مقاله پژوهشی

تکامل ادجوانت MF59 برای واکسن آنفلوانزای با استفاده از مشتقات کیتوزان

علیرضا لقمانی[1*]، نوروز دلیرژ[1]، آفاق معطری[2]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
۲- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۲/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: ویروس آنفلوانزای عامل مرگ‌ومیر صدها نفر در دنیا می‌شود. علی‌رغم در دسترس بودن واکسن مجاز برای تمام گروه‌های سنی و علی‌رغم آثار سودمند ثابت‌شده آن، هنوز ویروس آنفلوانزای به‌عنوان یک مشکل عمده برای سلامت عمومی باقی‌مانده است. در این تحقیق ادجوانت MF59 به‌وسیله متیل گلیکول کیتوزان ارتقا یافت.

مواد و روش‌ها: خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میزان تحریک پاسخ ایمنی همورال ادجوانت در ترکیب با ویروس آنفلوانزای اندازه‌گیری شد.

نتایج: ادجوانت جدید با قطر نانوامولوسیون ۱۵۶ و پتانسیل زتای ۲۹ تولید شد. pH ادجوانت در طول دو سال تغییر محسوس نداشت. ایمونیزاسیون موش با ادجوانت و ویروس آنفولانزا موجب شد عیار HAI بیشتری در مقایسه با ادجوانت MF59 ایجاد کند.

نتیجه‌گیری: ادجوانت تکامل‌یافته با ایجاد خواص مطلوب فیزیکوشیمیایی، همچنین القا پاسخ ایمنی همورال قوی و عدم ایجاد عوارض موضعی می‌تواند جایگزین ادجوانت MF59 شود.

کلمات کلیدی: واکسن، آنفلوانزای، MF59، متیل گلیکول کیتوزان، ادجوانت

مقدمه

ویروس آنفلوانزای یک تهدید اساسی علیه سلامتی انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شود (۱). به سبب تغییرات بسیار زیاد آنتی‌ژنیکی (Antigenic drift) هرساله عامل اپیدمی‌های گسترده و عفونت میلیون‌ها انسان می‌گردد. علاوه بر این، به سبب ترکیب ژنی گونه‌های متفاوت آنفلوانزای و زیرمجموعه‌های جدید، این ویروس از پتانسیل بالایی برای ایجاد اپیدمی برخوردار است (۲، ۳). علی‌رغم در دسترس بودن واکسن مجاز برای تمام گروه‌های سنی و علی‌رغم آثار سودمند آن، هنوز آنفلوانزای به‌عنوان یک مشکل عمده برای سلامت عمومی انسان‌ها در شیوع فصلی و مسری که می‌تواند به شکل دوره‌ای اتفاق بیافتد، باقی‌مانده است (۴). تعدادی واکسن آنفلوانزایی غیرفعال که برای انسان استفاده می‌شود به ثبت رسیده‌اند که طی رشد در تخم‌مرغ نطفه‌دار و خالص‌سازی به دست می‌آید. اولین نسل واکسن‌های آنفلوانزای بر مبنای کل ویروس بودند که با فرمالین یا بتاپروپیولاکتون برای استفاده واکسن غیرفعال شده بودند. هم‌اکنون تعداد خیلی کمی از واکسن‌ها بر مبنای ویروس کل و غیرفعال شده هستند (۵). واکسن‌های جدید غیرفعال با رشد دادن ویروس آنفلوانزای در سلول‌های کشت ممتد (Continuous cell lines) همانند Madin-Darby Canine Kidny Cells (MCDK) پیوسته به دست می‌آیند (۶). ادجوانت‌ها، بهترین راه شناخته‌شده برای بالا بردن واکنش ایمنی به واکسن‌ها بیان‌شده‌اند و اغلب واکسن‌های مجاز در سراسر جهان شامل ادجوانت‌ها هستند. ادجوانت‌ها، بهترین راه شناخته‌شده برای بالا بردن واکنش ایمنی به واکسن‌ها

*نویسنده مسئول: علیرضا لقمانی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
Email:Alireza_trtr@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0001-8994-2691

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

بیان‌شده‌اند. در حال حاضر کمتر واکسن‌های فصلی آنفلوانزای وجود دارد که از ادجوانت‌ها در ترکیب آن‌ها استفاده نشده است (۷). نمک آلومینیوم کاربردی‌ترین واکسن ادجوانت در جهان است. استفاده از این ادجوانت‌ها به همراه آنفلوانزایی فصلی و واکسن‌های آنفلوانزایی مرغی مسری، اغلب شکست‌خورده است (۸). بررسی‌های قبل نشان دادند جذب سطحی HA ویروس آنفلوانزای در آلومینیوم فسفات‌دار در موش‌ها بالا رفته اما پاسخ آنتی‌بادی به واکسن در انسان افزایش پیدا نمی‌کند. مشاهدات غیرقابل‌انکاری مبنی بر این‌که ادجوانت‌های آلوم مصونیت واکسن آنفلوانزای را بالا نمی‌برند در دسترس هستند (۹) از طرفی فراوانی بالای عوارض جانبی و موضعی مانع رشد ادجوانت‌های روغنی معدنی شد. پس‌ازاینکه مطالعات گسترده در رابطه با ایمنی‌زایی افزایشی و بی‌خطر بودن MF59 به اثبات رسید اولین مجوز را در سال ۱۹۹۷ برای واکسن ویروس آنفلوانزایی غیرفعال فصلی در اشخاص سنین ۶۵ و بالاتر را دریافت کرد. MF59 یک ادجوانت روغنی روغن در آب (Oil in Water) است که قسمت روغنی آن اسکوالن (Squalene) است منبع این ماده در طبیعت به‌طور عمده روغن کبد کوسه است که به کمک دو سورفکتانت Tweensو Spans پایدار می‌شود. میزان کارآیی MF59 توسط اندازه ذرات امولوسیون (کمتر از nm ۱۶۰) تعیین می‌شود (۱۰، ۱۱).

واکسن Fluad متشکل از یک بخش ادجوانت MF59 و سه سویه ویروس کشته‌شده در تاریخ ۲۸ نوامبر ۲۰۱۵ مورد تائید FDA قرارگرفته است (۱۱). ثابت‌شده که کیتوزان با تأثیر برافزایش CD69 روی B Cells و سلول‌های CD4+ T و CD8+ موجب ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی و کاهش تنظیمی CD44 (مارکر مهاری) و TLR4 می‌شود. نقطه قابل‌توجه کیتوزان این است که با فراهم کردن داربست کیتینی موجب رهاسازی آهسته آنتی‌ژن از محل تزریق می‌شود (۱۲، ۱۳). اگرچه تاکنون ادجوانت کیتوزان برای واکسن آنفلوانزای تأییدیه نگرفته است اما ایمن، بی‌ضرر و پاسخ مطلوب ادجوانت کیتوزان و همچنین فاز-های کلینیکال انجام‌شده آن را به‌عنوان یک کاندید ادجوانت برای واکسن آنفولانزا معرفی می‌کند (۷، ۱۴).

در این مطالعه ادجوانت MF59 و MF59 حاوی مشتقات کیتوزان، مرکب از اسکوالن، متیل گلیکول کیتوزان، Tween 80و Span85 در سیترات بافر pH 6 تولید شد. در انتها خواص فیزیکی، شیمیایی و میزان پاسخ ایمنی هرکدام در ترکیب با آنفلوانزایی سازگار شده به موش بررسی شد.

مواد و روش‌ها

اسکوالن، Methylglycol-chitosan، Serum decay enzyme و تریپسین-TPCK از (Sigma Aldrich- San Luis) تهیه گردید. Tween 80 وSpan85 از (Merk Milipor-Deutschland)، Fetal Bovin Serum (FBS) و *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) از (Gibco-UK) تهیه گردید.

تهیه ویروس آنفلوانزای و کشت سلول

ویروس آنفلوانزایی سازگار شده به موش، تحت واحد H1N1 با مشخصه A/Puerto Rico/8/34 (اختصاراً PR8 خوانده می‌شود) از مرکز تحقیقات آنفولانزای موسسه انستیتو پاستور ایران تهیه و در تخم‌مرغ جنین دار ۹ روزه فاقد آنتی‌بادی تکثیر گردید. برای این منظور ml ۰/۲ ویروس به حفره آلانتوئیک هر تخم‌مرغ تلقیح شد و پس از نگهداری تخم‌مرغ‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت، از دستگاه انکوباتور خارج کرده و مایع آلانتوئیک آن‌ها برداشته شد. محصول حاصل به‌عنوان منبع ویروس در ویال‌های کوچک تقسیم و برای کشت در سلول MDCK در دمای ۷۰°C- ذخیره گردید.

سلول‌های MDCK به همراه ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM حاوی سرم جنین گاو (FBS) به ظرف مخصوص کشت سلولی T-25 منتقل و در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷°C قرار داده شد. سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۳۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد. این حجم به‌دست‌آمده با کمک محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS به حجم نهایی ۲۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از این مخلوط نهایی به هر یک از خانه-های پلیت ۲۴ تایی اضافه شد. این پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷°C قرار گرفت.

تلقیح ویروس به کشت سلول MDCK و جداسازی آن

پس از مشاهده پلیت ۲۴ تایی در زیر میکروسکوپ و اطمینان از اتصال سلول‌های MDCK به یکدیگر، محیط کشت روی سلول‌ها حذف و دومرتبه با بافر فسفاته PBS شستشو داده شدند. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از ویروس استاندار اضافه گردید. سپس به‌منظور جذب ویروس به سلول، پلیت به مدت یک ساعت در انکوباتور CO_2 دار و در دمای ۳۷°C قرار داده شد پلیت از

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

انکوباتور خارج و به هر چاهک پلیت یک میلی‌لیتر از محیط رشد DMEM بدون FBS و حاوی تریپسین-TPCK با غلظت نهایی ۲μg/ml اضافه گردید.

پس از اضافه نمودن محیط رشد ویروس، پلیت در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ºC به مدت یک هفته نگهداری شدند و هرروز جهت مشاهده اثر آسیب (CPE) در زیر میکروسکوپ معکوس موردبررسی قرار گرفت. جداسازی ویروس مشابه گزارش قبلی انجام گرفت (۱۵). به‌طور خلاصه گردیان غلظتی ۶۰-۱۵ درصد از ساکاروز تهیه و همراه با مایع رویی کشت سلول در سرعت g ۱۰۰۰۰۰ و به مدت یک ساعت در دما ۴ºC سانتریفیوژ گردید. پس از برداشت لایه ویروسی و شستشو با PBS در سرعت g ۱۰۰۰۰۰ و به مدت یک ساعت در دمای ۴ºC، پلیت ویروسی در پنج میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون مجدد گردید. تیتر ویروس با استفاده از کمیت سنجی $TCID_{50}$ (Tissue Culture Infectious Dose50)روش رید-موش (Reed and Muench) و آزمایش سنجش هماگلوتیناسیون (HA) مشابه گزارش‌های پیشین محاسبه شد (۱۶). پس از جمع‌آوری سوسپانسیون ویروسی به‌دست‌آمده از کشت سلولی و انجام تست HA و $TCID_{50}$ نمونه‌های با تیتر مناسب جهت تهیه آنتی‌ژن ویروسی و ایمونیزاسیون انتخاب و در دما ۷۰˚C- تا زمان استفاده نگهداری شدند.

تولید آنتی‌ژن ویروسی: تولید آنتی‌ژن ویروسی به‌منظور ترکیب با ادجوانت تهیه‌شده و تهیه واکسن آنفلوانزای انجام گرفت ویروس A/PR/8/34 سازگار شده با موش در کشت سلول MCDK تکثیر شد قبل از غیرفعال سازی ویروس، میزان دوز ویروس به روش $TCID_{50}$ محاسبه شد. پس از برداشت ویروس با فرمالیایمونیزاسیون ۰/۲٪ به مدت نیم ساعت در دمای اتاق غیرفعال شد. غیرفعال بودن ویروس در کشت سلولی MCDK و عدم ایجاد CPE تائید شد. آنتی‌ژن‌ها به مدت سه روز توسط کسیه دیالیز (۱۰۰۰۰ kD cut off) و بافر PBS در دمای ۴ºC دیالیز شدند (۱۵).

تولید ادجوانت‌ها

مراحل تولید و اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکوشیمیای ادجوانت در مرکز رشد و آزمایشگاه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی شیراز انجام گرفت.

تولید ادجوانت MF59

ادجـوانت MF59 بر طبق فرمول اسـتاندارد تعریف‌شده بـرای این ادجوانت ساخته شد. به‌این‌ترتیب که ترکیب آب مقطر و پلی سوربات ۸۰ (Tween 80) به ۱۰ میلی مول بافر سیترات (pH ۶/۵) اضافه شد میزان غلظت Tween 80 در ترکیب (W/V) ۰/۵٪ بود سپس اسکوالن (W/V) ۵٪ به سوربیتان تری اولئات ۸۵ (Span 85)(W/V) ۰/۵٪ اضافه شد. سپس ترکیب به‌دست‌آمده توسط دستگاه ورتکس و هموژنایز به مدت ۱۵ دقیقه همگن شدند. ترکیب همگن‌شده به‌وسیله دستگاه میکروفلودیذر (IKA T18 basic, UK) در پنج سیکل چرخش تحت‌فشار Psi ۱۲۰۰۰۰ قرار گرفت و سپس از نازل خروج جمع‌آوری و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد تا نانو قطرات بزرگ و جرم‌های آن حذف شوند. ادجوانت حاصل تا زمان استفاده در دمای ۴ºC- نگهداری شد (۱۷، ۱۸).

تولید ادجوانت MF59 مرکب از Methylglycol-chitosan (MF59+)

ترکیب آب مقطر و پلی سوربات ۸۰ (Tween 80) به ۱۰ میلی مول بافر استیک اسید (pH ۵) حاوی ۰/۵ mg/ml Methylglycol-chitosan اضافه شد میزان غلظت Tween 80 در ترکیب (W/V) ۰/۵٪ بود سپس اسکوالن ۵٪ (W/V) به محلول Span 85 (W/V) ۰/۵٪ اضافه شد. ترکیب به دست آمد توسط دستگاه ورتکس و هموژنایز به مدت ۱۵ دقیقه همگن شدند. ترکیب همگن‌شده مشابه ادجوانت MF59 میکروفلودیک و فیلتر شدند. ادجوانت حاصل تا زمان استفاده در دمای ۴ºC - نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان پراکندگی، قطر، ویسکوزیته و مورفولوژی نانوقطرات ادجوانت

میانگین قطر، پراکندگی و ویسکوزیته نانوقطرات به روش DLS (Dynamic Light Scattering) توسط دستگاه Zetasizer Nano-ZS90 انجام گرفت به این صورت که نمونه‌ها با آب دیونیزه ۱/۵۰۰۰ رقیق و در دمای ۲۵ºC انجام گرفت تمام اندازه‌گیری‌ها به این صورت در ۳ تکرار انجام شد (۱۹، ۲۰).

اندازه‌گیری پتانسیل زتا ادجوانت

نمونه‌ها به میزان ۱/۲۰ رقیق گردید و در دمای ۲۵ºC و در طول زمان ۳۰ دقیقه و ۱۰۰ به‌کارگیری (RUN) توسط دستگاه Zetasizer Nano-ZS90 قرائت شد. تمام اندازه‌گیری‌ها در ۳ تکرار انجام شد (۱۹، ۲۰).

اندازه‌گیری pH ادجوانت

در مدت‌زمان نگهداری ادجوانت به‌صورت دوره‌ای و در مدت

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

زمان یک سال هرماه pH ادجوانت توسط دستگاه pH متر بررسی می‌گردید و میزان نوسانات pH ضبط شد.

جامعه موردمطالعه

برای هر گروه آزمایش تعداد ۵ موش ۶ هفته‌ای ماده نژاد Balb/c از مرکز پزشکی مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردید. در هر گروه پنج موش برای بررسی میزان پاسخ ایمنی هومورال انتخاب گردید. تمامی مراحل آزمایش تحت راهبرد و ملاحظه حیوانات آزمایشگاهی مرکز پزشکی مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گرفت. گروه‌های مورد آزمایش به‌صورت زیر تقسیم‌بندی شدند و به‌صورت غیر وابسته موردمطالعه قرار گرفتند.

۱) کنترل پلاسبو (PBS) ۲) ادجوانت MF59 ۳) ادجوانت MF59+ ۴) آنتی‌ژن بدون ادجوانت

ایمونیزاسیون و جمع‌آوری سرم:

موش‌های ماده شش‌هفته‌ای Balb/c با آنتی‌ژن بدون ادجوانت یا آنتی‌ژن در ترکیب با هریک از ادجوانت‌های MF59 و MF59+ صورت صفاقی ایمن شدند. برای تهیه فرمولاسیون واکسن، ادجوانت و آنتی‌ژن جمع‌آوری‌شده از کشت ویروس به نسبت مساوی ترکیب شدند. درمجموع هر موش میزان 10^4 $TCID_{50}$ از ویروس غیرفعال شده در ۱۰۰ میکرولیتر واکسن دریافت کرند. در گروه کنترل منفی، موش‌ها PBS تنها دریافت کردند. دوز یادآور واکسن در هفته دوم مشابه قبل به موش‌ها تزریق شد پس از گذشت چهار هفته از ایمونیزاسیون موش‌ها با تزریق ۲۰ میکرولیتر کتامین (۵۰mg/ml) نیمه هوشیار شدند و پس جمع‌آوری خون بطنی و سرم جداسازی شده در دمای ۷۰°C- برای بررسی‌های بعدی نگهداری شد (۲۱).

Hemagglutination inhibition (HAI) آزمایش ممانعت از هموگلوتیناسیون

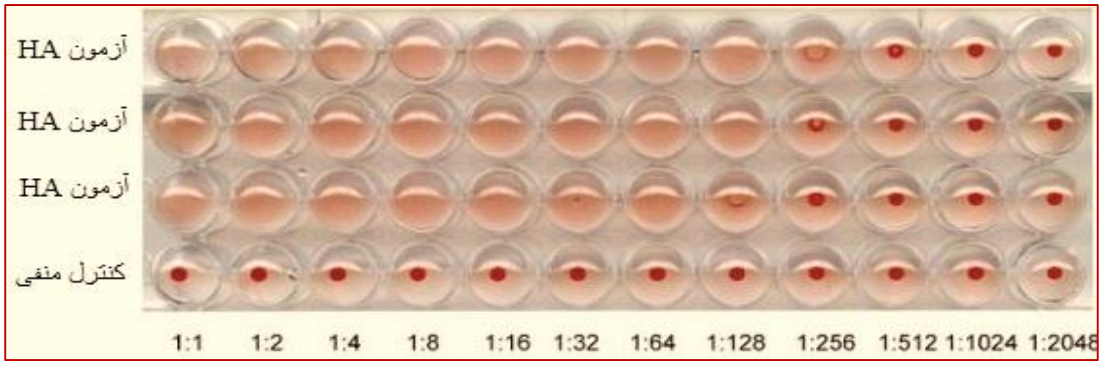
به‌منظور ارزیابی ایمنی هومورال ناشی از ادجوانت و ویروس آنفلوانزای، از آزمون HAI استفاده شد. در این آزمون از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای V شکل استفاده گردید. ابتدا ۵۰ میکرولیتر نرمال سالین در هر ۱۲ حفره ریخته شد؛ و پس از تیمار کردن سرم با آنزیم تخریب‌کننده سرم (Serum decay enzyme) به اولین حفره ۵۰ میکرولیتر سرم موشی اضافه گردید و پس از پیپتاژ کردن، رقیق‌سازی سریالی دو برابر انجام شد و نهایتاً از حفره آخر ۵۰ میکرولیتر دور ریخته شد. سپس به هریک از حفره‌ها ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن HA (۴ واحد) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.

پس از گذشت این مدت ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز مرغ ۰/۵٪ به همه حفره‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. آخرین حفره‌ای که در آن ۱۰۰٪ ممانعت از هماگلوتیناسیون وجود داشت به‌عنوان عیار آنتی آنفلوانزایی واکسن قرائت گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق با برنامه Graph Pad Prism Software(version 5.03. Graph Pad software Inc. San Diego, California) و روش آماری One-Way ANOVA تفسیر و مقایسه بین گروه‌ها توسط آزمون Tuky Test انجام شد. مقدار P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج آزمون HA از مایع رویی سلول‌های تلقیح شده با ویروس میزان عددی (عیار) هماگلوتیناسیون (HA) عکس رقت ویروس در آخرین چاهک با هماگلوتیناسیون کامل بود. نتایج



شکل ۱- نتایج آزمون HA برای سنجش عیار ویروسی. خانه‌هایی که گلبول قرمز ته‌نشین شده به‌عنوان عدم هماگلوتیناسیون و خانه‌هایی که عدم ایجاد تکمه و ته‌نشینی گلبول نشان می‌دهد دلیل بر آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز است. آزمون HA به‌صورت سه‌گانه انجام گرفت.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

آزمون HA عیار ۱۲۸ برای ویروس تکثیر یافته نشان داد (شکل ۱).

نتایج آزمون $TCID_{50}$

گرچه آزمون HA عیار ویروس را بیان می‌کند ولی قادر به سنجش ذرات عفونی ویروس (ویروس فعال) نیست. ازآنجاکه تعیین عیار ویروس برای تهیه فرمولاسیون واکسن امری ضروری بود. آزمون $TCID_{50}$ به‌منظور درک بهتر عیار ویروس و سنجش ذرات عفونی ویروس در نظر گرفته شد. از هر غلظت ویروس (10^{-1} تا 10^{-10}) به‌صورت چهارگانه به پلیت ۲۴ خانه منتقل گردید و پس از مشاهده CPE ویروس (شکل ۲) در غلظت‌های متفاوت، میزان $TCID_{50}$ 10^{8} برآورد شد.

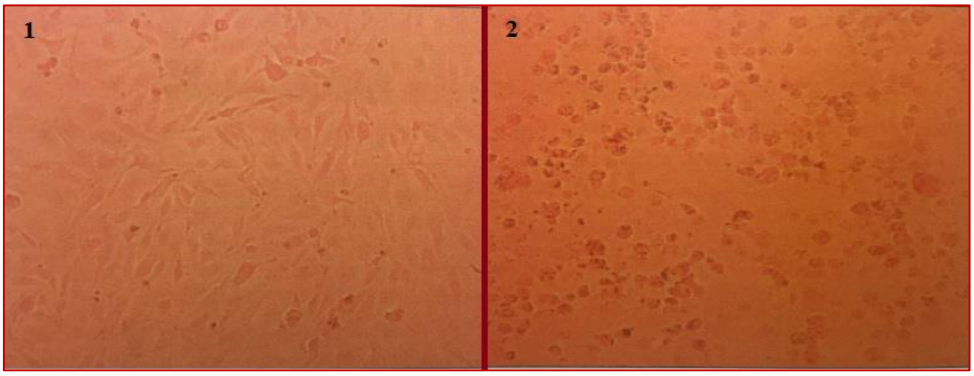
خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ادجوانت‌ها

اندازه‌گیری میزان پراکندگی، قطر، ویسکوزیته و مورفولوژی نانوقطرات ادجوانت

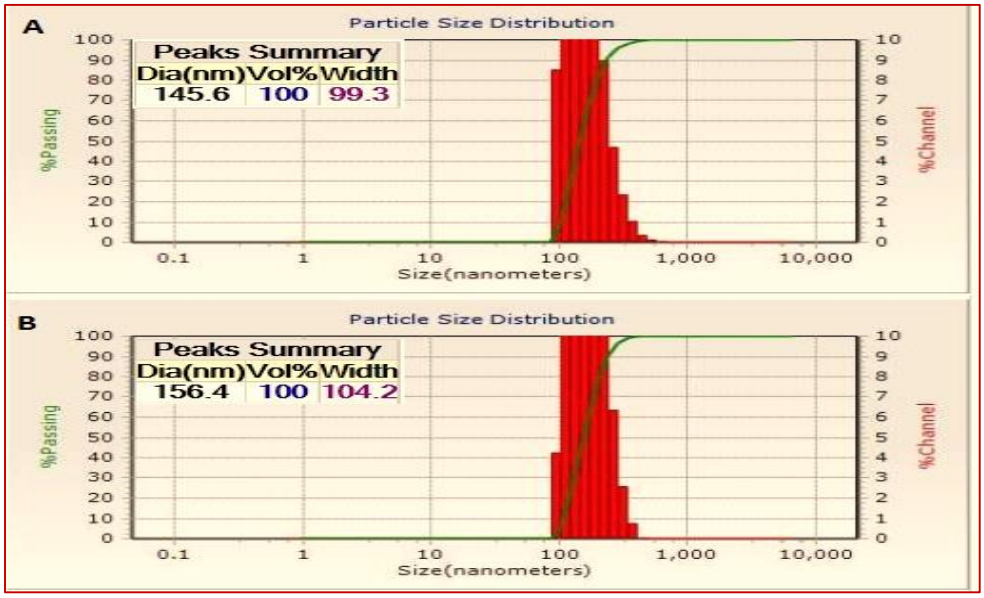
میانگین قطر، پراکندگی و ویسکوزیته نانوقطرات به روش DLS توسط دستگاه Zetasizer Nano-ZS90 انجام گرفت. نتایج حاصل آن در شکل ۳ و جدول ۱ آمده است. همچنین آنالیزی‌های فوق ساختاری و مورفولوژی نانوقطرات ادجوانت توسط میکروسکوپ الکترونی و به روش SEM موردمطالعه قرار گرفت.

نتایج (HAI) آزمایش ممانعت از هموگلوتیناسیون

به‌منظور ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال ایجادشده توسط واکسن آنفلوانزای، از آزمون HAI استفاده شد. آزمایش ممانعت از



شکل۲- میزان جرم ویروسی به روش $TCID_{50}$ که نشان‌دهنده میزان رقت از ویروس که قادر به عفونی کردن ۵۰٪ از سلول‌های سالم است محاسبه گردید. در تصویر شماره ۱ عدم ایجاد CPE توسط ویروس آنفلوانزای در سلول‌های MDCK و در تصویر ۲ ایجاد CPE در سلول‌های MDCK به‌وسیله ویروس قابل‌مشاهده است.



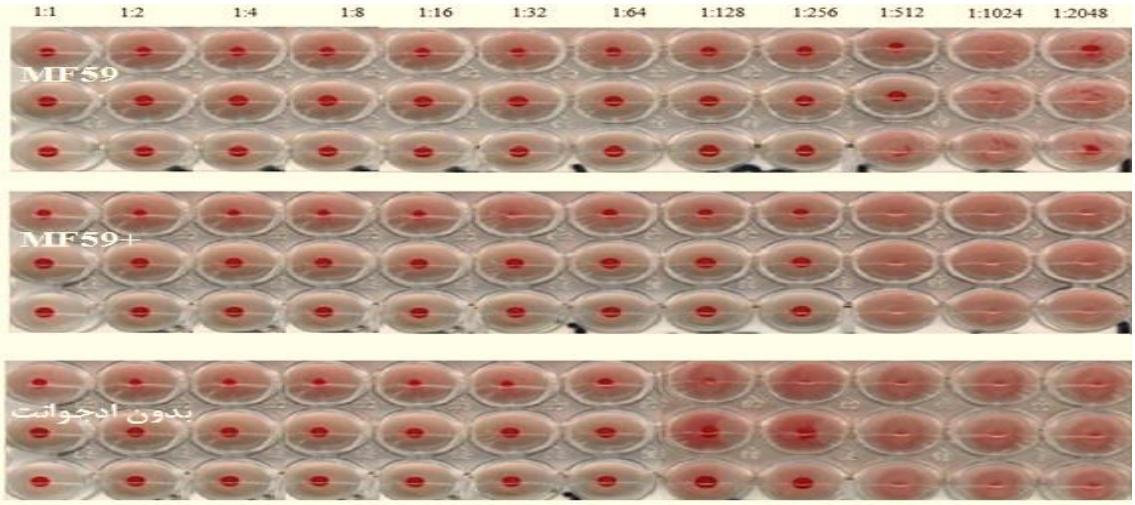
شکل۳- نمونه گرافت دستگاه DLS که میانگین قطر و پراکندگی نانوقطرات امولوسیون تولیدشده MF59 (تصویر A) و MF59+ را نشان می‌دهد (تصویر B).

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

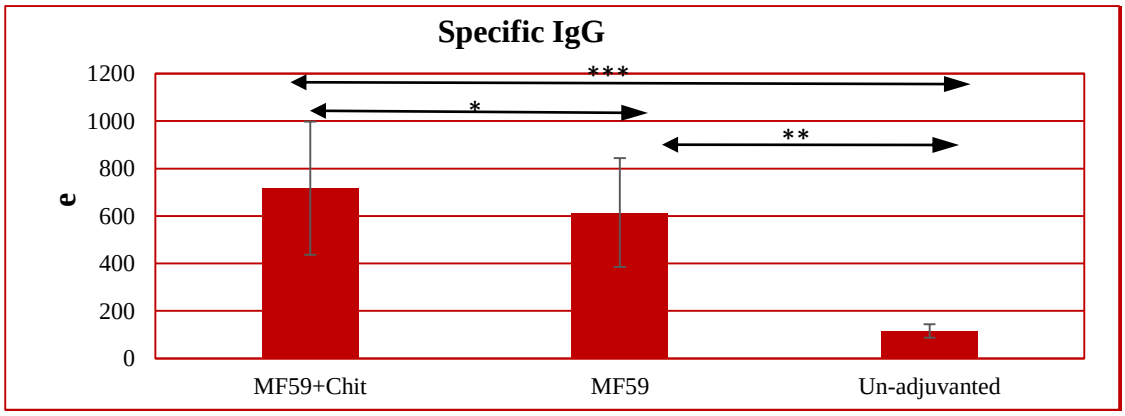
هموگلوتیناسیون (شکل ۴ و نمودار ۱) نشان داد گروه واکسن MF59+ بیشترین عیار HAI را ایجاد می‌کند که در مقایسه با گروه واکسن MF59 با در نظر گرفتن P<۰/۰۵ معنی‌دار بود. این افزایش عیار در مقایسه گروه واکسن بدون ادجوانت با در نظر گرفتن P<۰/۰۰۱ معنی‌دار بود. در گروه کنترل PBS عیار HAI پایین‌تر از حد قابل‌شناسایی بود.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکو-شیمیایی ادجوانت‌های تهیه‌شده اندازه‌گیری شد و به‌صورت میانگین در جدول پایین آورده شده است.

ادجوانت	میانگین قطر نانو قطرات امولوسیون	پتانسیل زتا	ویسکوزیته	pH	pH طی یک سال	توزیع پراکندگی نانو ذرات امولوسیون
MF59	~۱۵۰	۲۹	۰/۷۲	۶/۸	۷/۱ ±۰/۰۷	۰/۷ ±۰/۰۲
MF59+	~۱۵۶	۲۵/۵	۰/۷۴	۶/۴	۶/۷ ±۰/۰۵	۱/۱ ±۰/۰۳



شکل ۴- تصاویر مربوط به آزمون HAI برای گروه MF59+، MF59 و ویروس بدون ادجوانت. ایجاد تکمه دلیل بر ممانعت از هماگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز که درنتیجه آن گلبول‌های قرمز ته‌نشین می‌شدند. این حفره‌ها ازنظر وجود آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن ویروسی + بودند. عدم وجود آنتی‌بادی‌های ممانعت از هماگلوتیناسیون موجب آگلوتینه شدن گلبول قرمز شد. عکس رقت آخرین حفره که در آن گلبول‌های قرمز رسوب داشتند به‌عنوان عیار HAI در نظر گرفته شد. گروه‌های مورد آزمایش با سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند.



نمودار ۱- عیار HAI ویروس آنفلوانزای در سرم موش پس از گذشت چهار هفته از ایمنوزاسیون برای گروه‌های MF59+، MF59 و واکسن بدون ادجوانت بررسی گردید. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار P<۰/۰۵، ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار P<۰/۰۱، *** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار P<۰/۰۰۱. داده‌ها به‌صورت میانگین عیار ± انحراف معیار نشان داده شد.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از اهداف مهم شرکت‌های تجاری و محققان تکامل و توسعه واکسن آنفلوانزای به‌وسیله یک ادجوانت بالقوه که بتواند مصونیت متقاطع علیه آنتی‌ژن‌های متفاوت سویه‌های ویروسی آنفلوانزای ایجاد کند است. برای افزایش پاسخ ایمنی و مصونیت علیه ویروس آنفلوانزای، تأثیر سیستم‌های مختلف ادجوانت ازجمله گیاهان، حشرات، باکتری‌ها و ترکیبات دارویی- شیمیایی شامل نانو امولسیون‌ها، کمپلکس‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی (ISCOMs)، کیتوزان و لیپوزوم‌ها در مدل موشی بررسی‌شده‌اند (۲۲). MF59 یک ادجوانت امولسیونی روغن در آب است که برای واکسن‌های آنفلوانزایی فصلی و پاندمیک در ترکیب با سه سویه ویروسی شامل دوسویه A (H1N1 و H3N2) و یک‌سویه B تحت عنوان Fluad توسط شرکت Novartis تولید شد و در نوامبر ۲۰۱۵ مجوز FDA دریافت کرد (۲۳) این ادجوانت به‌خوبی نشان داده که قادر به ایجاد ایمنی متقاطع (Cross-reactive immunity) علیه دیگر سویه‌های ویروسی در مدل موش و انسان است. تجربه‌های پیش درمانگاهی نشان دادند که MF59 در ترکیب با یک تقویت‌کننده سیستم ایمنی (Immunopotentiators) می‌تواند پاسخ ایمنی بهتری نسبت به تنها MF59 داشته باشد؛ اما متأسفانه در بیشتر مواقع همراه با تأثیرات مخرب جانبی همراه بوده است. به‌هرحال تاکنون این‌چنین تقویت‌کننده ایمنی مناسب و سازگار شناسایی نشده است (۲۴، ۲۵). ترکیب دودسته اجودانت با لحاظ داشتن خصوصیات، ویژگی‌ها و سازگاری‌هایشان با یکدیگر می‌تواند پاسخ ایمنی بسیار قوی‌تری به پاتوژن‌های سرسخت ایجاد کند. ازآنجایی‌که MF59 یک سیستم انتقالی (Delivery system) است با در نظر داشتن عوارض جانبی احتمالی، یک محرک سیستم ایمنی که قبلاً به‌عنوان یک عنصر بدون عوارض و سالم برای تولید دارویی به تائید FDA رسیده است (www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm) به MF59 تلفیق شد. در این مطالعه، عدم وجود معرف استاندار د برای ویروس آنفلوانزایی A/PR/8/34 به ما اجازه تعیین آنتی‌ژن HA به‌عنوان جز اصلی واکسن را نمی‌داد. ازاین‌رو آنتی‌ژن واکسن در الگوی $TCID_{50}$ سنجش و تعریف شد. علیرغم این محدودیت، نتایج جالب‌توجه ما نشان می‌دهد که روش تعیین آنتی‌ژن تعریف‌شده در مطالعات آینده واکسن آنفلوانزای در ترکیب با ادجوانت MF59+ قابل‌اعتماد هستند. هدف از این مطالعه تکامل و توسعه ادجوانت MF59 و تولید یک نانو-امولوسیون نوآورانه بود. ازاین‌رو از مشتقات کیتوزان به‌عنوان یک هم انتقال (Co-Deliver) و داربست نگهدارندِ آنتی‌ژن در نانو-امولسیون روغن در آب ادجوانت MF59 استفاده شد و ایمنی‌زایی آن نسبت به ادجوانت MF59 و ویروس بدون ادجوانت بررسی شد.

ادجوانت جدید تهیه‌شده با میانگین سایز نانو ذرات ۱۶۵ و پراکندگی (Polydispersity) ناچیز، رنج نرمال برای ادجوانت MF59 را دربر می‌گرفت. قطر نانو قطرات نقش اساسی در زهکشی لنفوئیدی دارند. همچنین این خصوصیت برای انتقال، برداشت، فراوری و عرضه آنتی‌ژن که موجب القا پاسخ مناسب و مؤثر سلولی و هومورال می‌شود ضروری است (۲۶). Mottram و همکاران در سال ۲۰۰۷ ثابت کردند که قطر نانوذرات کمتر از ۲۰۰ نانومتر مستقیماً از طریق زهکشی لنف در کمتر از چند ساعت به دنبال تزریق در محل به ارگان لنفوئیدی نزدیک می‌رسند. از طرفی این نکته را باید در نظر گرفت که همه ترکیبات ادجوانت به‌صورت زیستی، سازگار و به‌عنوان اصول ساخت خوب (GMP) در دسترس باشند (۲۷). نانو امولسیون تهیه‌شده سایز قطر کمتر از ۲۰۰ نانومتر داشت درنتیجه علاوه بر این‌که می‌تواند به‌صورت فیلتر شدن استریل شود این توانایی را دارد که مستقیماً به ارگان‌های لنفاوی برسد. پتانسیل زتا یکی از عوامل کلیدی برای ادجوانت نانو امولسیونی محسوب می‌شود چراکه میزان بار نانوقطرات می‌بایست با گلبول‌های قرمز و همچنین سلول‌های برداشت کننده آنتی‌ژن سازگاری داشته باشند. افزایش پتانسیل زتا به دلیل ایجاد نیروی دافعه موجب افزایش پراکندگی و ناهمگونی قطر نانو ذرات می‌شود از طرف دیگر کاهش پتانسیل زتا نتایج مخرب‌تر به دنبال دارد چراکه به دلیل کاهش نیروی دافعه نانوذرات جذب یکدیگر شده و موجب به هم آمیختگی (Coalescence) نانو قطرات و درنتیجه ناپایداری نانو امولوسیون در مدت‌زمان کوتاه می‌شود. پتانسیل زتای قابل‌قبول که بتواند پایداری بلندمدت نانوامولسیون را تضمین کند رنج بین ۳۰-۲۰ قرار می‌گیرد (۲۸، ۲۹). ادجوانت MF59 و MF59+ به ترتیب با پتانسیل زتای ۲۹ و ۲۵ نشان از پایداری بلندمدت ادجوانت دارند. این نکته مستدل می‌شود که کیتوزان به‌عنوان یک عنصر بی‌روح (Inert) تأثیر چندانی بر تغییر پتانسیل زتا نانو امولسیون ندارد (۳۰). بررسی تغییرات pH، ویسکوزیته و

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

مشاهدات ماکروسکوپی ناشی از جداسازی فازی هر دو ادجوانت تهیه‌شده، در قبل و بعد از ترکیب با آنتی‌ژن تائید کننده پایداری ادجوانت‌ها است.

واکسیناسیون موش‌ها با ادجوانت MF59+ به‌صورت معنی‌داری موجب افزایش تیتر HAI ویروس نسبت به واکسیناسیون با ادجوانت MF59 یا واکسن بدون ادجوانت شد. Heip و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که میزان 1mg/ml از کیتوزان (DAD 85 and 3kDa Mw) به همراه ویروس غیرفعال شده آنفلوانزایی H5N1 کاملاً برای موش بی‌ضرر بوده و میزان آنتی-بادی اختصاصی بیشتر از ادجوانت‌های معمول آلوم و ادجوانت فروند است (۳۱). Dzung و همکاران در سال ۲۰۱۱ خاصیت ادجوانتی کیتوزان در Mwهای ۲۰، ۳۰ و ۳۰۰ و درجه DAD متفاوت کیتوزان را برای آنفلوانزایی H1N1 امتحان کردند و نشان داده شد که وزن مولکولی ۳۰۰ و DAD ۸۵٪ بیشترین پاسخ هموررال را به همراه دارد و در همه گروها به‌استثنای گروه آنتی‌ژن پس از گذشت ۲۰ روز پاسخ ایمنی ۱۰۰٪ بود (۳۲). Wu و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای واکسیناسیون آنفلوانزای از کیتوزان اصلاح‌شده استفاده کرده و مشاهده کردند که میزان آنتی‌بادی ترشحی در گروه هیدروزل کیتوزان و آنتی‌ژن H5N1 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه آنتی‌ژن به همراه ادجوانت MF59 بود (۳۳). Malik و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند دیگر شکل اصلاح‌شده کیتوزان Trimethyl-chitosan (TMC) در ترکیب با آنفلوانزایی PR8 و تجویز از طریق بینی می‌تواند تیتر آنتی‌بادی را افزایش دهد (۳۴).

در این تحقیق پس از ایمنوزاسیون موش با ادجوانت MF59 و MF59+ هیچ‌گونه نشانه‌ای مبنی بر واکنش موضعی یا آزردگی محل مشـاهده نشد. همچنان که مطالعات قبل بـی‌خطر و ایمن بودن ادجوانت MF59 یا کیتوزان و مشتقات آن نشان داده بودند (۳۱، ۳۹-۳۵).

برای فهم بهتر خاصیت ادجوانتی MF59+ سه پیشنهاد ارائه می‌شود. ۱) ایمنی طولانی‌مدت ادجوانت MF59+ بررسی شود ۲) گرچه تزریق داخل صفاقی واکسن موجب افزایش تیتر آنتی-بادی خنثی‌کننده در برابر ویروس آنفلوانزایی شد، بااین‌حال خاصیت ایمنی‌زایی آن در تزریق داخل بینی مشخص نیست. ۳) انجام آزمون‌های تکمیلی نظیر بررسی پاسخ سلولی و ایجاد پروفایل سایتوکاینی توسط واکسن درک بهتری از میزان ایمنی‌زایی MF59+ نشان خواهد داد.

این مطالعه اولین بررسی پاسخ ایمنی مشتقات کیتوزان در ترکیب با ادجوانت MF59 (MF59+) برای واکسیناسیون ویروس آنفلوانزایی بود. ادجوانت MF59+ به‌طور موفق توانست خواص فیزیکی- شیمیایی و پایداری نشان دهد. نتایج نشان داد که MF59+ با افزایش تنظیمی پاسخ هموررال می‌تواند به‌عنوان یک ادجوانت بی‌خطر و ایمن برای واکسیناسیون ویروس آنفلوانزا و دیگر پاتوژن‌های ضعیف در تحریک سیستم ایمنی در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از رساله دکترای ایمنی‌شناسی است که توسط دانشگاه ارومیه و به شماره ۱۹۳-۹۸-د ثبت‌شده است. نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر را از خانم دکتر فتوحی برای اهدای سویه ویروس PR8 را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Shaw M, Palese P, Knipe DM, Howley PM. Orthomyxoviruses. 3nd ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. P 65-56
2. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nature Reviews Microbiology. 2011;9(8):590-603
3. García-Sastre A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. Virus research. 2011;162(1):12-8.
4. Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam P-P, Kuster SP, Fadel SA, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. Bmj. 2013;347:f5061.
5. van der Velden MV, Geisberger A, Dvorak T, Portsmouth D, Fritz R, Crowe BA, et al. Safety and immunogenicity of a Vero cell culture-derived whole-virus H5N1 influenza vaccine in chronically ill and immunocompromised patients. Clinical and Vaccine Immunology. 2014:CVI. 00065-14.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

6. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. Expert review of vaccines. 2013;12(9):1085-94.
7. Barclay T, Petrovsky N. Vaccine adjuvant nanotechnologies. Micro and Nanotechnology in Vaccine Development: Elsevier; 2017. p. 127-47.
8. Jafari M, Moghaddam Pour M, Taghizadeh M, Masoudi S, Bayat Z. Comparative assessment of humoral immune responses of aluminum hydroxide and oil-emulsion adjuvants in Influenza (H9N2) and Newcastle inactive vaccines to chickens. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2017;45(1):84-9.
9. Davenport FM, Hennessy AV, Bell JA. Immunologic advantages of emulsified influenza virus vaccines. Military medicine. 1962;127(2):95-100.
10. Heegaard PM, Dedieu L, Johnson N, Le Potier M-F, Mockey M, Mutinelli F, et al. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. Archives of virology. 2011;156(2):183-202.
11. Singh M. Vaccine adjuvants and delivery systems: 3nd ed. San Diego: John Wiley & Sons; 2007. P 569-31.
12. Borges O, Borchard G, de Sousa A, Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A. Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. International journal of pharmaceutics. 2007;337(1):254-64.
13. Chen C-L, Wang Y-M, Liu C-F, Wang J-Y. The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation. Biomaterials. 2008; 29(14):82-2173
14. Vasiliev YM. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. Expert review of vaccines. 2015;14(1):37-53.
15. Merten O-W, Hannoun C, Manuguerra J-C, Ventre F, Petres S. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. Novel Strategies in the Design and Production of Vaccines: Springer; 1996. p. 141-51.
16. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American journal of epidemiology. 1938;27(3):493-7.
17. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. Expert review of vaccines. 2013;12(1):13-30.
18. O'Hagan DT. Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols: 3nd ed. New York; Humana Press; 2017. P 486-295
19. Deng J, Cai W, Jin F. A novel oil-in-water emulsion as a potential adjuvant for influenza vaccine: Development, characterization, stability and invivo evaluation. International journal of pharmaceutics. 2014;468(1):187-95.
20. Yu S, Tang C, Shi X, Yang P, Xing L, Wang X. Novel Th1-biased adjuvant, SPO1, enhances mucosal and systemic immunogenicity of vaccines administered intranasally in mice. Vaccine. 2012;30(36):5425-36.
21. Harris K, Ream R, Gao J, Eichelberger MC. Intramuscular immunization of mice with live influenza virus is more immunogenic and offers greater protection than immunization with inactivated virus. Virology journal. 2011;8(1):251.
22. Vemula SV, Sayedahmed EE, Sambhara S, Mittal SK. Vaccine approaches conferring cross-protection against influenza viruses. Expert Rev Vaccines. 2017;16(11):1141-54.
23. Patel S, Faraj Y, Duso DK, Reiley WW, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, et al. Comparative Safety and Efficacy Profile of a Novel Oil in Water Vaccine Adjuvant Comprising Vitamins A and E and a Catechin in Protective Anti-Influenza Immunity. Nutrients. 2017;9(5): 2875-258
24. Baudner BC, Ronconi V, Casini D, Tortoli M, Kazzaz J, Singh M, et al. MF59 emulsion is an effective delivery system for a synthetic TLR4 agonist (E6020). Pharmaceutical research. 2009;26(6):1477-85.
25. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. Expert Rev Vaccines. 2013;12(1):1-30
26. Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA. Materials engineering for immunomodulation. Nature. 2009;462(7272):449.
27. Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, Gloster S, Xiang SD, Meanger J, et al. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. Molecular pharmaceutics. 2007;4(1):73-84.
28. Herman C, Groves M. Hydrolysis kinetics of phospholipids in thermally stressed intravenous lipid emulsion formulations. Journal of pharmacy and pharmacology. 1992;44(7):539-42.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

29. Deng J, Cai W, Jin F. A novel oil-in-water emulsion as a potential adjuvant for influenza vaccine: development, characterization, stability and in vivo evaluation. Int J Pharm. 2014;468(1-2):187-95.
30. Meraz KAS, Vargas SMP, Maldonado JTL, Bravo JMC, Guzman MTO, Maldonado EAL. Eco-friendly innovation for nejayote coagulation–flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. Chemical Engineering Journal. 2016;284:42-536
31. Hiep L, Thanh M, Van D, Khanh V, Dzung N. Chitosan as a hopeful adjuvant for H5N1 influenza vaccine. Journal Chitin and Chitosan. 2008;13(10):6-8.
32. Dzung NA, Hà NTN, Van DTH, Phuong NTL, Quynh NTN, Hiep DM, et al. Chitosan nanoparticle as a novel delivery system for A/H1n1 influenza vaccine: safe property and immunogenicity in mice. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2011;60:1839-46.
33. Wu Y, Wei W, Zhou M, Wang Y, Wu J, Ma G, et al. Thermal-sensitive hydrogel as adjuvant-free vaccine delivery system for H5N1 intranasal immunization. Biomaterials. 2012;33(7):2351-60.
34. Malik A, Gupta M, Gupta V, Gogoi H, Bhatnagar R. Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. International journal of nanomedicine. 2018;13:7959.
35. Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. Nature. 2007;445(7125):319-23.
36. Sawaengsak C, Mori Y, Yamanishi K, Mitrevej A, Sinchaipanid N. Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine. AAPS PharmSciTech. 2014;15(2):317-25.
37. Vesikari T, Groth N, Karvonen A, Borkowski A, Pellegrini M. MF59®-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD®) in children: Safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination. Vaccine. 2009;27(45):6291-5.
38. Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N, Della Cioppa G. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database. Vaccine. 2009;27(49):6959-65.
39. Dzung NA. Chitosan and chitosan derivatives as potential adjuvants for influenza vaccine. Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug and Discovery and Developments, Publisher: CRC Taylors & Francis, Editors: Se Kwon Kim. 2014.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

Original Article

Development of MF-59 Adjuvant Using Chitosan Derivatives to Influenza Vaccine

Loghmani A[1*], Daldrezh N[1], Moattari A[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran
2. Department of Virology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences,Shiraz, Iran

Received: 25 Feb 2020 Accepted: 07 May 2020

Abstract

Background & Objective: The influenza virus causes hundreds of deaths in the world. Despite the availability of some authorized vaccines for all age groups and its approved beneficial effects, the influenza is still a major problem for public health.

Materials & Methods: In this study, the adjuvant of MF59 was developed by methylglycol-chitosan. The physico-chemical characteristics and immune response stimulation of novel adjuvant were measured in combination with the influenza virus.

Results: The new adjuvant was produced with a nano-droplet diameter of 156 and Zeta potential of 29. The pH of adjuvant was not significantly changed for two years. Immunization of mice with developed adjuvant makes more HAI titer than MF59 adjuvant.

Conclusion: The favorable characteristics of physico-chemical properties and lack of local side effects of developed adjuvant as well as its strong humoral immunity can introduce it as a novel MF59 adjuvants.

Keywords: Vaccine, Influenza, MF59, Methylglycol-chitosan, Adjuvant

***Corresponding Author: Loghmani Alireza,** Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran
Email:Alireza_trtr@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0001-8994-2691

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.17.9]

Journal of Fasa University of Medical Sciences 10 (2020): 2261-2271