



# Application of PPD in the Formulation of Commercial Hepatitis B Vaccine to Improve Humoral and Cellular Immune Responses

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Golkaran B.<sup>1</sup> MSc,  
Haghighat S.<sup>1</sup> PhD,  
Mahdavi M.\* PhD

### How to cite this article

Golkaran B, Haghighat S, Mahdavi M. Application of PPD in the Formulation of Commercial Hepatitis B Vaccine to Improve Humoral and Cellular Immune Responses. Pathobiology Research. 2018;21(2):73-78.

\*Research Center for Recombinant Vaccines, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Microbiology Department, Science & Technology Faculty, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Correspondence

Address: Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin Avenue, Tehran, Postal Code: 1316943551

Phone: +98 (21) 66968857

Fax: +98 (21) 66968857  
mahdavivac@gmail.com

### Article History

Received: November 29, 2017

Accepted: January 14, 2018

ePublished: July 5, 2018

## ABSTRACT

**Aims** Vaccination with the HBs Ag vaccine formulated in the alum adjuvant prevents hepatitis B infection. Adjuvants increase the efficacy of vaccines. Mycobacterium purified protein derivative (PPD) causes dendritic cell maturation. Considering the role of dendritic cells in the induction of immune responses, the aim of present study was to investigate of application of PPD in the formulation of Commercial Hepatitis B vaccine to improve humoral and cellular immune responses.

**Materials & Methods** In this experimental study, 63 balb/C mice of inbred were divided into 7 groups of 9. The Hepatitis B vaccine with doses of 1 and 10 $\mu$ g of PPD was injected subcutaneously into HBS-ALUM, HBS-ALUM+PPD1 $\mu$ g, HBS-ALUM+PPD10 $\mu$ g and proper control groups, three times with two-week intervals. Total IgG in serum samples and IL-4 and IFN- $\gamma$  cytokines levels and IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio in spleen cell culture were assessed by ELISA method. Statistical analysis was done using one-way analysis of variance by Graf pad prism 6.1 software.

**Findings** Using PPD in the formulation of HBs vaccine had no effect on IFN- $\gamma$  cytokine levels but reduced IL-4 and also increased the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio compared to the commercial vaccine. Also PPD application in HBs vaccine after the first injection enhanced the humoral response, but after the second injection was ineffective so that after the third injection reduced the antibody response compared to the commercial vaccine.

**Conclusion** PPD in the formulation of hepatitis B vaccine can lead the immune response pattern to the T helper cells 1 (Th1). The first injection enhances the antibody response but after third injection suppressed humoral immunity system.

**Keywords** HBs Ag; Hepatitis B; Vaccine; Alum Compounds; Purified Protein Derivative

## CITATION LINKS

[1] Is anti-hepatitis B virus (HBV) immunization successful in elderly hemodialysis (HD) patients? [2] Adjuvant synergy in the response to hepatitis B vaccines [3] Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: Implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis [4] Induction of IFN- $\gamma$  cytokine response against hepatitis B surface antigen using melittin [5] Evaluating novel adjuvant systems for the induction of humeral and cellular immune responses in hepatitis C virus capsid protein immunization [6] Malaria vaccine adjuvants: latest update and challenges in preclinical and clinical research [7] No evidence for occult HBV infection in hepatitis B vaccine non-responders [8] Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells [9] Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses [10] Analysis of T cells recruited during delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative (PPD) versus challenge with tuberculosis infection [11] PPD extract induces the maturation of human monocyte-derived dendritic cells [12] Intralesional tuberculin (PPD) versus measles, mumps, rubella (MMR) vaccine in treatment of multiple warts: A comparative clinical and immunological study [13] Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos (t) ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss [14] The changing epidemiology of viral hepatitis B in Iran [15] Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen and HB vaccine [16] IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following Heligmosomoides polygyrus infection [17] Age-Specific adjuvant synergy: Dual TLR7/8 and mincle activation of human newborn dendritic cells enables Th1 polarization [18] B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment [19] A comparison of purified protein derivative and some fractions of mycobacterium tuberculosis

## کاربرد PPD در فرمولاسیون واکسن تجاری هیپاتیت B به منظور تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال

بهاره گلکاران MSc

گروه میکروبیولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ستاره حقیقت PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مهدی مهدوی\* PhD

مرکز تحقیقات واکسن‌های نوترکیب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** واکسن‌اسیون با آنتی‌ژن سطحی ویروس هیپاتیت B در ادجوانت آلوم پیشگیری از عفونت هیپاتیت B را به دنبال دارد. مشتق پروتئینی خالص (PPD)، آنتی‌ژن مایکوباکتریایی است که موجب بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شود. با توجه به نقش سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ‌های ایمنی، هدف مطالعه حاضر بررسی امکان استفاده از PPD در فرمولاسیون واکسن تجاری هیپاتیت B به منظور تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال بود.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر، ۶۳ سر موش ب‌الب/سی ماده اینبرد، به ۷ گروه ۹تایی تقسیم شدند. واکسن هیپاتیت B با دوزهای ۱ و ۱۰ میکروگرم PPD در سه نوبت به فاصله دو هفته به صورت زیرجلدی به گروه‌های HBS-ALUM، HBS-ALUM+PPD1μg و HBS-ALUM+PPD10μg و کنترل منظران تزریق شد. میزان IgG کلی سرمی و سایتوکاین‌های اینترلوکین ۴ (IL-4)، اینترفرون گاما (IFN-γ) و نسبت IFN-γ/IL-4 در کشت سلول‌های طحالی با الیزا بررسی شد. آنالیز آماری با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و نرم افزار Graf pad prism 6.1 انجام شد.

یافته‌ها: به‌کارگیری PPD در واکسن HBS تاثیر بر سایتوکاین IFN-γ نداشت اما موجب کاهش IL-4 و افزایش نسبت IFN-γ/IL-4 در مقایسه با واکسن تجاری شد. همچنین به‌کارگیری PPD در واکسن HBS بعد از تزریق اول موجب تقویت پاسخ ایمنی همورال شد اما پس از تزریق دوم بی‌اثر بود، به طوری که پس از تزریق سوم، پاسخ آنتی‌بادی نسبت به واکسن تجاری را کاهش داد.

**نتیجه گیری:** وجود PPD در فرمولاسیون واکسن هیپاتیت B می‌تواند پاسخ ایمنی را به سمت سلول‌های T کمکی ۱ (Th1) سوق دهد. تزریق اول موجب تقویت پاسخ آنتی‌بادی می‌شود اما پس از سه تزریق، سیستم ایمنی همورال را سرکوب می‌کند.

**کلیدواژه‌ها:** HBS-Ag، هیپاتیت B، واکسن، ترکیبات آلوم، مشتق پروتئین خالص

تاریخ دریافت:

تاریخ پذیرش:

\*نویسنده مسئول: mahdavivac@gmail.com

### مقدمه

ویروس هیپاتیت B یک ویروس DNA دار دورشته‌ای کوچک و حلقوی، متعلق به خانواده هپادناویریده است که در کبد همانندسازی می‌کند و موجب نارسایی کبدی، هیپاتیت و سرطان کبد می‌شود<sup>[1]</sup>. با وجود اینکه واکسن موثر علیه ویروس هیپاتیت B در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد اما هنوز عفونت این ویروس از مشکلات بهداشت جهانی به شمار می‌آید<sup>[2]</sup>. کارآیی واکسن هیپاتیت B در افراد مختلف متفاوت است و در برخی از افراد تزریق شده به طور مثال در بیماران دیالیزی، عملکرد لازم را نشان نمی‌دهد. علاوه بر اختلال ایمنی، عوامل مختلفی شامل کیفیت دیالیز، وجود همزمان عفونت هیپاتیت C، سن، دیابت و وضعیت تغذیه‌ای بر میزان پاسخ‌دهی به واکسن هیپاتیت B نقش دارند<sup>[1]</sup>. محققان استراتژی‌های متعددی را برای بهبود پاسخ‌های ایمنی

واکسن‌ها به کار برده‌اند. یکی از این راهکارها، استفاده از ادجوانت مناسب است. مطالعات نشان داده‌اند که تزریق آنتی‌ژن سطحی هیپاتیت B (HBSAg) به همراه ادجوانت‌های آلومینیوم، تیترا آنتی‌بادی بیشتری را نسبت به واکسن حاوی HBSAg تنها، ایجاد می‌کند<sup>[2,3]</sup>. برخی از افراد دریافت‌کننده واکسن هیپاتیت B قادر به القای پاسخ مناسبی به واکسن نیستند، اما به دلیل محدودیت‌هایی که سولفات آمونیوم (آلوم) دارد و اینکه پاسخ‌های قوی لنفوسیت‌های T کمکی نوع ۱ (Th1) را ایجاد نمی‌کند، نیاز است که در کنار آلوم از ادجوانت‌های دیگری استفاده شود تا هم اثرات جانبی واکسن کاهش یابد و هم افراد فاقد پاسخ به واکسن، پاسخ‌های ایمنی مناسبی به واکسن دهند<sup>[4]</sup>. تغییر فرمولاسیون واکسن یا بهینه‌سازی فرمولاسیون واکسن در این زمینه کمک‌کننده است<sup>[5]</sup>. حتی استفاده از ادجوانت‌های روغنی در این زمینه می‌تواند مفید باشد<sup>[6]</sup> برای مثال استفاده از موتنانید ۷۲۰ در کنار واکسن‌های متعددی منجر به القای پاسخ‌های قوی ایمنی سلولی و همورال شده است<sup>[7]</sup>.

سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ‌های ایمنی اکتسابی نقش بسیار مهمی دارند. مطالعات متعددی نشان می‌دهد که تقویت عملکرد این سلول‌ها در افزایش پاسخ‌های ایمنی اکتسابی بسیار موثر است. در حقیقت این سلول‌ها با تحریک موثر لنفوسیت‌های T به شکل‌گیری بهتر پاسخ‌های ایمنی سلولی و از سوی دیگر با القای انواعی از لنفوسیت‌های T کمکی، به گسترش پاسخ‌های ایمنی همورال کمک می‌کنند<sup>[8,9]</sup>. مشتق پروتئینی خالص (PPD) یک آنتی‌ژن تشخیصی برای عفونت سل بوده و دارای پروتئین‌هایی است که منجر به القای واکنش قوی حساسیت تاخیری می‌شود، PPD با تحریک ترشح سایتوکاین فاکتور نکروزکننده تومور آلفا (TNF-α) موجب تکامل و بلوغ سلول دندریتیک ساخته شده از مونوسیت در انسان‌ها می‌شود. تاثیرات PPD بر سلول‌های دندریتیک نارسی که در حضور GM-CSF و IL-4 تغییر یافته بودند، مشابه با TNF-α بوده و برخی از مطالعات نشان می‌دهند که آنتی‌ژن PPD، هر دو سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی را تنظیم می‌کند<sup>[10,11]</sup>. توانایی PPD در تکامل سلول‌های دندریتیک، ممکن است به اندوتوکسین یا ترکیب بتادی‌گلوکان این عصاره باکتریایی مربوط باشد. به علاوه PPD خالص بدون هیچ ترکیبی به‌عنوان یک محصول مطمئن با استانداردهای لازم در مصارف انسانی شناخته شده است<sup>[12]</sup>. با در نظر گرفتن اثر PPD روی سلول‌های دندریتیک و نقش حیاتی این سلول‌ها در شکل‌گیری پاسخ‌های ایمنی، در این مطالعه برای اولین بار PPD به فرمولاسیون واکسن تجاری هیپاتیت B اضافه شد و سپس کارآیی این واکسن در شکل‌گیری پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال مورد ارزیابی قرار گرفت.

مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان استفاده از PPD در فرمولاسیون واکسن تجاری هیپاتیت B به منظور تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال انجام شد.

### مواد و روش‌ها

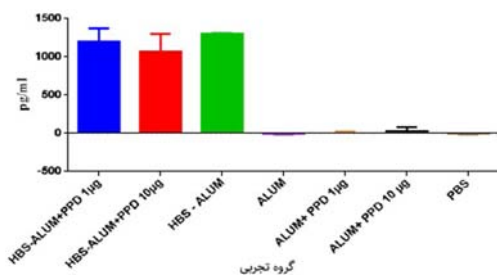
در این مطالعه تجربی، ۶۳ سر موش ب‌الب/سی ماده اینبرد ۶ تا ۸ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۰ گرم (انستیتو پاستور؛ ایران) در بخش اتاق حیوانات انستیتو پاستور کرج در دمای ۲۰ تا ۲۲°C و دارای تهویه مناسب نگهداری شدند. برای کارکردن و کشتن موش‌ها از روش‌های انسانی استفاده و حداقل استرس به حیوان وارد شد.

تقسیم مقادیر کمی IFN- $\gamma$  هر موش به IL-4 همان موش حاصل شد.

**اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgG کل (Total IgG) پس از هر مرحله تزریق واکسن به روش الیزا:** برای سنجش آنتی‌بادی کل در هر مرحله از تزریق واکسن، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن، با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با بافر PBS به چاهک‌های پلیت الیزای ۹۶ خانه‌ای (Greiner؛ آلمان) اضافه و به مدت یک شب در یخچال ۴°C انکوبه شدند تا آنتی‌ژن به کف پلیت بچسبد. پلیت‌ها سه بار با بافر (توئین ۲۰، بافر فسفات‌سالین) شسته و سپس با ۳۰۰ میکرولیتر بافر بلاک‌کننده (شیر خشک بدون چربی ۲٪، بافر فسفات‌سالین، توئین ۲۰)، برای یک ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سرم‌ها (پس از تزریق اول و دوم واکسن از رقت ۱/۲۵ تا رقت ۱/۱۲۰۰ و پس از تزریق سوم از رقت ۱/۱۰۰ تا رقت ۱/۸۳۸۸۶۰۸۰۰) با بافر رقیق‌کننده رقیق شده و سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق‌شده به حفرات اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷°C انکوبه شدند. پلیت‌ها ۵ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شسته و سپس Anti- mouse HRP conjugate (آنزیم پراکسیداز تریچه کوهی کونژوگه‌شده) را ۱/۸۰۰۰ در بافر رقیق‌کننده، رقیق کرده و ۱۰۰ میکرولیتر در تمام حفرات غیر از بلانک ریخته و پلیت‌ها یک ساعت در انکوباتور ۳۷°C انکوبه شدند. شست‌وشوی پلیت‌ها مجدداً ۶ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر صورت گرفت و سپس به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای ۳، ۳، ۵ و ۵ تترامتیل‌بنزیدین (TMB؛ تکسلاپ؛ ایران) در تاریکی در دمای اتاق اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه واکنش با اسیدسولفوریک ۲ نرمال متوقف و شدت جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر، توسط الیزا ریدر خوانده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار Graf pad prism 6.1 انجام شد.

**یافته‌ها**

تزریق واکسن HBS-ALUM و همچنین واکسن فرموله‌شده با دوزهای یک و ۱۰ میکروگرم PPD نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌دار در تولید سایتوکاین IFN- $\gamma$  از خود نشان دادند ( $p < 0.0001$ ). همچنین در تزریق واکسن HBS-ALUM نسبت به گروه‌های HBS-ALUM+PPD 1 $\mu$ g و HBS-ALUM+PPD 10 $\mu$ g از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در تولید سایتوکاین IFN- $\gamma$  مشاهده نشد ( $p > 0.7281$ ; نمودار ۱).



**نمودار ۱)** نتایج حاصل از بررسی سطح سایتوکاین IFN- $\gamma$ . تزریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌دار در تولید سایتوکاین IFN- $\gamma$  را نشان داد.

تزریق واکسن HBS-ALUM موجب افزایش تولید سایتوکاین IL-4 نسبت به گروه HBS-ALUM+PPD 1 $\mu$ g ( $p = 0.583$ )، گروه HBS-ALUM+PPD 10 $\mu$ g ( $p = 0.203$ ) و همچنین گروه‌های

برای انجام پژوهش، موش‌ها به ۷ گروه ۹ تایی در قفس‌های مجزا تقسیم شدند. دوز واکسن در تمامی گروه‌ها ۵ میکروگرم بود و تزریقات سه بار و با فاصله دو هفته و در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر به صورت زیرجلدی انجام شد. گروه‌های تجربی شامل واکسن روتین هیپاتیت B، واکسن فرموله‌شده در PPD (بخش سل انسیتو رازی؛ کرج؛ ایران) در دوزهای ۱ و ۱۰ میکروگرم در کنار گروه‌های کنترل مناسب بود (جدول ۱). دو هفته پس از سومین تزریق واکسن از ناحیه گوشه چشم خونگیری صورت گرفت. سپس جداسازی سرم با سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه انجام و در دمای ۲۰°C تا زمان آزمایش نگهداری شد.

**جدول ۱)** گروه‌های موشی

گروه	فرمولاسیون	تعداد دوز واکسن (میکروگرم)	مسیر تزریق
گروه ۱	HBS-ALUM	۵	زیرجلدی
گروه ۲	HBS-ALUM+PPD 1 $\mu$ g	۵	زیرجلدی
گروه ۳	HBS-ALUM+PPD 10 $\mu$ g	۵	زیرجلدی
گروه ۴	ALUM	۰	زیرجلدی
گروه ۵	ALUM+PPD 1 $\mu$ g	۰	زیرجلدی
گروه ۶	ALUM+PPD 10 $\mu$ g	۰	زیرجلدی
گروه ۷	PBS	۰	زیرجلدی

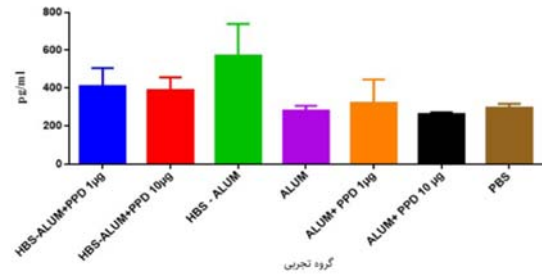
گروه‌هایی که کنترل منفی بودند هیچ دوزی از واکسن را دریافت نکردند، به همین دلیل دوز صفر برای آنها نوشته شده است.

**استخراج سلول‌های طحال موش:** پس از دو هفته از ایمن‌سازی نهایی، موش‌ها نخاعی شده و در شرایط کاملاً استریل، طحال موش‌ها خارج و در پلیت استریل، درون بافر فسفات‌سالین (PBS) حاوی ۲٪ سرم جنین گاوی (FBS؛ Gibco؛ ایالات متحده) سرد قرار گرفت. سپس به آرامی له و سوسپانسیون سلولی به دست آمده سانتریفیوژ شده و گلبول‌های قرمز به کمک بافر لیز، تخریب شدند. سپس سلول‌ها سانتریفیوژ و رسوب سلولی در محیط کشت RPMI-1460 (Gibco؛ ایالات متحده) غنی‌شده با اسیدآمینه غیرضروری سدیم پیرووات، ال-گلوتامین، پنی‌سیلین و استرپتومایسین، سرم جنین گاوی به تعداد ۴×۱۰<sup>۷</sup> سلول در میلی‌لیتر، تنظیم شد و برای انجام آزمایش‌های بررسی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت.

**کشت سلول‌های طحالی و تحریک با آنتی‌ژن:** به منظور آماده‌سازی سوپ سلولی ابتدا پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای (Nunk؛ ایالات متحده) براساس الگوی مورد نظر و طبق گروه‌های تزریق تقسیم‌بندی شد و از سوسپانسیون‌های سلولی ۴×۱۰<sup>۷</sup> سلول در میلی‌لیتر به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت در هر حفره پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد و سلول‌ها به وسیله آنتی‌ژن HBS با غلظت ۵ $\mu$ g/well به مدت ۷۲ ساعت در انکوباسیون با دمای ۳۷°C و در حضور ۵٪ دی‌اکسیدکربن تحریک شدند. سپس، سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و محلول رویی هر چاهک به دو اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰°C نگهداری شد.

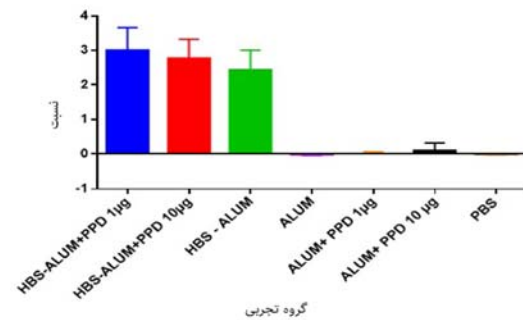
**اندازه‌گیری سایتوکاین‌های اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ )، اینترلوکین-۴ (IL-4) و اینترلوکین-۱۲ (IL-12):** سنجش هر یک از سایتوکاین‌ها با استفاده از کیت‌های تجاری سنجش کمی IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL-12 موشی (Mabtech؛ سوئد) انجام شد. براساس روش ارایه‌شده از سوی شرکت و با استفاده از استانداردهای موجود در کیت مقادیر کمی سایتوکاین بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 در گروه‌های تجربی از

کنترل ( $p < 0.006$ ) شد. گروه‌های  $1\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD و  $10\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌داری در تولید سایتوکاین IL-4 نشان ندادند ( $p > 0.3820$ )؛ نمودار ۲).



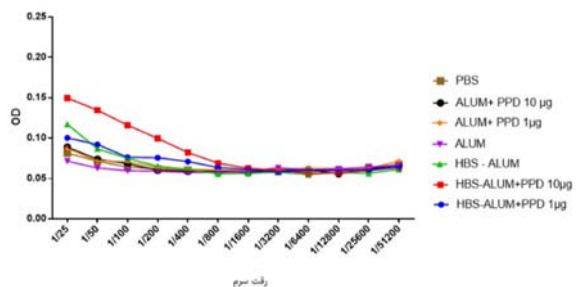
**نمودار ۲)** نتایج حاصل از بررسی سطح سایتوکاین IL-4 در گروه‌های مطالعاتی. گروه دریافت‌کننده واکسن HBS-ALUM در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده واکسن  $1\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD و  $10\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD افزایش معنی‌داری داشت.

تزریق واکسن  $1\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD موجب افزایش معنی‌دار نسبت  $\text{IFN-}\gamma/\text{IL-4}$  به گروه HBS-ALUM شد ( $p = 0.0352$ ). در حالی که در گروه  $10\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD نسبت به گروه HBS-ALUM اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p = 0.3504$ )؛ نمودار ۳).

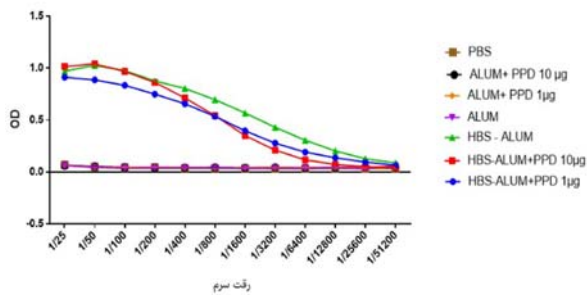


**نمودار ۳)** نتایج حاصل از بررسی نسبت سایتوکاین  $\text{IFN-}\gamma/\text{IL-4}$  در گروه‌های تجزیه

در گروه  $10\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD دو هفته پس از اولین تزریق واکسن، افزایش سطح IgG آنتی‌بادی اختصاصی کل نسبت به گروه HBS-ALUM مشاهده شد که از رقت  $1/25$  تا  $1/200$  افزایش معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.0003$ ). در حالی که گروه HBS-ALUM  $1\mu\text{g}$  ALUM+PPD هیچ گونه اثر افزایشی نسبت به گروه HBS-ALUM نداشت (نمودار ۴). دو هفته پس از دومین تزریق واکسن، سطح IgG آنتی‌بادی اختصاصی کل در گروه HBS-ALUM نسبت به گروه‌های  $10\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD و  $1\mu\text{g}$  HBS-ALUM+PPD از هیچ کدام از رقت‌ها، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0.5480$ )؛ نمودار ۵).

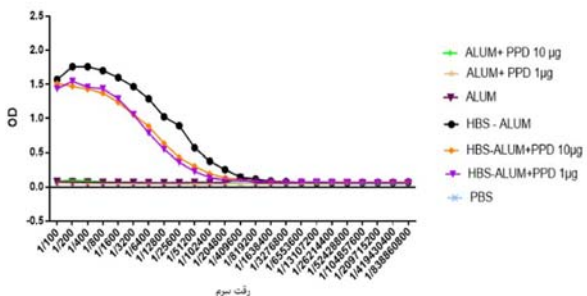


**نمودار ۴)** نتایج حاصل از بررسی سطح آنتی‌بادی IgG کل پس از یک مرحله تزریق واکسن به گروه‌های موشی



**نمودار ۵)** نتایج حاصل از بررسی سطح آنتی‌بادی IgG کل پس از دو مرحله تزریق واکسن به گروه‌های تجزیه

بررسی توتال IgG اختصاصی بعد از سه مرحله تزریق واکسن HBS-ALUM نسبت به فرمولاسیون‌های HBS-ALUM+PPD  $1\mu\text{g}$  و  $10\mu\text{g}$  از رقت  $1/200$  تا رقت  $1/102400$  موجب افزایش معنی‌دار IgG اختصاصی کل شد ( $p < 0.0475$ )؛ نمودار ۶).



**نمودار ۶)** نتایج حاصل از بررسی سطح آنتی‌بادی کل پس از سه مرحله تزریق واکسن

## بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان استفاده از PPD در فرمولاسیون واکسن تجاری هپاتیت B به منظور تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال انجام شد.

هپاتیت یک بیماری شایع است که توسط انواع ویروس‌ها، داروها، الکل و غیره در کبد ایجاد شده<sup>[13]</sup> و یکی از علل اصلی سرطان کبد و دهمین عامل مرگ‌ومیر در جهان است. با وجود پیشرفت‌ها در طب، پیشگیری، تشخیص و درمان هنوز موثرترین روش مبارزه علیه این ویروس واکسیناسیون است<sup>[13]</sup>. در انسان گاهی پس از دریافت سه نوبت واکسن، بسته به سن و وضعیت ایمنی در بیش از ۱۵٪ افراد پاسخ ایمنی مناسب ایجاد نمی‌شود، به این دسته از افراد غیرپاسخگو به واکسن گفته می‌شود<sup>[14, 15]</sup>. بنابراین واکسن هپاتیت در این افراد کارایی لازم را نداشته و نیاز است فرمولاسیون جدیدی از این واکسن ارائه شود. از آنجایی که سلول‌های دندریتیک نقش مهمی در فعال کردن پاسخ‌های ایمنی داشته و PPD در بلوغ و تقویت سلول‌های دندریتیک نقش مهمی دارد<sup>[11]</sup>،

در مطالعه حاضر از PPD در فرمولاسیون واکسن تجاری هپاتیت B برای تقویت پاسخ‌های ایمنی استفاده شد. نتایج بررسی سایتوکاین  $\text{IFN-}\gamma$  در گروه‌های تجزیه نشان داد که واکسن فرموله‌شده در آلوده به همراه PPD با دوزهای یک و  $10\mu\text{g}$  میکروگرم هیچ‌گونه اثر تقویتی در این سایتوکاین نداشت. از سوی دیگر در میزان سایتوکاین IL-4 در گروه HBS-ALUM نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری مشاهده شد، به طوری که با اضافه شدن PPD با دوزهای یک و  $10\mu\text{g}$  میکروگرم به فرمولاسیون واکسن، میزان IL-4 به طور

به دست می‌آید.

### نتیجه‌گیری

وجود PPD در فرمولاسیون واکسن هپاتیت B می‌تواند پاسخ ایمنی را به سمت سلول‌های T کمکی ۱ (Th1) سوق دهد. تزریق اول موجب تقویت پاسخ آنتی‌بادی می‌شود، اما پس از سه تزریق، سیستم ایمنی همورال را سرکوب می‌کند.

**تشکر و قدردانی:** بدین وسیله از تمامی همکاران بخش علوم حیوانات انستیتو پاستور کرج تشکر و قدردانی می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** این پروژه براساس پروتکل کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران انجام شد.

**تعارض منافع:** هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** بهاره گلکاران (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ ستاره حقیقت (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ مهدی مهدوی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪).

**منابع مالی:** این مطالعه حاصل از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی است که در بخش علوم حیوانات انستیتو پاستور کرج انجام شد.

### منابع

- Jadoul M, Goubau P. Is anti-hepatitis B virus (HBV) immunization successful in elderly hemodialysis (HD) patients?. *Clin Nephrol.* 2002;58(4):301-4.
- Wang S, Liu X, Caulfield MJ. Adjuvant synergy in the response to hepatitis B vaccines. *Vaccin.* 2003;21(27-30):4297-306.
- Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: Implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J virol.* 1994;68(3):1418-25.
- Dezfuli HT, Shahbazzadeh D, Eidi A, Bagheri KP, Pakravan N, Amini S, et al. Induction of IFN- $\gamma$  cytokine response against hepatitis B surface antigen using melittin. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2014;7(2):108-17.
- Aghasadeghi MR, Sadat SM, Bahramali G, Hekmat S, Motevali F, Alizadeh S, et al. Evaluating novel adjuvant systems for the induction of humeral and cellular immune responses in hepatitis C virus capsid protein immunization. *Feyz J Kashan Univ Med Sci.* 2010;14(1):26-39. [Persian]
- Mata E, Salvador A, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. Malaria vaccine adjuvants: latest update and challenges in preclinical and clinical research. *BioMed Res Int.* 2013;2013(2013):1-19.
- Aghasadeghi MR, Banifazl M, Aghakhani A, Eslamifar A, Vahabpour R, Ramezani A. No evidence for occult HBV infection in hepatitis B vaccine non-responders. *Iran J Microbiol.* 2014;6(5):350-3.
- Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity.* 2005;23(5):503-14.
- Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med.* 2006;203(3):599-606.

معنی‌داری کاهش یافت. IL-4 سایتوکاین شاخص در القای پاسخ TH2 است<sup>[16]</sup>. کاهش این سایتوکاین در نتیجه فرمولاسیون واکسن با PPD در عمل بیانگر تقویت الگوی پاسخ‌های ایمنی Th1 است. در مرحله بعد برای قضاوت دقیق‌تر الگوی پاسخ ایمنی از نسبت سایتوکاینی IFN- $\gamma$ /IL-4 در گروه‌های تجربی استفاده شد<sup>[17]</sup>. نتایج نشان داد که PPD همراه با ادجوانت آلود موجب افزایش این نسبت شد که تأییدی بر تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی بود.

مطالعات نشان می‌دهند که PPD توان شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمت Th1 را دارد که می‌تواند با افزایش سایتوکاین IFN- $\gamma$  همراه باشد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که اضافه‌کردن PPD به فرمولاسیون واکسن موجب شیفت به الگوی Th1 شد. اگر چه این اثرگذاری با افزایش سایتوکاین IFN- $\gamma$  همراه نبوده بلکه با کاهش سطح سایتوکاین IL-4 و افزایش نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 اثر خود را نشان داد و کاهش سایتوکاین IL-4 و افزایش نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 هر دو به مفهوم تقویت پاسخ‌های Th1 هستند<sup>[17]</sup>. افزایش الگوی پاسخ Th1 با به‌کارگیری PPD در فرمولاسیون واکسن هپاتیت B یک یافته علمی جدید است که تاکنون در این حوزه هیچ مطالعه قابل مقایسه‌ای گزارش نشده است.

از سوی دیگر نتایج حاصل از بررسی Igg اختصاصی کلی نشان داد که پس از یک بار تزریق با فرمولاسیون واکسن HBS-ALUM+PPD 10mg افزایش پاسخ آنتی‌بادی نسبت به گروه HBS-ALUM مشاهده شد. اما استفاده از PPD در تزریق دوم و سوم واکسن نه تنها اثر افزایشی در پاسخ‌های ایمنی همورال نداشت بلکه موجب کاهش معنی‌دار سطح آنتی‌بادی کل نسبت به گروه HBS-ALUM شد که این یافته بیانگر سرکوب پاسخ ایمنی همورال پس از دریافت دوزهای متعدد واکسن فرموله‌شده در PPD بود. این یافته علمی شاید بیانگر آن باشد که استفاده از PPD در فرمولاسیون واکسن برای یک مرحله مفید است تا اینکه از آن برای تمامی مراحل ایمن‌سازی استفاده شود زیرا ممکن است با شیفت بیشتر پاسخ‌های ایمنی سلولی موجب سرکوب ایمنی همورال شود که به دنبال آن پاسخ‌های آنتی‌بادی کاهش می‌یابد، فرمولاسیون واکسن هپاتیت B با PPD موجب کاهش سایتوکاین IL-4 شده، کاهش این سایتوکاین نیز می‌تواند منجر به سرکوب پاسخ آنتی‌بادی شود که در نتایج آنتی‌بادی به وضوح مشاهده شد. مطالعات در مورد رفتار سایتوکاین‌ها نشان می‌دهند که هرگاه سایتوکاین IFN- $\gamma$  در سیستم افزایش یابد سایتوکاین IL-4 سرکوب شده و متعاقباً موجب کاهش پاسخ ایمنی همورال می‌شود<sup>[18]</sup>. در مطالعه حاضر این پدیده در مورد نتایج آنتی‌بادی در گروه واکسن فرموله‌شده با PPD مشهود بود.

در مطالعه حاضر از PPD تجاری برای فرمولاسیون استفاده شد در حالی که PPD حاوی مولکول‌های متعددی است و اثرات تعدیل‌کنندگی متفاوتی دارند به‌گونه‌ای که برخی از آنها سرکوبگر و برخی دیگر محرک سیستم ایمنی هستند<sup>[19]</sup>. شاید استفاده از فراکشن‌های ایمونوژن PPD در فرمولاسیون واکسن نتایج برجسته‌تری از پاسخ‌های ایمنی نشان دهد که می‌تواند در مطالعات بعدی مشخص شود.

با توجه به اینکه PPD از فرکشن‌های ملکول‌های متفاوتی تشکیل شده است که برخی از آنها محرک سیستم ایمنی و برخی سرکوبگر آن هستند، بنابراین اگر در فرمولاسیون مطالعات بعدی از فرکشن‌های ایمونوژن PPD استفاده شود احتمالاً نتایج قوی‌تری

- 15- Zhang X, He P, Hu Z, Wang X, Liang Z. Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen and HB vaccine. *Virology*. 2011;8:78.
- 16- Pelly VS, Kannan Y, Coomes SM, Entwistle LJ, Rückerl D, Seddon B, et al. IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol*. 2016;9(6):1407-17.
- 17- van Haren SD, Dowling DJ, Foppen W, Christensen D, Andersen P, Reed SG, et al. Age-Specific adjuvant synergy: Dual TLR7/8 and mTLC activation of human newborn dendritic cells enables Th1 polarization. *J Immunol*. 2016;197(11):4413-24.
- 18- Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*. 2015;74(2):318-26.
- 19- Glenchur H, Fossieck Jr BE, Silverman M. A comparison of purified protein derivative and some fractions of mycobacterium tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1966;93(1):70-7.
- 10- Pais TF, Silva RA, Smedegaard B, Appelberg R, Andersen P. Analysis of T cells recruited during delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative (PPD) versus challenge with tuberculosis infection. *Immunology*. 1998;95(1):69-75.
- 11- Bagheri K, Delirez N, Moazzeni SM. PPD extract induces the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008;30(1):91-104.
- 12- Shaheen MA, Salem SA, Fouad DA, El-Fatah AA. Intralesional tuberculin (PPD) versus measles, mumps, rubella (MMR) vaccine in treatment of multiple warts: A comparative clinical and immunological study. *Dermatol Ther*. 2015;28(4):194-200.
- 13- Zoutendijk R, Hansen BE, van Vuuren AJ, Boucher CA, Janssen HL. Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss. *J Infect Dis*. 2011;204(3):415-8.
- 14- Alavian SM, Fallahian F, Lankarani KB. The changing epidemiology of viral hepatitis B in Iran. *J Gastrointest Liver Dis*. 2007;16(4):403-6.