

Application of α -Tocopherol in the Hepatitis B Vaccine Formulation in order to Improve Humoral and Cellular Immune Responses

Rahimkhani A.¹ *MSc*, Haghghat S.¹ *PhD*, Mahdavi M.² *PhD*

¹ Department of Microbiology, Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Recombinant Vaccine Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The common hepatitis B vaccination was designed based on alum adjuvant. This adjuvant is failed to stimulate cellular immunity so that, optimization is necessary for better stimulation of cellular immune responses. α -tocopherol is a key component of vitamin E that is considered as immunomodulatory agent to regulate immunity in order to decrease inflammation immune responses. Therefore, in the present study, the effect of α -tocopherol on the improvement of immune responses in hepatitis B vaccination was evaluated.

Materials & Methods: commercial hepatitis B vaccine was formulated with α -tocopherol at the doses of 1, 5, and 10mg. The vaccine was injected into BALB/C mice three times two weeks apart. Ten days after the last injection, blood-drawing was performed from mice groups. The levels of IFN- γ , TNF- α , IL-4, and IL-2 cytokines and IgG total antibody, as well as IgG1 and IgG2a antibody isotypes, were measured by ELISA method.

Findings: Formulated vaccine at the dose of 10mg of α -tocopherol is more potent in the significant increase of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 cytokines and low dose result in improvement of humoral immune response.

Conclusion: Immune response of vaccine formulated with α -tocopherol was dose-dependent and at the dose of 10mg demonstrated a significant increase of Th1 response and at the dose of 1mg result in increase of antibody responses.

Keywords

Hepatitis B [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68006509>];

Adjuvant [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000276>];

Alum [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000534>];

α -Tocopherol [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68024502>];

Vitamin E [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68014810>]

*Corresponding Author

Tel: +98 (21) 66909128

Fax: +98 (21) 66909128

Post Address: Recombinant Vaccine Research Center, Tehran University of Medical Sciences, 16 Azar Street, Tehran, Iran

Mahdavivac@gmail.com

Received: April 29, 2019

Accepted: August 4, 2020

ePublished: September 20, 2020

به‌کارگیری آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون واکسن هیپاتیت B به‌منظور تقویت پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی

آناهیتا رحیم‌خانی MSc

گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ستاره حقیقت PhD

گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مهدی مهدوی* PhD

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

چکیده

اهداف: واکسن رایج هیپاتیت B بر پایه ادجوانت آلوم است که به دلیل نقص در تحریک ایمنی سلولی کارآمد، نیازمند بهینه‌سازی است. آلفا-توکوفرول از اجزای اصلی ویتامین E است که به‌عنوان یک تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی توانایی تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی در جهت کاهش پاسخ‌های التهابی را دارد. از این رو در مطالعه حاضر به بررسی اثر آلفا-توکوفرول بر بهبود پاسخ‌های ایمنی واکسن هیپاتیت B پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: واکسن تجاری هیپاتیت B با دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم از آلفا-توکوفرول فرموله شد. واکسن در سه نوبت به فاصله دو هفته به موش‌های BALB/C تزریق شد. ۱۰ روز پس از آخرین تزریق خونگیری از گروه‌های موشی انجام شد. میزان سایتوکاین‌های $IFN-\gamma$ ، $TNF-\alpha$ ، $IL-4$ ، $IL-2$ و همچنین توتال IgG و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: واکسن فرموله‌شده در دوز ۱۰ میلی‌گرم از آلفا-توکوفرول توانایی بیشتری در افزایش معنی‌دار سایتوکاین‌های $IFN-\gamma$ ، $TNF-\alpha$ ، $IL-2$ و در دوز پایین منجر به تقویت ایمنی هومورال شد.

نتیجه‌گیری: پاسخ‌های ایمنی ایجادشده توسط واکسن به دوز آلفا-توکوفرول وابسته هستند، به طوری که در دوز ۱۰ میلی‌گرم آلفا-توکوفرول افزایش پروفایل سایتوکاینی Th1 و در دوز یک میلی‌گرم منجر به افزایش تیتراژ آنتی‌بادی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: هیپاتیت B، ادجوانت، آلوم، آلفا-توکوفرول، ویتامین E

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۴

*نویسنده مسئول: Mahdavic@gmail.com

مقدمه

ویروس هیپاتیت B (هیپاتیت B) یکی از اعضای خانواده هپادناویریده است که باعث بیماری مزمن یا حاد هیپاتیت، سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما می‌شود [1, 2]. پیشگیری از عفونت هیپاتیت B بر پایه تزریق واکسن است. همچنین واکسن تجاری هیپاتیت B بر پایه ادجوانت آلوم است. سطح حفاظتی با میزان بیشتر از ۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر پس از سه بار ایمونیزاسیون با واکسن تجاری رخ می‌دهد که منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال و تولید آنتی‌بادی می‌شود. اگرچه استراتژی واکسیناسیون قادر است تا میزان عفونت را کاهش دهد، اما در برخی از افراد دریافت‌کننده واکسن پاسخ مناسبی ایجاد

نمی‌شود، چراکه در آنها تیتراژ آنتی‌بادی ضدآنتی‌ژن هیپاتیت B کمتر از ۱۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر پس از ایمونیزاسیون بود [3]. 5]. در حالی که واکسن هیپاتیت B به میزان بالایی ایمونوژن است. اما برخی فاکتورهای مشخص از قبیل پیش‌زمینه ژنتیکی، چاقی، دیالیز، سن و مصرف تنباکو با کاهش پاسخگویی واکسن هیپاتیت B ارتباط دارد [6]. به همین دلیل، ادجوانت‌ها با ویژگی‌های مختلف نقش مهمی در افزایش پتانسیل واکسن از قبیل تاثیر دیو و القای لنفوسیت‌های T دارند. از مدت‌ها پیش، ادجوانت آلوم به‌طور گسترده‌ای در واکسن‌های انسانی استفاده شده است که می‌تواند پاسخ‌های ایمنی هومورال را القا کند. در همین ارتباط، جذب آنتی‌ژن‌ها به داخل آلوم باعث افزایش غلظت موضعی آنتی‌ژن می‌شود. بنابراین ممکن است جذب آنتی‌ژن را به وسیله سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن بالا برد. اجزای آلوم پاسخ‌های ایمنی را از طریق تحریک سلول‌های دندریتیک و فعالیت کمپلمان افزایش می‌دهند. علاوه بر این، القای کموکاین منجر به افزایش فراخوانی سلول‌های ایمنی می‌شود. با این وجود، یکی از نقایص آلوم این است که قادر به تحریک کارآمد ایمنی سلولی نیست [7, 8]. بنابراین تغییر در ادجوانت واکسن هیپاتیت B ممکن است باعث پاسخ‌های بیشتر ایمنی سلولی شود. ادجوانت‌های روغنی نشان داده‌اند که به‌تنهایی تولید آنتی‌بادی را افزایش می‌دهند اما در موقعیت‌های اختصاصی، آنها قادر هستند لنفوسیت‌های T را فعال کنند [9].

از طرفی پژوهش‌های گوناگون نشان می‌دهد که متابولیسم عناصر ریزمغذی مانند مواد معدنی (آهن، سلنیم و غیره) و ویتامین‌ها بر عملکرد سیستم ایمنی اثرگذار است، به شکلی که کمبود و یا اضافه بار این عناصر می‌تواند موجب اختلال در واکنش‌های دفاعی علیه بیماری‌ها و یا ایمنی‌زایی بعد از استفاده از واکسن شود. بنابراین ساختارهایی که بتوانند بر هم‌مؤسز عناصر ریزمغذی در بدن اثر بگذارند قادر خواهند بود سیستم ایمنی را نیز تحت تاثیر خود قرار دهند. از این رو این فرضیه مطرح شده است که با استفاده از این ساختارها می‌توان سیستم ایمنی را تقویت کرد و پاسخ‌دهی به واکسن را با استفاده از اثر شبه ادجوانتی آنها افزایش داد [10, 11]. در همین رابطه، امولسیون‌ها سیستم‌های دوفازی ناپایدار هستند که با توجه به مزیت عمده استفاده از آنها یعنی کاهش دوز آنتی‌ژن و بهبود تیتراژ آنتی‌بادی می‌توانند به‌عنوان ادجوانت در فرمولاسیون واکسن به کار روند. MF59 و AS03 هر دو امولسیون‌های محلول روغن در آب هستند. AS03 نیز در واکسن‌های آنفلوانزای H5N1 و H1N1 به کار برده شده‌اند. AS03 حاوی آلفا-توکوفرول است که با فرمول شیمیایی $C_{29}H_{50}O_2$ و جرم مولی ۴۳۰/۷۱ گرم بر مول شناسایی می‌شود و از اجزای اصلی ویتامین E است. بررسی‌ها نشان داده است که حضور آلفا-توکوفرول در ساختار این ادجوانت توان تحریکی پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال را ارتقا داده است [12]. این ویتامین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار مهمی دارد. چون این ویتامین

pH ایزوالکتریک آلوم و آنتی‌ژن، فرآیند اتصال این دو مولکول در pH برابر ۶/۴ انجام شد. طی یک ساعت آنتی‌ژن با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه روی مگنت به آلوم اتصال برقرار کرد. سپس آلفا-توکوفرول در اتانول الکحل حل شد و در نهایت در غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در یک دوز واکسن به ظرف واکنش اضافه شد و فرآیند مخلوط‌شدن روی مگنت ادامه یافت تا نمونه یکنواخت حاصل شود. برای هر مرحله ایمن‌سازی واکسن با شرایط کاملاً یکسان تهیه شد. همچنین در گروه واکسن بدون آلفا-توکوفرول، از اتانول با شرایط کاملاً یکسان همانند واکسن اصلی حاوی آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون استفاده شد. پس از فرموله‌کردن واکسن تزریقات در سه نوبت به فاصله دو هفته به صورت زیر جلدی انجام شد. حجم هر تزریق ۰.۲۵ میلی‌لیتر معادل ۵ میکروگرم آنتی‌ژن هیپاتیت B (HBsAg) بود که به هر موش تزریق شد. ۱۰ روز پس از آخرین واکسیناسیون موش‌ها، با استفاده از پی‌پت پاستور و یا لوله موئینه از گوشه داخلی چشم آنها خونگیری انجام و در میکروتیوپ جمع‌آوری شد. برای جداسازی سرم ابتدا خون یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا لخته شود و سپس در سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (dragon؛ چین) شد. سرم حاصل با سمپلر (dragon؛ چین) به میکروتیوپ دیگر منتقل و بار دیگر سانتریفیوژ شد و در نهایت سرم عاری از لخته جدا و تا زمان انجام تست الایزا در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

تست الایزا برای سنجش میزان سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-4، IL-2 و TNF- α با استفاده از کیت‌های تجاری اختصاصی اندازه‌گیری IFN- γ ، IL-4، IL-2 و TNF- α موشی (Mabtech؛ سوئیس) انجام شد. روش کار به این شرح است که در تمام چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص الایزا، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی‌های اختصاصی (آنتی‌بادی پذیرنده) IFN- γ ، IL-4، IL-2 و TNF- α با رقت ذکرشده در پروتکل کیت (هر یک از چهار سایتوکاین در چهار پلیت جداگانه) اضافه و به مدت یک شبانه روز در یخچال ۴°C آنکوبه شدند. سپس شست‌وشو با بافر شست‌وشوی بافر فسفات سالین همراه با سرم جنین گاوی و توپین ۲۰ انجام گرفت و ۲۰۰ میکرولیتر بافر بلاک‌کننده (PBS) و توپین ۲۰ ۰/۵% به همراه آلبومین سرم گاوی ۰/۱% به چاهک‌ها اضافه و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق به روی شیکر قرار گرفتند. محتویات داخل چاهک‌ها تخلیه و مرحله شست‌وشو پنج بار تکرار شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم و استانداردهای کیت در چاهک‌ها از غلظت ۱۰۰۰-۸۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر ریخته شد و پلیت‌ها دو ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از شست‌وشوی پلیت‌ها همانند قبل، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی شناساگر با رقت خواسته‌شده در کیت در بافر رقیق‌کننده (PBS) و توپین ۲۰ ۰/۵% به همراه آلبومین سرم گاوی ۰/۱% ساخته و به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از

محلول در چربی است پس در ساختار غشای سلولی وارد می‌شود و آن را از تخریب توسط رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. از این رو هم می‌تواند عمر آنتی‌ژن را ارتقا دهد و هم قادر است آنتی‌ژن را موثرتر به غشای سلول ایمنی پیوند دهد^[13]. در واقع برای جلوگیری از بیماری هیپاتیت B نیاز به واکسنی است که ایمنی هومورال Th2 و ایمنی سلولی Th1 را قویاً ایجاد کند. همان‌طور که گفته شد، ادجوانت آلوم در فرمولاسیون واکسن هیپاتیت B به کار برده شده است ولی تاثیر ناچیزی روی ایمنی سلولی Th1 دارد. بنابراین نیاز به طراحی واکسنی است که بتواند بر محدودیت ادجوانت آلوم غلبه کند و پاسخ Th1 قوی ایجاد کند. طی آزمایش‌ها تاثیر تزریق آلفا-توکوفرول روی ماکروفاژها بررسی و مشخص شد که آلفا-توکوفرول بر روی تنظیم واکنش‌های ایمنی و التهابی از طریق تنظیم عملکرد ماکروفاژ و سلول دندریتیک اثرگذار است. از طرفی سلول‌های دندریتیک برای ایمنی سلولی Th1 اهمیت دارند که باعث فعال‌سازی پاسخ ایمنی سلولی می‌شوند و حضور آلفا-توکوفرول باعث فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک می‌شود. پس حضور آلفا-توکوفرول باعث فعال‌سازی Th1 و در نتیجه ایمنی سلولی قوی‌تر می‌شود^[14]. از این رو در مطالعه حاضر آلفا-توکوفرول به فرمولاسیون واکسن اضافه شد تا جنبه‌های مختلف ایمنی هومورال و خصوصاً سلولی تقویت شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۶۰ سر موش BALB/c ماده اینبرد از انستیتو پاستور کرج خریداری شد. سن این موش‌ها ۶-۸ هفته بود و با وزن تقریبی ۲۰ گرم در اتاق حیوانات در دمای ۲۰-۲۲°C و دارای تهویه مناسب نگهداری شدند.

موش‌ها در ۹ گروه دسته‌بندی شدند. موش‌های هر گروه با علامت منحصر به فرد به وسیله اسیدپیکریک رنگ‌آمیزی و نشانه‌گذاری شدند (جدول ۱). حجم تزریق در همه گروه‌ها ۰.۲۵ میکرولیتر بود.

جدول ۱) گروه‌بندی موش‌ها

گروه	فرمولاسیون	علامت	تعداد
۱	واکسن هیپاتیت B	دو پا	۹
۲	واکسن هیپاتیت+آلفا-توکوفرول ۱ میلی‌گرم	دست چپ	۹
۳	واکسن هیپاتیت+آلفا-توکوفرول ۵ میلی‌گرم	پای راست	۹
۴	واکسن هیپاتیت+آلفا-توکوفرول ۱۰ میلی‌گرم	پای چپ	۹
۵	آلفا-توکوفرول ۱ میلی‌گرم+آلوم	پیشانی	۵
۶	آلفا-توکوفرول ۵ میلی‌گرم+آلوم	پشت	۵
۷	آلفا-توکوفرول ۱۰ میلی‌گرم+آلوم	دو دست	۵
۸	کنترل آلوم	دست راست	۵
۹	PBS	بدون علامت	۵

واکسن نوترکیب هیپاتیت B از انستیتو پاستور کرج و ماده آلفا-توکوفرول از کمپانی سیگما (ایالات متحده) تهیه شدند. فرمولاسیون واکسن با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با آلفا-توکوفرول تهیه شد. بدین منظور، ابتدا براساس خصوصیات

اطمینان ۹۵٪ و عدد $p < 0/05$ به مفهوم معنی‌داری بود و در نهایت نمودارها و جدول‌ها بر مبنای میانگین آماری رسم شدند.

یافته‌ها

بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول ۱۰ میلی‌گرم نسبت به گروه دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلوم و PBS به‌عنوان گروه‌های کنترل منفی افزایش معنی‌داری در سایتوکاین $IFN-\gamma$ مشاهده شد ($p < 0/0412$). همچنین بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول ۵ میلی‌گرم نسبت به گروه‌های کنترل منفی دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلوم و PBS افزایش معنی‌داری در سایتوکاین $IFN-\gamma$ مشاهده شد ($p < 0/0014$). بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول ۱۰ میلی‌گرم نسبت به گروه‌های کنترل منفی دریافت‌کننده آلفا فرمولاسیون HBS-آلوم و گروه‌های کنترل منفی دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلوم و PBS افزایش معنی‌داری در سطح سایتوکاین $IFN-\gamma$ مشاهده شد ($p < 0/0414$ ؛ نمودار ۱-الف).

بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول یک میلی‌گرم نسبت به گروه دریافت‌کننده آلفا ۱ میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلوم و PBS به‌عنوان گروه‌های کنترل منفی افزایش معنی‌داری در سایتوکاین $TNF-\alpha$ مشاهده شد ($p < 0/0150$). بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول ۵ میلی‌گرم نسبت به گروه‌های کنترل منفی دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم و آلوم افزایش معنی‌داری در سطح سایتوکاین $TNF-\alpha$ مشاهده شد ($p < 0/0029$). همچنین بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول ۱۰ میلی‌گرم نسبت به گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBS-آلوم و گروه‌های کنترل منفی دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلوم و PBS افزایش معنی‌داری در سطح سایتوکاین $TNF-\alpha$ مشاهده شد ($p < 0/0360$ ؛ نمودار ۱-ب).

همچنین بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول یک میلی‌گرم نسبت به گروه دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلوم و PBS به‌عنوان گروه‌های کنترل منفی افزایش معنی‌داری در سایتوکاین $IL-2$ مشاهده شد ($p < 0/0055$). بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب با آلفا-توکوفرول ۵ میلی‌گرم نسبت به گروه‌های کنترل منفی دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلوم و PBS افزایش معنی‌داری در سطح سایتوکاین $IL-2$

شست‌وشوی پلیت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر استرپتتاویدین HPR که به نسبت ۱:۱۰۰۰ تهیه شده بود، به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفتند. مجدداً مرحله شست‌وشو صورت گرفت و ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای تترامتیل‌بنزیدین (TMB) به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در تاریکی حدود ۲۰-۱۵ دقیقه انکوبه شدند.

۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (اسیدسولفوریک) به هر چاهک اضافه و بلافاصله مقدار جذب نوری چاهک‌ها با الیزاریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. با توجه به منحنی استاندارد حاصل از جذب نوری چاهک‌های استاندارد، میزان کمی $IFN-\gamma$ ، $IL-4$ ، $IL-2$ و $TNF-\alpha$ مربوط به نمونه‌های مورد آزمایش بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

به‌منظور بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال، تعیین سطح آنتی‌بادی توتال و ایزوتیپ‌ها از طریق آزمون الیزا برای تمامی نمونه‌های سرم انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن که با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با بافر PBS آماده شده بود، در پلیت‌های الیزا ریخته شد. پلیت‌ها به مدت یک شب در یخچال $4^{\circ}C$ انکوبه و سه بار با PBS و توپین ۲۰٪ شست‌وشو داده شدند. سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر بلاک‌کننده (شیر خشک ۲٪) به حفرات ریخته شد و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شدند. مجدداً مرحله شست‌وشو انجام شد. سرم‌ها (از رقت ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۶ رقت) با بافر رقیق‌کننده (شیر خشک ۵٪) رقیق شدند. به حفرات مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سرم رقیق‌شده در بافر رقیق‌کننده، ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور $37^{\circ}C$ انکوبه و سپس پنج مرتبه شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد آنزیم پراکسیداز ترب کوهی کونژوگه به آنتی‌بادی ضدآنتی‌بادی موش کونژوگه (Anti-mouse HRP) به نسبت ۱/۸۰۰۰ در بافر رقیق‌کننده (شیر خشک ۵٪)، رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر در تمام حفرات غیر از بلانک ریخته شد و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ انکوبه شدند. پلیت‌ها ۶ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شست‌وشو برای مدت ۳-۱ دقیقه شست‌وشو شدند. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB ریخته شد و پلیت‌ها ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط تاریک در دمای اتاق قرار داده شدند. برای متوقف‌کردن واکنش به حفرات ۱۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال اضافه شد. پلیت‌ها بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزاریدر قرائت شدند. روش انجام آزمایش برای ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های $IgG1$ و $IgG2a$ مشابه به آنتی‌بادی توتال است.

بعد از اتمام آزمایشات، داده‌های خام گردآوری و از نظر توزیع نرمال و هموزن بودن داده‌ها، توسط آزمون‌های آماری مختلف مانند آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شدند. میانگین تمامی داده‌های دوتایی مربوط به هر آزمایش محاسبه و در آنالیز آماری استفاده شد. آنالیز آماری با آزمون آنالیز واریانس (آنوا) و با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism 6 انجام شد. حدود

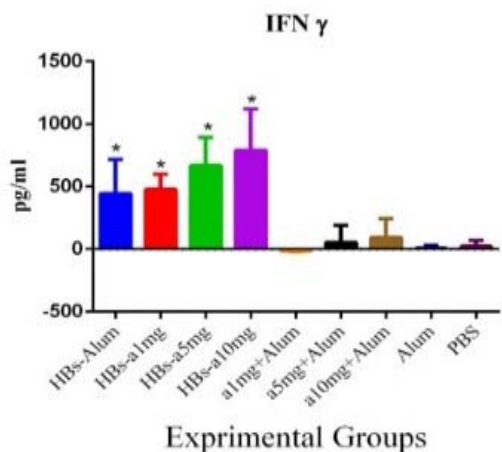
دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت B با آلفا-توکوفرول ۱۰ میلی‌گرم نسبت به گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBS-آلوم و HBS-a یک میلی‌گرم افزایش معنی‌داری در سطح سایتوکاین IL-4 مشاهده شده است ($p < 0.0006$; نمودار ۱-د).

بالاترین سطح پاسخ آنتی‌بادی در فرمولاسیون واکسن به همراه آلفا-توکوفرول یک میلی‌گرم مشاهده شده است که نسبت به واکسن تنها اختلاف معنی‌داری در دو رقت اول از خود نشان داده است. درواقع تزریق واکسن با دوز یک میلی‌گرم آلفا-توکوفرول نسبت به سایر غلظت‌های آن افزایش معنی‌داری در سطح توتال IgG نشان داد (نمودار ۲).

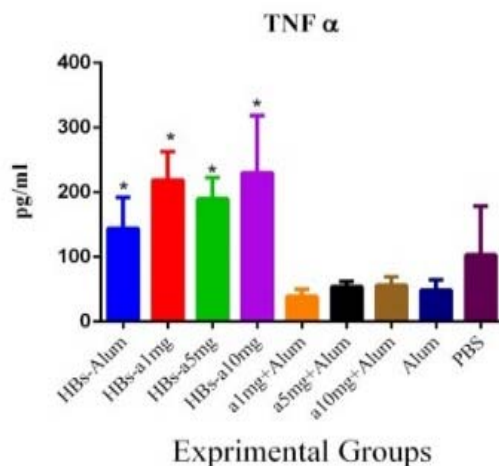
بین گروه‌های دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن با غلظت‌های مختلف آلفا-توکوفرول و واکسن فرموله‌شده در آلوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما بین گروه‌های اصلی دریافت‌کننده واکسن با گروه‌های کنترل منفی افزایش معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.0001$; نمودارهای ۳ و ۴).

مشاهده شد ($p < 0.0002$). همچنین بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت B با آلفا-توکوفرول ۱۰ میلی‌گرم نسبت به گروه‌های کنترل منفی دریافت‌کننده آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۱۰ میلی‌گرم-آلوم و PBS افزایش معنی‌داری در سطح سایتوکاین IL-2 مشاهده شد ($p < 0.0001$; نمودار ۱-ج).

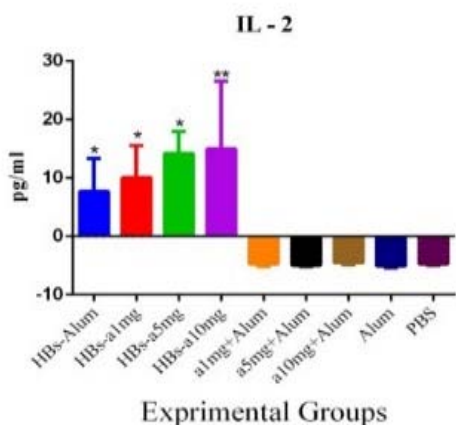
بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت B با آلفا-توکوفرول یک میلی‌گرم نسبت به گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBS-a ۵ میلی‌گرم، HBS-a ۱۰ میلی‌گرم، آلفا یک میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۵ میلی‌گرم-آلوم، آلفا ۱۰ میلی‌گرم-آلوم و PBS به‌عنوان گروه‌های کنترل منفی افزایش معنی‌داری در سایتوکاین IL-4 مشاهده شد ($p < 0.0217$). تنها بین گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون واکسن هپاتیت B با آلفا-توکوفرول ۵ میلی‌گرم نسبت به گروه دریافت‌کننده فرمولاسیون HBS-a یک میلی‌گرم افزایش معنی‌داری در سطح سایتوکاین IL-4 مشاهده شد ($p = 0.0217$). بین گروه



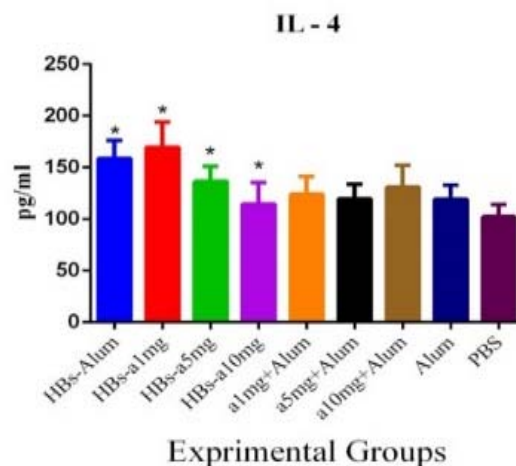
شکل a



شکل b



شکل c



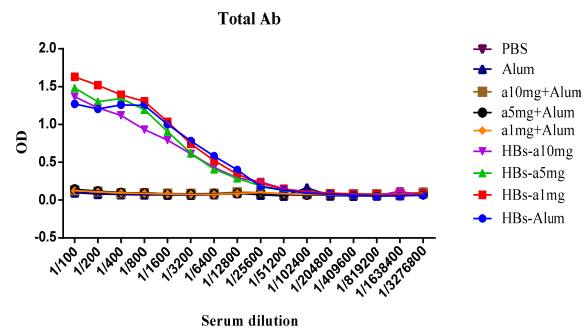
شکل d

نمودار ۱) بررسی الگوی پاسخ‌های سایتوکاینی IFN-γ (a)، TNF-α (b)، IL-2 (c) و IL-4 (d) در گروه‌های تجربی

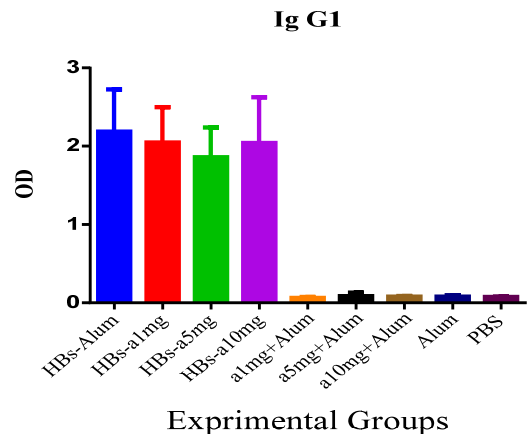
نتایج حاصل از تاثیر آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون واکسن نشان داد که می‌تواند باعث افزایش سایتوکاین $IFN-\gamma$ شود. غلظت 10^6 میلی‌گرم بهترین اثر ادجوانتی را دارد و بنا بر نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت که رفتار ادجوانتی آلفا-توکوفرول در مورد $IFN-\gamma$ وابسته به دوز است. مطالعات نشان می‌دهند که ویتامین E قادر به القای پاسخ‌های $IFN-\gamma$ در مدل واکسن است. مطالعه *رده‌اکریشنان* و همکاران نشان داده است که مصرف ویتامین E در مدل واکسن کزاز موجب تقویت پاسخ‌های $Th1$ شده که با افزایش $IFN-\gamma$ همراه بوده است [16]. *هان* و همکاران نشان دادند که تجویز مشتقات آلفا-توکوفرول به موش‌های مبتلا به تومور منجر به تولید لنفوسیت‌هایی می‌شود که تولیدکننده $IFN-\gamma$ و در مهار رشد تومور بسیار موثر هستند [17]. این یافته‌ها همسو با مطالعه حاضر هستند و نشان می‌دهند که آلفا-توکوفرول توان تعدیل به سمت $Th1$ را دارد.

در مورد سایتوکاین التهابی $TNF-\alpha$ ، بعد از اضافه کردن آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون واکسن باز هم افزایش مشاهده شده و بهترین اثر در غلظت 10^6 میلی‌گرم بوده است. مطالعات نشان می‌دهند که آلفا-توکوفرول کاهشدهنده التهاب و سایتوکاین $TNF-\alpha$ است [16] که این یافته در تناقض با مطالعه حاضر است که می‌تواند موضوع ماهیت آنتی‌ژن، مسیر تزریق، روش فرمولاسیون و فاکتورهای دیگر مطرح باشد.

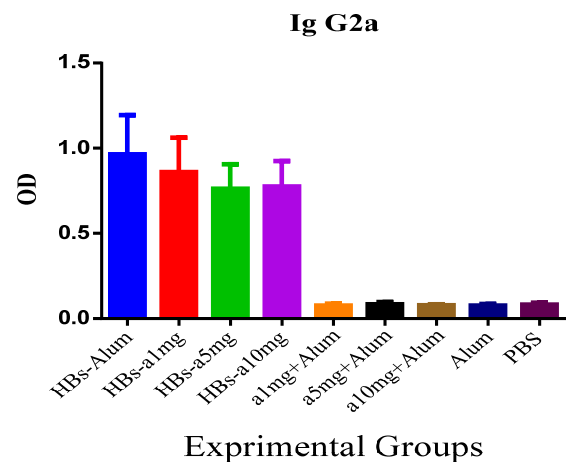
تغییرات سایتوکاین $IL-2$ در اغلب موارد با تغییرات $IFN-\gamma$ همسو است. در این مطالعه افزایش $IL-2$ کاملاً وابسته به دوز بوده ولی در غلظت 5 میلی‌گرم معنی‌دار نشده است. در واقع اضافه کردن آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون واکسن با افزایش ترشح $IL-2$ همراه و در غلظت 10^6 میلی‌گرم کاملاً معنی‌دار است. افزایش سایتوکاین $IL-2$ که تاییدی بر شیفت به سمت پاسخ‌های ایمنی سلولی و ارتقای عملکرد لنفوسیت‌های T است، تاییدی دیگر از رفتار آلفا-توکوفرول بر شیفت به سمت این نوع ایمنی است که در مطالعات گذشته نیز به اثبات رسیده است [16, 17]. همچنین در این مطالعه سایتوکاین $IL-4$ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت که تغییرات واضحی بر روی آن مشاهده نشده است، تنها در دوز یک میلی‌گرم افزایش غیرمعنی‌داری با واکسن روتین نشان داده، در حالی که در دوزهای 5 و 10^6 میلی‌گرم موجب سرکوب معنی‌دار این سایتوکاین شده است. *هان* و همکاران [17] نیز کاهش این سایتوکاین در تجویز آلفا-توکوفرول در موش‌های توموری را گزارش کردند که تاییدی دیگر بر تقویت ایمنی سلولی است. اما نکته جالب در این مطالعه این است که رفتار این ادجوانت وابسته به دوز است و در دوز پایین تقویت‌کننده سایتوکاین $IL-4$ و در دوز بالا تقویت‌کننده $IFN-\gamma$ است. این ویژگی می‌تواند در فرمولاسیون واکسن بسیار مفید باشد، به گونه‌ای که با تغییر دوز آلفا-توکوفرول در فرمول واکسن، می‌توان الگوی پاسخ‌های ایمنی را به سمت پاسخ مطلوب سوق داد.



نمودار ۲) نتایج سطح IgG توتال در گروه‌های مطالعاتی پس از تزریق واکسن



نمودار ۳) نتایج سطح IgG1 در گروه‌های مطالعاتی پس از تزریق واکسن



نمودار ۴) نتایج سطح IgG2a در گروه‌های مطالعاتی پس از تزریق واکسن

بحث

از آنجایی که واکسیناسیون علیه ویروس هپاتیت B نتوانسته است به اندازه کافی پاسخ‌های ایمنی سلولی را برای از بین بردن کامل عفونت تحریک کند، بهینه‌سازی واکسن ضروری به نظر می‌رسد [15]. در مطالعه حاضر تلاش بر این شد تا با استفاده از آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون واکسن، پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در واکسن هپاتیت B تقویت شوند.

- 3- Bruss V, Lu XU, Thomssen R, Gerlich WH. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J*. 1994;13(10):2273-9.
- 4- Seeger Ch, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015;479-480:672-86.
- 5- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005;11(7):791-6.
- 6- Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289-309.
- 7- Cattaneo R, Will H, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J*. 1984;3(9):2191-6.
- 8- Chen MT, Billaud JN, Sällberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, et al. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(41):14913-8.
- 9- Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*. 2001;33(3):751-7.
- 10- Farrell PM, Bieri JG, Fratantoni JF, Wood RE, Di Sant'Agnese PA. The occurrence and effects of human vitamin E deficiency: A study in patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 1977;60(1):233-41.
- 11- Saberi AH, Fang Y, McClements DJ. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *J Colloid Interface Sci*. 2013;391:95-102.
- 12- Riese P, Schulze K, Ebensen T, Prochnow B, A Guzmán C. Vaccine adjuvants: Key tools for innovative vaccine design. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(20):2562-80.
- 13- Couch RB, Bayas JM, Caso C, Mbawuie IN, López CN, Claeys C, et al. Superior antigen-specific CD4+ T-cell response with AS03-adjuvantation of a trivalent influenza vaccine in a randomised trial of adults aged 65 and older. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):425.
- 14- Lima KM, Dos Santos SA, Rodrigues Jr JM, Silva CL. Vaccine adjuvant: It makes the difference. *Vaccine*. 2004;22(19):2374-9.
- 15- Rezaei M, Hosseini SN, Khavari-Nejad RA, Najafi F, Mahdavi M. HBs antigen and mannose loading on the surface of iron oxide nanoparticles in order to immunotargeting: Fabrication, characterization, cellular and humoral immunoassay. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):1543-58.
- 16- Radhakrishnan AK, Mahalingam D, Selvaduray KR, Nesaretnam K. Supplementation with natural forms of vitamin E augments antigen-specific TH1-type immune response to tetanus toxoid. *BioMed Res Int*. 2013;2013:782067.
- 17- Hahn T, Jagadish B, Mash EA, Garrison K, Akporiaye ET. α -Tocopheryloxyacetic acid: A novel chemotherapeutic that stimulates the antitumor immune response. *Breast Cancer Res*. 2011;13(1):R4.
- 18- Karlsson I, Borggren M, Nielsen J, Christensen D, Williams J, Fomsgaard A. Increased humoral immunity by DNA vaccination using an α -tocopherol-based adjuvant. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(8):1823-30.

در مرحله بعد بررسی الگوی پاسخ ایمنی هومورال نشان داده است که آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون واکسن در هر سه غلظت موجب افزایش پاسخ آنتی‌بادی نسبت به واکسن روتین شده، اما بهترین اثر در کمترین غلظت یعنی یک میلی‌گرم مشاهده شده است. این یافته با تغییرات سایتوکاین IL-4 و IFN- γ همسو بوده است که در آن دوز بالا به سمت Th1 و دوز پایین به سمت Th2 و به عبارتی ایمنی هومورال سوق یافته است. مطالعات کارلسون و همکاران^[18] در مدل واکسن ژنتیکی آنفلوانزا نشان داده است که آلفا-توکوفرول در فرمولاسیون واکسن موجب تقویت پاسخ آنتی‌بادی می‌شود که یافته مطالعه حاضر را تایید می‌کند. نتایج ایزوتیپ‌های IgG1 و IgG2a نیز نشان می‌دهد که واکسن فرموله‌شده جدید هر دو ایزوتیپ را پایاپای واکسن روتین القا می‌کند، اما افزایش غلظت آلفا-توکوفرول موجب سرکوب هر دو ایزوتیپ آنتی‌بادی می‌شود.

نتیجه‌گیری

آلفا-توکوفرول قادر است موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال علیه واکسن هپاتیت B شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آلفا-توکوفرول به‌عنوان ادجوانت در دوز ۱۰ میلی‌گرم بهترین تاثیر را برای تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی دارد، در حالی که آلفا-توکوفرول در غلظت پایین (یک میلی‌گرم) موجب تقویت ایمنی هومورال شد. در واقع رفتار آلفا-توکوفرول در پروتکل این واکسن اینگونه است که در غلظت بالا تاثیر بهتری روی ایمنی سلولی دارد و در غلظت پایین‌تر روی ایمنی هومورال تاثیر مثبت دارد که این ویژگی می‌تواند در فرمولاسیون واکسن برای رسیدن به الگوی پاسخ ایمنی مورد نظر مفید باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از تمام افرادی که در مطالعه حاضر همکاری کردند و همچنین از آزمایشگاه تحقیقاتی آرک تشکر ویژه می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: تاییدیه اخلاقی این مطالعه از توسط دانشگاه آزاد واحد پزشکی انجام شد.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: آناهیتا رحیم‌خانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۵٪)؛ ستاره حقیقت (نویسنده دوم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ مهدی مهدوی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: هزینه مطالعه حاضر در قالب طرح توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تامین شده است.

منابع

- 1- Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, et al. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 1999;30(5):890-5.
- 2- Trépo Ch, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014;384(9959):2053-63.