steroids*. 2004;69(6):367-77.



27. Grebe KM, Hickman HD, Irvine KR, Takeda K, Bennink JR, Yewdell JW. Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8⁺ T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(13):5300-5.

28. Gupta S, Haldar C. Physiological crosstalk between melatonin and glucocorticoid receptor modulates T-cell mediated immune responses in a wild tropical rodent, *Funambulus pennanti*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;134:23-36.



Original Article

Effects of the Combined Alum and Melatonin on Immune Responses in NMRI Mice Immunized with the Killed Preparation of *Salmonella Typhimurium*

Javadi Z, Abtahi Froushani SM*, Ahmadi M

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 05 Aug 2020

Accepted: 15 Nov 2020

Abstract

Background & Objective: Melatonin is one of the immuno-modulator compounds. The purpose of this study was to determine the feasibility of improving immune responses following the use of melatonin in a vaccine made from the killed form of *Salmonella typhimurium* and alum.

Materials & Methods: This experimental study consists of 50 male NMRI mice that were allocated in 5 equal groups, randomly. Each mouse in different groups was subcutaneously treated with killed preparations of bacteria (10^6 CFU), killed preparations of bacteria with alum, killed preparation bacteria with melatonin (100mg/kg), combined melatonin and alum with killed preparation bacteria, and finally PBS at two-week intervals. One week after the last immunization, one-half of the mice were euthanized and used for immunological evaluations. Other mice in each group were challenged intraperitoneally with the 10^7 CFU live preparation of *S.typhimurium* in order to evaluate the protective efficacy of vaccine protocols.

Results: Combined vaccine caused a more favorable survival curve concurrent with a significant increase in the delayed-type hypersensitivity immune response and lymphocyte proliferation after challenging with bacterial antigen compared to other groups ($P<0.05$). The antibody titers against O and H antigens in the Widal test showed an increase in the alum group more than the melatonin group. The antibody titers showed an increase in the combined group. Nevertheless, this change did not show any significant effect in comparison with the alum group.

Conclusion: Combined melatonin and alum caused a significant increase in immunogenicity and protective effects against the killed preparation of *S. typhimurium*.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, Vaccine, adjuvant, Alum, Melatonin

***Corresponding Author:** Abtahi Froushani Seyyed Meysam, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir
<https://orcid.org/0000-0003-2579-6618>