DOI: 10.48305/jims.v41.i737.0835

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۳۷/هفته‌ی اول آذر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۲ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۲۹ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۹/۷

بررسی اثر مونوفسفوریل لیپید A به عنوان یک ادجوانت کمکی بر روی پاسخ‌های ایمنی هومورال علیه عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مدل موشی

مهدی میرشکار[۱]، ستاره حقیقت[۲]، سیده زهرا موسوی[۳]، امیر حسین عبدالغفاری[۴]، محمد حسین یزدی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است، بنابراین توسعه‌ی کاندید واکسن مناسب جهت پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری ضروری است. پروتئین اتولیزین به عنوان یک فاکتور ویرولانس نقش مهمی در تقسیم باکتری دارد. مونوفسفوریل لیپید A (MPLA) به عنوان یک آگونیست Toll-like Receptor 4 در حال حاضر به عنوان ادجوانت یا کمک ادجوانت استفاده می‌شود. در این مطالعه پروتئین اتولیزین همراه MPLA به عنوان کاندید واکسن بررسی شد.

روش‌ها: پروتئین نوترکیب اتولیزین با IPTG القاء و بوسیله‌ی ستون کروماتوگرافی Ni-NTA تخلیص شد. جهت افزایش ایمونوژنیسیته، دو فرم کوادجوانت مونوفسفریل لیپید A بیوژنیک و سنتتیک همراه با آلوم در چهار گروه موشی Balb/c فرموله شد. تزریقات سه بار با فواصل هر دو هفته به صورت زیر جلدی انجام شد. با استفاده از الایزا غیر مستقیم آنتی بادی توتال، ایزوتایپ IgG2a و IgG1 اندازه‌گیری شدند. در ادامه گروه‌های موشی با دوز 5×10^{8}CFU مورد چالش باکتریایی قرار گرفته و تعداد باکتری در ارگان‌های داخلی مورد سنجش قرار گرفت. سرانجام میزان بقاء حیوانات به مدت سی روز ارزیابی شد.

یافته‌ها: آنتی‌بادی توتال و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a در گروه‌های موشی واکسینه شده در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری داشتند. بار باکتریایی درارگان‌های داخلی (کبد، طحال و کلیه) و همچنین میزان مرگ و میر حیوانات در گروه‌های واکسینه بخصوص گروه‌های اتولیزین+آلوم+مونو فسفریل لیپید A بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+مونو فسفریل لیپید A سنتتیک در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که MPLA سنتتیک یک کاندید مناسب جهت بهبود پاسخ ایمنی علیه عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*؛ مونوفسفوریل لیپید A؛ اتولیزین؛ ایمونوژنیسیتی؛ واکسن

ارجاع: میرشکار مهدی، حقیقت ستاره، موسوی سیده زهرا، عبدالغفاری امیر حسین، یزدی محمد حسین. **بررسی اثر مونوفسفوریل لیپید A به عنوان یک ادجوانت کمکی بر روی پاسخ‌های ایمنی هومورال علیه عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مدل موشی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۳۷): ۸۳۵-۸۴۵

مقدمه

امروزه در سراسر جهان عفونت اکتسابی از بیمارستان علاوه بر اینکه عوارض متعددی ایجاد می‌کند، منجر به افزایش مرگ و میر نیز می‌شود (۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) MRSA یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های ایجادکننده‌ی عفونت بیمارستانی در سراسر جهان محسوب می‌شود (۲، ۳). این باکتری از سه محور تقسیم شده و تجمعات نامنظمی از سلول‌هایی خوشه انگوری ایجاد می‌کند. در چند سال اخیر این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام (پنی‌سیلین، متی‌سیلین و اگزاسیلین) و سفالوسپورین‌ها مقاومت یا حساسیت از خود نشان می‌دهد (۳، ۴).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، مکانیسم‌های متعددی جهت فرار از پاسخ سیستم ایمنی دارد. این توانایی بطور عمده ناشی از فاکتورهای ویرولانس می‌باشد. فاکتورهای ویرولانس

۱- دانشجوی دکتری، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استاد، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات واکسن نوترکیب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: ستاره حقیقت: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
Email: setareh_haghighat@yahoo.com

متعددی در ارتباط با عفونت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی شناسایی شده است. اتولیزین (N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase)، به عنوان یک پروتئین سطحی و از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا، یک آنزیم باکتریولیتیک و بالقوه کشنده است که ترکیبات پپتیدوگلیکان را هضم نموده و سلول‌های دختری را پس از تقسیم سلولی از دیواره‌ی سلولی جدا می‌کند (۵، ۶). علاوه بر این، اتولیزین نقش مهمی در تنظیم رشد، لیز سلولی، ترشح پروتئین‌های سیتوپلاسمی و تشکیل بیوفیلم ایفا می‌کند (۳، ۷، ۸).

در دهه‌های اخیر واکسیناسیون به عنوان یکی از روش‌های مؤثر در پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی با *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های مقاوم به درمان چند دارویی، طراحی و گسترش فرمولاسیون جدیدی از این واکسن‌ها که تقویت سیستم ایمنی را به همراه دارد به عنوان یک ضرورت و اولویت مطرح است (۹، ۱۰).

واکسن‌های مختلفی بر پایه‌ی پروتئین علیه عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. با توجه به اینکه مهار اتولیزین منجر به مهار باکتری‌ها می‌شود لذا به عنوان یک آنتی‌ژن می‌تواند در القای پاسخ ایمنی مؤثر باشد و همچنین به عنوان کاندید واکسن *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مطالعات متعددی مورد پژوهش قرار گرفته است (۳، ۸، ۱۱).

از مؤلفه‌های ضروری دیگری که در فرمولاسیون واکسن کاربرد دارد، ادجوانت‌ها یا یاری رسان‌ها هستند که از طریق مکانیسم‌های متعددی منجر به القای پاسخ ایمنی می‌شوند (۶، ۱۲). به عبارت دیگر ایمونوژنیسیته، کارآیی و اثربخشی واکسن‌ها تا حد زیادی وابسته به ادجوانت بکار رفته در فرمولاسیون آن‌ها می‌باشد (۱۱، ۱۳).

اگرچه آلوم به عنوان یک ادجوانت پرمصرف سنتی در فرمولاسیون اکثر واکسن‌ها استفاده شده و مورد تأیید سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA (Food and Drug Administration است، اما تحقیقات نشان داد، جهت افزایش ایمونوژنیسیته و کارآیی آلوم علاوه بر بکارگیری پروتئین‌های نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن، نیاز به یاری رسان‌های دیگر نیز می‌باشد (۳، ۶، ۸).

مونو فسفوریل لیپید A MPLA مشتق از لیپوپلی ساکارید (*Salmonella Enterica* Serovar Minnesota) LPS، به عنوان ادجوانت در بسیاری از واکسن‌های حیوانی و انسانی بکار گرفته شده و به طور اثربخش ایمونوژنیسیته را بهبود و ارتقاء بخشیده است (۱۴-۱۶). MPLA را می‌توان علاوه بر تولید بیوژنیک به صورت سنتتیک نیز سنتز کرد (۱۷). از دیدگاه ایمونولوژی در مستندات متعددی تأکید شده که MPLA عمدتاً از طریق گیرنده‌ی تشخیص الگو یا همان گیرنده‌ی Toll-like 4 فعال می‌شود. از این طریق، لیگاندهای میکروبی و لیگاندهای درون‌زا را شناسایی نموده و لذا پاسخ ایمنی فوری مرتبط به آن‌ها را آغاز و حتی تسریع می‌کند (۱۵، ۱۶، ۱۸). علاوه بر این، MPLA ترشح و آزادسازی سیتوکین، کموکاین و سایر عوامل التهابی را تحریک نموده و از این‌رو می‌توان گفت بیان سلول‌های ایمنی را از طریق سیگنال‌دهی پایین دستی تنظیم می‌کند و از این طریق نقش مهم دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا بخصوص عفونت‌های بیمارستانی دارد (۱۵، ۱۹). علاوه بر این ادجوانت MPLA در کنار کاندید واکسن، اثرات القائی را بر ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد و در همین راستا پاسخ‌های وابسته به لنفوسیت B و T را از طریق فاکتورهای التهابی افزایش می‌دهد (۹، ۲۰). یکی از اثرات مهم MPLA فعال‌سازی و ترشح ایزوتیپ‌های آنتی‌بادی IgG مانند IgG2a و IgG2b می‌باشد که سبب توسعه‌ی پاسخ‌های ایمنی وابسته به بازوی ایمنی Th2 می‌شود. همچنین در مطالعات دیگری بیان شد که MPLA با تحریک و افزایش پاسخ ایمنی وابسته به لنفوسیت T سبب افزایش ترشحات اینترلوکین‌ها از جمله IL-4 و IL-5 شده است، با این حال، تعادل نهایی بین افزایش ترشح ضد التهابی IL-10 و افزایش بالقوه پاسخ‌های ایمنی Th2 به دلیل افزایش تولید IL-4 و IL-5 ممکن است ناشی از تأثیر کلی MPLA باشد (۳).

با توجه به اینکه تاکنون به کاربرد MPLAs به عنوان کوادجوانت جهت درمان عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین پرداخته نشده است، در مطالعه‌ی حاضر تأثیرات کاندید واکسن پروتئین نوترکیب اتولیزین در ترکیب با کوادجوانت مونو فسفریل لیپید A (MPLAs) با دو فرم سنتتیک و بیوژنیک همراه با آلوم در القای پاسخ ایمنی هومورال در مدل موشی طی چالش باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه پارامترهای مربوط به ایمنی هومورال یعنی میزان آنتی‌بادی توتال، ایزوتایپ IgG2a و IgG1 مورد سنجش قرار گرفت. در نهایت میزان باکتریایی در اندام‌های داخلی موش‌ها بررسی شده و میزان بقا به صورت روزانه طی یک ماه مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها

الف) تهیه پروتئین نوترکیب: برای تهیه‌ی پروتئین نوترکیب ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر باکتری *E.coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید ژن اتولیزین pET24a-Autolysin در ۵ سی‌سی محیط کشت LB Broth (مرک، آلمان) به همراه ۵ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین (سیگما، آلمان) (۵۰ mg/ml) کشت شبانه (به عنوان استارتر) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرما گذاری شد. ۱۸ الی ۲۴ ساعت بعد، جهت بیان پروتئین اتولیزین، در یک ارلن که حاوی

۱۰۰ سی‌سی محیط LB استریل حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کاناماسین، یک میلی‌لیتر باکتری *E coli* حاوی پلاسمید مورد نظر (از کشت روز قبل) افزوده شد. پس از ۳ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه و بعد از رسیدن کدورت کشت به OD حدود ۰/۶-۰/۴ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ابتدا مقدار ۱ میلی‌لیتر از آن به درون یک میکروتیوب منتقل شد. با دور ۱۰۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. این رسوب تحت عنوان کنترل قبل القاء جمع‌آوری گردید. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر IPTG (فرمنتاز، آمریکا) جهت القای بیان پروتئین با غلظت یک میلی‌مولار به ارلن فوق اضافه شد و مجدد در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. ۳ ساعت پس از القای این میزان محصول در دو فالکون ۵۰ سی‌سی استریل تقسیم شده و سپس محیط فوق با دور ۱۰۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جهت تأیید پروتئین مورد نظر تست SDS-PAGE قبل و بعد القا انجام شد. مراحل فوق تا رسیدن به میزان پروتئین کافی جهت فرایند فرمولاسیون چندین بار تکرار گردید. پروتئین‌های تخلیص شده برای ادامه‌ی مراحل بعدی کار در ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳، ۸، ۲۱).

ب) تخلیص و تغلیظ پروتئین نوترکیب: از روش دناتوراسیون و شیب pH جهت تخلیص پروتئین نوترکیب اتولیزین استفاده شد. طی هر بار پالایش ۵۰ میلی‌لیتر از رسوب حاصل از محیط کشت حاوی باکتری‌های القای شده با IPTG پس از خروج از فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد در ۵ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده حاوی NaH2PO4:۱۰۰ mM، Tris HCL: ۱۰ mM و Urea: ۸mM با pH = ۸ حل شد. پس از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰×g، مایع فوقانی به لوله‌ی فالکون استریل منتقل و ۵۰۰ میلی‌لیتر از رزین آگارز Ni-NTA (کیاژن، آلمان) به آن افزوده شد. سپس به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق روی دستگاه شیکر قرار گرفت. پس از آن نمونه فوق به یک ستون کروماتوگرافی منتقل شد. پس از رسوب رزین موجود که حدود ۵ دقیقه طول می‌کشید مرحله شستشو دو بار و هر بار با ۴ میلی‌لیتر از بافر شستشو با pH ۶/۳ به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در ستون انجام شد. در نهایت برای هر فرایند، تخلیص ۴ بار و هر بار با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر تخلیص با pH ۴/۵ انجام شد. در نهایت پروتئین تخلیص شده با تکنیک SDS-PAGE (۱۲ درصد) تأیید شد. پس از اتمام فرایند تخلیص، جهت حذف اوره از روش دیالیز پروتئین استفاده شد. فرایند دیالیز با PBS طی مدت ۱ شبانه روز صورت گرفت طی هر ۲ ساعت، تعویض بافر انجام شد. پس از آن کیسه دیالیز حاوی پروتئین‌های محلول در پلیمر پلی‌اتیلن گلیکول قرار گرفت تا مایع اضافی آن‌ها جذب و پروتئین آن تغلیظ شود. در نهایت جهت تعیین غلظت از دستگاه نانو دراپ و تست برادفورد استفاده شد. پروتئین فوق به عنوان آنتی‌ژن در فرمولاسیون کاندیداهای مختلف واکسن مورد استفاده قرار گرفت. پس از تخلیص، پروتئین نوترکیب با استفاده از تست LAL از نظر مقدار اندوتوکسین (LPS) مورد بررسی قرار گرفت (۳، ۸، ۲۱). جهت انجام تست نمونه‌ها به شرکت دارویی آریوژن فارمد ارسال شد.

ج) گروه‌بندی موش‌ها و تزریق واکسن: تعداد ۶۴ موش Balb/c ماده (۲۰-۲۲ گرم، ۶ تا ۸ هفته‌ای) از مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم رازی کرج خریداری شد (البرز، ایران). کلیه‌ی آزمون‌ها تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی را به همراه داشت. حیوانات ده روز قبل از شروع آزمایشات به منظور عادت به شرایط محیطی جدید آزمایشگاهی نگهداری شدند (دسترسی آزاد به آب و غذا، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی). موش‌ها به صورت کاملاً تصادفی به ۴ گروه آزمایشی (هر گروه شامل ۱۶ موش) تقسیم شدند. گروه‌بندی حیوانات به شرح ذیل بود:

گروه اول: پروتئین نوترکیب اتولیزین +آلوم+MPLA سنتتیک (Avanti Polar Lipids، آمریکا)

گروه دوم: پروتئین نوترکیب اتولیزین +آلوم+MPLA بیوژنیک (نیواد فارمد سلامت، ایران)

گروه سوم: پروتئین نوترکیب اتولیزین +آلوم

گروه چهار: (گروه شاهد): PBS

حجم تزریق به هر یک از موش‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر در نظر گرفته شد که خود حاوی ۲۰ میکروگرم اتولیزین، ۲۰ میکروگرم آلوم (آلومینیوم هیدروکسید، InvivoGen، آمریکا) و ۵۰ میکروگرم MPLA سنتتیک، ۲۰ میکروگرم اتولیزین، ۲۰ میکروگرم آلوم و ۵۰ میکروگرم MPLA بیوژنیک، ۲۰ میکروگرم آلوم و ۲۰ میکروگرم اتولیزین و یا بافر PBS استریل (به عنوان گروه شاهد) بود.

تزریقات به گروه‌های موشی در سه نوبت و به فاصله‌ی زمانی هر دو هفته یکبار و به صورت زیر جلدی (S.C.) صورت گرفت (روزهای ۰، ۱۴ و ۲۸). دو هفته بعد از آخرین تزریق از چشم موش‌ها (سینوس رتروارویتال) با پیپت پاستور خونگیری انجام شد. در پایان، سرم‌های موشی جدا شده و برای سنجش آنتی‌بادی و بررسی پاسخ‌های ایمنی در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (۳، ۸، ۲۱).

د) سنجش میزان Total IgG (IgG کل ضد اتولیزین): دو هفته بعد از ایمن‌سازی نهایی و پس از جداسازی سرم حیوانات، آنتی‌بادی‌ها (Total IgG, IgG1, IgG2a) مورد سنجش قرار گرفتند. بدین منظور از روش الایزای ELISA غیرمستقیم استفاده شد. جهت سنجش میزان IgG کل ضد اتولیزین سرمی و مقایسه سطح آنتی‌بادی القا شده ضد اتولیزین نوترکیب، در گروه‌های مختلف بر روی تک تک سرم‌های ایمن (گروه‌های کاندید واکسن) و غیرایمن (گروه شاهد) مراحل زیر انجام گرفت.

۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین اتولیزین با غلظت ۱۰ µg/ml در بافر PBS به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد تا کف چاهک‌ها با آنتی‌ژن اتولیزین بخوبی پوشیده و کوت شود. پس از اتمام مدت زمان انکوبه، چاهک‌ها ۳ بار با بافر PBS-T مورد شستشو قرار گرفت. تمامی چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر بافر مسدودکننده پر شده و به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت سرم‌های ایمن و غیر ایمن به چاهک‌ها اضافه شد (رقت ۱/۵۰ تا رقت ۱/۶۴۰۰). سپس کونژوگه HRP در رقت ۱/۸۰۰۰ در بافر شیر خشک ۰/۵ درصد تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به تمام چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB به هر چاهک اضافه شد، سپس پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در فضای تاریک انکوبه شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ مولار به هر چاهک اضافه و جذب نوری آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (Stat Fax 4200, USA).

ه) سنجش میزان ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2 جهت سنجش ایزوتایپ آنتی‌بادی‌ها یعنی IgG1 و IgG2a از کیت الایزای شرکت سیگما (آلمان) استفاده شد. کلیه‌ی مراحل تعیین غلظت ایزوتایپ آنتی‌بادی‌ها همانند مراحلی بود که در قسمت سنجش تیتر آنتی‌بادی کل بطور کامل توضیح داده شد.

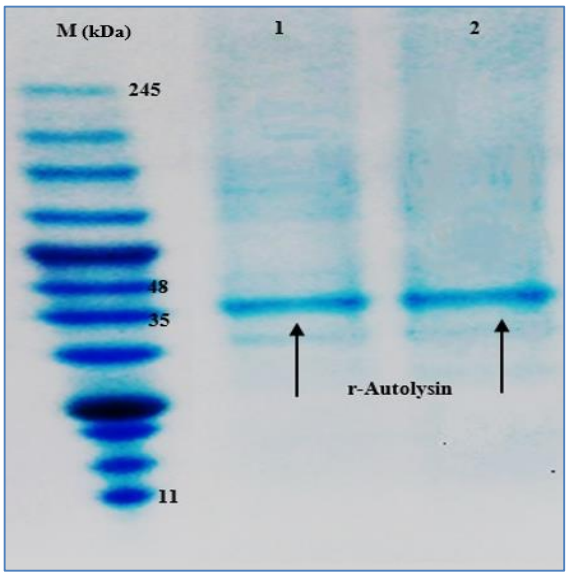
و) چالش باکتریایی: یک هفته بعد از آخرین خونگیری به منظور سنجش میزان بقا و اثربخشی حیوانات ایمن یعنی گروه‌های واکسینه نسبت به غیر ایمن (گروه شاهد)، از دوز کشنده *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه COL Strain استفاده شد. به هر یک از حیوانات ۰/۵ میلی‌لیتر از دوز کشنده LD50 (۵×۱۰^{۸} CFU/gram tissue) *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به صورت صفاقی (IP) تزریق شد. در پایان میزان مرگ و میر حیوانات در هر چهار گروه به طور منظم و روزانه طی ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت (۳، ۸، ۲۱).

ز) بار باکتریایی در ارگان‌های داخلی: ۳ روز پس از تزریق باکتری با دوز کشنده به موش‌ها، ۴ حیوان از هر گروه به طور کاملاً تصادفی انتخاب و به طریق نخاعی بیهوش شدند. تحت شرایط استریل میزان باکتری در رقت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ در ارگان‌های داخلی (کبد، کلیه و طحال) بررسی شد. میزان کلنی‌های رشد یافته در هر گروه، با توجه به رقت آن بر حسب واحد CFU/gram tissue گزارش گردید (۳، ۸، ۲۱).

تحلیل آماری: تحلیل داده‌های تحقیق با نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 9 انجام شد. داده‌های کمی به صورت میانگین (از سه تکرار) و انحراف معیار و داده‌های کیفی به صورت فراوانی و درصد آنالیز شدند. در صورت داشتن توزیع نرمال، از آزمون آنالیز واریانس (Two-way ANOVA) و T-test با سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ استفاده شد.

یافته‌ها

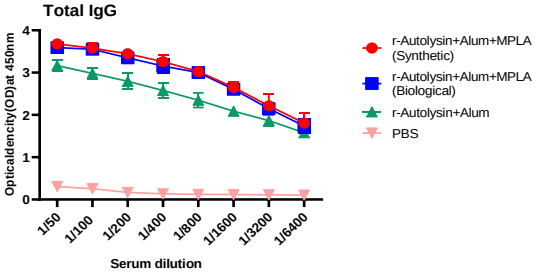
الف) تخلیص پروتئین نوترکیب: بیشترین میزان بیان این پروتئین در دمای ۳۷ درجه، غلظت IPTG یک میلی‌مولار، سه ساعت پس از القا مشاهده شد. نتایج حاصل از تخلیص پروتئین نوترکیب اتولیزین با وزن تقریبی ۴۳ کیلو دالتون بر روی ژل SDS-PAGE (۱۲ درصد) در شکل ۱ نشان داده شده است. فرایند دیالیز با استفاده از پلیمر پلی‌اتیلن گلیکول جهت تغلیظ انجام گرفته و میزان باند پروتئین نوترکیب اتولیزین شدت بیشتری پیدا کرده است. بعد از فرایند دیالیز میزان اندوتوکسین (LPS) توسط تست LAL اندازه‌گیری شد که میزان آن کم‌تر از ۰/۵ EU/ml بود.



شکل ۱. پروتئین نوترکیب اتولیزین (r-Autolysin) با وزن ۴۳ کیلودالتون بر روی ژل (۱۲٪) SDS-PAGE. ستون (M) سایز مارکر، ستون اول پروتئین نوترکیب اتولیزین تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی Ni-NTA و ستون دوم پروتئین نوترکیب اتولیزین پس از فرایند دیالیز را نشان می‌دهند. دو فلش نشان‌دهنده‌ی r-Autolysin هستند.

ب) سنجش IgG کل ضد اتولیزین: نتایج بررسی برای IgG کل ضد اتولیزین نشان می‌دهد که بین همه‌ی گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS در همه‌ی رقت‌ها افزایش معنی‌داری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۰۱$). علاوه بر این، نتایج حاکی از آن است که در گروه دریافت‌کننده‌ی

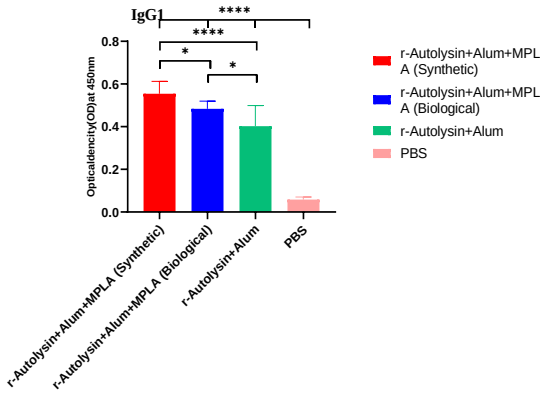
اتولیزین+آلوم با گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک در همه‌ی رقت‌ها اختلاف معنی‌دار است ($P < ۰/۰۰۰۱$). همچنین داده‌ها نشان می‌دهد بین گروه اتولیزین+آلوم و اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک تا رقت ۱/۶۴۰۰ نیز اختلاف معنی‌دار است ($P < ۰/۰۰۰۱$). اما بین گروه اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک در هیچ کدام از رقت‌ها تفاوت معنی‌دار و قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشده است ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۲).



شکل ۲. تیتراسیون IgG آنتی‌بادی‌های ضد اتولیزین. سرم‌های موشی از ۱/۵۰ تا ۱/۶۴۰۰ رقیق شده و سپس تست الایزا (OD = ۴۵۰ nm) انجام شد. گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و بخصوص اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک بالاترین میانگین پاسخ‌های ایمنی IgG کل ضد اتولیزین را از خود نشان داد (میانگین ± انحراف معیار) (n = ۱۰).

ج) سنجش ایزوتایپ آنتی‌بادی IgG1 و IgG2a: همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، بررسی ایزوتایپ IgG1 نشان داد، که بین همه‌ی گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS تفاوت معنی‌دار دیده می‌شود ($P < ۰/۰۰۰۱$). همچنین بین گروه اتولیزین+آلوم و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۰۱$). علاوه بر آن بین گروه اتولیزین+آلوم و اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و همچنین بین گروه اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک این شواهد معنی‌دار است ($P = ۰/۰۱۵۷$ و $P = ۰/۰۴۳۷$).

نتایج حاصل از بررسی ایزوتایپ IgG2a نشان داد (شکل ۴) بین گروه‌های اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد یعنی دریافت‌کننده PBS اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < ۰/۰۰۰۱$). بین گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین+آلوم با گروه PBS تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P = ۰/۰۰۰۲$). همچنین بین گروه اتولیزین+آلوم و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک این نتایج معنی‌دار است ($P < ۰/۰۰۰۱$). همچنین بین گروه اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان IgG2a دیده می‌شود ($P = ۰/۰۱۴۲$).



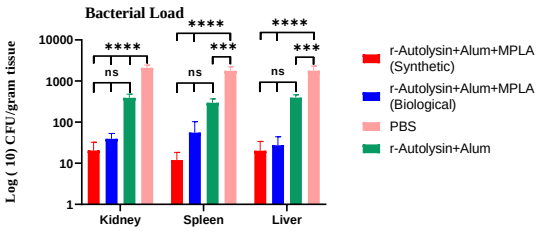
شکل ۳. پاسخ‌های ایمنی آنتی‌بادی. سرم حیوانات هر گروه با استفاده از آنتی‌بادی ضد IgG1 و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه طی سه تکرار با آزمون الایزا (OD = ۴۵۰ nm) انجام و آنالیز شد (n = ۱۰). گروه‌های کاندید واکسن (گروه ایمن) یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+ آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد (گروه غیر ایمن) یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS مقایسه شده‌اند. * و ** به ترتیب $P < ۰/۰۵$ و $P < ۰/۰۰۰۱$ را نشان می‌دهند (میانگین ± انحراف معیار).**

د) بار باکتریایی (میکروبی) در ارگان های داخلی کبد، کلیه و طحال: نتایج بررسی‌ها نشان داد که در ارگان کلیه‌ی تمام گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+ آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS کاهش بار باکتری در کلیه دیده می‌شود ($P < ۰/۰۰۰۱$). اما بین گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+ آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$).

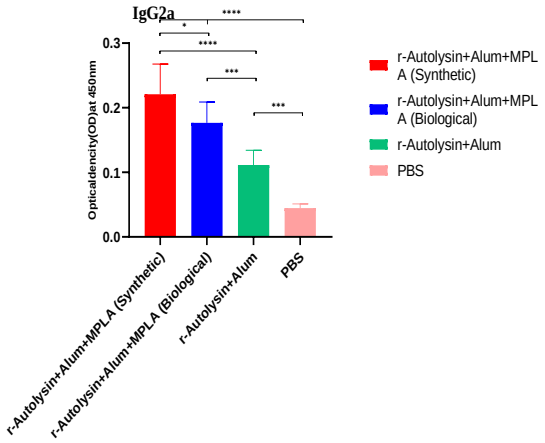
نتایج بررسی در ارگان طحال نشان داد بین گروه‌های اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS بار باکتریایی کمتری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۰۱$). همچنین بین گروه اتولیزین+آلوم و گروه PBS میزان باکتری کمتری دیده شد ($P = ۰/۰۰۰۳$). اما بین گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+ آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک اختلاف معنی‌دار نیست ($P > ۰/۰۵$).

بررسی بار باکتریایی در ارگان کبد نشان داد بین گروه‌های اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS میزان باکتریایی کمتری دیده

شد ($P < ۰/۰۰۰۱$). همچنین بین گروه اتولیزین+آلوم و گروه PBS نیز بار باکتریایی کاهش یافت ($P = ۰/۰۰۰۷$). اما بین گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+ آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۵).



شکل ۵. میانگین تعداد باکتری‌ها در ارگان‌های داخلی کلیه، طحال و کبد موش‌ها در گروه‌های واکسینه و گروه شاهد. نتایج به صورت میانگین تعداد باکتری‌ها در ارگان‌ها به صورت خطای استاندارد نشان داده شده است. در هر گروه ۴ سر موش به صورت کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد. گروه‌های ایمن یعنی واکسینه با گروه غیر ایمن یا همان کنترل یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS از حیث آماری مقایسه شدند. ***: $P < ۰/۰۰۱$ و ****: $P <۰/۰۰۰۱$ (میانگین ± انحراف معیار).

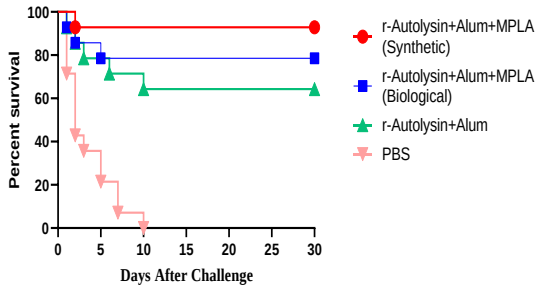


شکل ۴. پاسخ‌های ایمنی آنتی‌بادی. سرم موش‌ها در هر گروه با استفاده از آنتی‌بادی ضد IgG2a و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه طی سه تکرار با آزمون الایزا (OD = ۴۵۰ nm) انجام شد (n = ۱۰). تفاوت در گروه‌های ایمن یعنی اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه غیر ایمن یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS بررسی شده است. *: $P < ۰/۰۵$، ***: $P < ۰/۰۰۱$ و ****: $P < ۰/۰۰۰۱$ را نشان می‌دهند (میانگین ± انحراف معیار).

ه) میزان بقاء در گروه‌های تجربی: در این بخش، بعد از چالش باکتریایی، میزان بقاء در گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+ آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک در مقایسه به گروه شاهد یعنی PBS، در فاصله‌ی زمانی یک ماه به صورت روزانه مورد کنترل و ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که ۷۱ درصد از موش‌هایی که PBS دریافت کرده بودند، در دو روز ابتدایی و ۱۰۰ درصد آن‌ها پس از طی ده روز چالش باکتریایی از بین رفتند. در گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک، اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم میزان مرگ و میر بسیارکمتر بوده و بقاء به ترتیب ۹۲، ۸۷ و ۶۴ درصد در مقایسه با گروه شاهد (PBS) طی ۳۰ روز ثبت شد ($P < ۰/۰۰۰۱$). نتایج نشان داد که در طی این مطالعه گروه‌های کاندید واکسن بخصوص گروه MPLA سنتتیک سطح بالایی از ایمنی در برابر مدل باکتریمی عفونت (دوز کشنده) را در مقایسه با گروه شاهد از خود نشان دادند (شکل ۶).

بحث

با توجه به اینکه عفونت‌های بیمارستانی عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای صنعتی و در حال توسعه محسوب می‌شود و حدود ۷۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی توسط چند پاتوژن اصلی ایجاد می‌شود (۱، ۲۲) و از سوی دیگر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یک کوکسی گرم مثبت و پاتوژن فرصت طلب یکی از پاتوژن‌های مهم این عفونت‌ها محسوب می‌گردد (۲۲).



شکل ۶. نتایج میزان بقای حیوانات در گروه‌های کاندید واکسن در مقایسه با گروه شاهد پس از چالش با دوز کشنده *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه COL Strain را نشان می‌دهد (روش آماری: کاپلان مایر و لوگ رنگ تست).

در این تحقیق، جهت پیشگیری از عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوسی* یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و حذف به موقع آن‌ها از روش واکسیناسیون استفاده شد. امروزه متداول‌ترین ترکیباتی که در واکسیناسیون جهت کنترل عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به کار گرفته می‌شود استفاده از پروتئین‌های نوترکیب است که سبب تحریک و القای پاسخ ایمنی می‌شود (۱۱، ۲۱، ۲۳، ۲۴). در مطالعه‌ی حاضر از پروتئین

نوترکیب اتولیزین (r-Autolysin) به عنوان آنتی‌ژن و کاندید واکسن علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین استفاده شد. استفاده از ادجوانت‌ها یا مخلوطی از آن‌ها در کنار کاندید واکسن مزایای متعددی از جمله افزایش سرعت، قوام، دوام و شدت پاسخ ایمنی دارد (۲۵، ۲۶). ادجوانت آلوم مورد تأیید سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) بوده و در فرمولاسیون اکثر واکسن‌ها استفاده می‌شود (۶). این ماده ادجوانت بسیار خوبی برای القای پاسخ‌های ایمنی هومورال محسوب می‌شود، اما در ارتباط با پاتوژن‌هایی که نیاز به پاسخ ایمنی Th1 دارند نسبتاً بی‌اثر است. تحقیقات نشان داده است، جهت افزایش ایمونوژنیسیته و کارآیی آلوم علاوه بر بکارگیری پروتئین‌های نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن، نیاز به یاری‌رسان‌های دیگر نیز می‌باشد لذا در این پژوهش از ادجوانت آلوم در همه‌ی گروه‌های واکسینه، به منظور افزایش توان القای پاسخ‌های ایمنی (Th1) استفاده شد. در مطالعات دیگری هم از سایر یاری‌رسان‌ها در ترکیب با آلوم و آنتی‌ژن در فرمولاسیون واکسن استفاده شده است که باعث افزایش پاسخ ایمنی می‌شود (۳، ۶، ۸) لذا به منظور افزایش اثربخشی و ایمونوژنیسیته کاندید واکسن، کوادجوانت MPLAs به دو فرم بیوژنیک و سنتتیک برای نخستین بار در این پژوهش جهت افزایش ایمنی‌زایی فرمولاسیون واکسن *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد استفاده قرار گرفت. از آن‌جایی که افزایش بیان آنتی‌بادی‌ها معیار و شاخصی مهم از پاسخ سیستم ایمنی محسوب می‌گردد، پارامترهای مربوط به ایمنی هومورال یعنی پاسخ‌های آنتی‌بادی‌ها یعنی Total IgG، IgG1 و IgG2a سنجیده شدند. همچنین میزان بار باکتریایی در ارگان‌های داخلی و میزان بقاء حیوانات در این گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان تیتر IgG کل ضد اتولیزین و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a در گروه کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم در مقایسه با گروه شاهد پس از سه تزریق متوالی افزایش یافت لذا می‌توان گفت ترکیب اتولیزین+آلوم منجر به تحریک پارامترهای مربوط به ایمنی هومورال شده است. نتایج حاصل شده در این پژوهش در تأیید مطالعات گذشته می‌باشد، که تأکید داشتند واکسیناسیون موش با آنتی‌ژن‌ها (اتولیزین) می‌تواند منجر به ترکیبی از پاسخ‌های ایمنی Th1 و Th2 (ایمنی هومورال و ایمنی سلولی) شود (۸، ۱۱، ۲۴). در همین راستا حقیقت و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که پروتئین نوترکیب اتولیزین به همراه ادجوانت فروند در مدل موشی سبب تحریک پاسخ آنتی بادی کل و افزایش اثرات محافظتی را پس از سومین تزریق ایجاد نموده است. این یافته‌ها، ایمنی‌زایی فرمولاسیون پروتئین اتولیزین در القای پاسخ‌های ایمنی بخصوص ایمنی هومورال را نشان داد (۲۱). علاوه بر این در پژوهش ما مشخص شد، پس از مواجه حیوانات با دوز کشنده *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، میزان بار باکتریایی در ارگان‌های داخلی کلیه، کبد و طحال گروه اتولیزین+آلوم در مقایسه با گروه شاهد از حیث آماری معنی‌دار بوده و بسیار کمتر شده است. همچنین در حیوانات واکسینه با اتولیزین میزان بقاء و زنده‌مانی حیوانات در مقایسه با گروه شاهد بیشتر شد، بدین صورت که میزان بقاء موش‌ها پس از یک ماه از چالش آلودگی باکتریایی ۶۴ درصد بود ولی در گروه شاهد، ده روز پس از چالش آلودگی باکتریایی همگی از بین رفتند. به عبارت دیگر، میزان زنده‌مانی در گروه شاهد صفر بود. این نتایج نیز همراستا با مطالعات کلالی و همکاران در سال ۲۰۱۹ بود که مشخص کردند، آنتی‌بادی ضد اتولیزین می‌تواند در روش ایمنی‌زایی غیرفعال باعث افزایش فعالیت اپسونو فاگوسیتوز و کاهش لود باکتریایی در ارگان‌های داخلی شود، لذا این مولکول یعنی اتولیزین می‌تواند هم در پیشگیری و هم در درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر باشد.

در تحقیقات دیگری مشخص شد ایمن‌سازی با استفاده از اتولیزین علاوه بر از بین بردن باکتری‌ها و کاهش قابل توجه بار باکتریایی در اندام کلیه موش‌ها، آنتی‌بادی‌های خاصی تولید می‌کند که به حذف باکتری‌ها توسط ماکروفاژها یا نوتروفیل‌ها نیز کمک می‌کند (۸، ۱۱، ۲۷). علاوه بر آن در مطالعات حقیقت و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص شد که مهار اتولیزین منجر به مهار رشد باکتری‌ها می‌شود. در همین مطالعه بیان شد که علاوه بر آن آنتی‌بادی‌های خاصی که پس از ایمن‌سازی با اتولیزین ایجاد می‌شوند، می‌توانند باکتری‌ها را از طریق سلول‌های فاگوسیت‌کننده از بین ببرد. همچنین در تحقیقات قبلی ایشان به نقش محافظتی پروتئین‌های نوترکیب اتولیزین، اتولیزین و PBP2a در برابر دوز کشنده *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مدل حیوانی اشاره شده بود. مشخص شد این پروتئین در افزایش ایمونوژنیسیته مؤثر بوده است (۸، ۱۱). با توجه به نتایج مطالعات گذشته و نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در میان آنتی‌ژن‌های مختلف کاندید واکسن *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، پروتئین نوترکیب اتولیزین یک گزینه‌ی مناسبی جهت ایمن‌سازی است (۸، ۱۱).

MPLA در واکسن مالاریا، HIV-1 و بیماری منینگوکوکی نوع B مؤثر بوده و همراه با آلوم به صورت تجاری در واکسن‌های ویروسی هپاتیت و پاپیلومای انسانی استفاده شده است (۲۸، ۲۹). IgG1 پارامتری جهت بررسی پاسخ بازوی ایمنی Th2 و IgG2a پارامتری جهت بررسی بازوی ایمنی Th1 می‌باشد (۳). نتایج حاصل از بررسی پارامتر IgG کل ضد اتولیزین، IgG1 و IgG2a در مطالعه‌ی ما نشان داد که بین همه‌ی گروه‌های کاندید واکسن یعنی

اتولیزین+آلوم، اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک با گروه شاهد یعنی دریافت‌کننده‌ی PBS در همه‌ی رقت‌ها افزایش معنی‌داری وجود دارد. از همه مهم‌تر اینکه در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک و بیوژنیک و اتولیزین+آلوم نیز این تفاوت معنی‌دار بود. می‌توان اینگونه برداشت کرد که MPLA بخصوص فرم سنتتیک آن سبب افزایش ترشح و تولید IgG کل ضد اتولیزین و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a شده و لذا پاسخ‌های دفاعی ایمنی هومورال جهت پاک‌سازی عفونت‌های ناشی از دوز کشنده‌ی باکتری *استافیلوکوکوسی* را تسریع نموده‌اند. مطابق و همراستا با نتایج این پژوهش در مطالعات دیگری (۶، ۹، ۲۰، ۲۹) اثبات شد که ادجوانت MPLA به عنوان یک یاری‌رسان در کنار کاندید واکسن مؤثر واقع شده و اثرات کمک‌کننده بر پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی با فعال کردن فاکتورهای التهابی ایجاد نموده است، این اثرات در پی افزایش تیتر آنتی‌بادی است و لذا توانسته پاسخ سیستم ایمنی را القا و بهبود بخشد (۱۵). پژوهش‌های متعددی دیگر تأکید داشتند که MPLA می‌تواند پاسخ قوی در القا بازوی ایمنی Th2 ایجاد کند که یکی از پیامدهای این فعال‌سازی، تولید انتخابی IgG (آنتی‌بادی‌های IgG2a و IgG2b در موش‌ها) است (۹، ۲۹، ۳۰). در مطالعه‌ی حاضر، گروه MPLA سنتتیک+آلوم+اتولیزین نسبت به سایر گروه‌های مورد آزمایش افزایش معنی‌داری در میزان پاسخ IgG1 و IgG2a مشاهده گردید که نشان‌دهنده‌ی این است که MPLA (بخصوص فرم سنتتیک) می‌تواند هر دو بازوی ایمنی یعنی Th1 و Th2 را القا کند.

همچنین در یافته‌ی دیگر پژوهش ما مشخص شد که در ارگان کلیه، کبد و طحال همه‌ی گروه‌های ایمن یعنی اتولیزین+آلوم، اتولیزین+ آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک در مقایسه با گروه شاهد (گروه غیر ایمن) میزان بار باکتریایی کمتر مشاهده می‌شود. این نتایج نیز همراستا با پژوهش‌هایی بود که بیان نمودند، افزایش سطح IgG2a با کاهش بار میکروبی ناشی از عفونت‌های استافیلوکوکی رابطه‌ی مستقیم دارد (۳، ۸، ۱۱). همچنین در مطالعات گذشته اثبات شد که یکی از مکانیسم‌های دیگر اثرگذاری این ادجوانت روی ایمنی ذاتی و از طریق تحریک Toll Like Receptor 4 (TLR4) بوده و مستقیماً سلول‌های ارائه‌دهنده‌ی آنتی‌ژن (APC) را فعال می‌کند (۱۵، ۱۶، ۱۹). از این طریق به عنوان آگونیست حافظتی اولیه با تسریع تولید آنتی‌بادی پاسخ‌های وابسته به لنفوسیت B و T پس از ایمنی‌سازی را تقویت کرده است (۱۴).

همچنین با بررسی نتایج دیگر این پژوهش مشخص شد که ۷۱ درصد از موش‌هایی که PBS دریافت کرده بودند، در دو روز ابتدایی و ۱۰۰ درصد آن‌ها تا روز ۱۰ پس از چالش باکتریایی از بین رفتند اما در گروه‌های کاندید واکسن یعنی اتولیزین+آلوم+MPLA سنتتیک، اتولیزین+آلوم+MPLA بیوژنیک و اتولیزین+آلوم میزان مرگ و میر کاهش یافته و میزان بقاء به ترتیب ۹۲، ۸۷ و ۶۴ درصد بود که در مقایسه با گروه شاهد طی ۳۰ روز ثبت شد، که این به علت افزایش تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه این باکتری بود. لذا یکی دیگر از یافته‌های مهم این پژوهش این است که گروه‌های کاندید واکسن بخصوص گروه MPLA سنتتیک سطح بالایی از ایمنی را به علت افزایش تولید آنتی‌بادی در برابر باکتریمی در مقایسه با گروه شاهد از خود نشان داده و زنده ماندند. نتایج این پژوهش همراستا با مطالعات گذشته می‌باشد. افزایش IgG1 در پی عفونت‌های استافیلوکوکی موجب فعال شدن سیستم کمپلمان و اپسونیزاسیون می‌شود و از این‌رو با پاک‌سازی این میکروارگانیسم از ارگان‌های داخلی یکی از دلایل احتمالی افزایش بقاء در گروه‌های واکسینه شده نسبت به گروه شاهد بوده است (۳).

بطور کلی یافته‌های این پژوهش برای نخستین بار همگی تأکید دارند که ادجوانت MPLA (بخصوص فرم سنتتیک آن) از یک سو با کاهش بار میکروبی در اندام‌های داخلی و از سوی دیگر با افزایش سطح پاسخ محافظتی یعنی مؤلفه‌های مربوط به ایمنی هومورال که منجر به افزایش بقاء حیوانات شده است، می‌تواند گزینه‌ی مناسبی در فرمولاسیون کاندید واکسن علیه عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوک اورئوس* باشد. به عبارتی دیگر می‌توان گفت MPLAs همراه با پروتئین نوترکیب اتولیزین و آلوم در توسعه و کارآیی کاندید واکسن برای ارتقاء پاسخ ایمنی (افزایش تیتر آنتی‌بادی، افزایش بقاء و کاهش بار میکروبی) مؤثر است لذا استفاده از فرم‌های مختلف مونوفسفریل لیپید A در ترکیب با سایر یاری‌رسان‌ها احتمالاً در بهبود عملکرد و افزایش پاسخ ایمنی بر علیه مقاومت‌های بیمارستانی ناشی از باکتری استافیلوکوکوسی مفید است.

نتیجه‌گیری

بطور کلی یافته‌های ما در این پژوهش مشخص نمود که فرم‌های مختلف MPLA بخصوص فرم سنتتیک آن می‌توانند در کاندید واکسن علیه عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* بکار گرفته شود. اثرات این فرمولاسیون از طریق کاهش بار میکروبی و افزایش پاسخ محافظتی (افزایش پارامترهای ایمنی هومورال و افزایش زنده‌مانی) با چالش آلودگی در مدل موشی اثبات شد. در این مطالعه روشن شد که فرم‌های سنتتیک و بیوژنیک MPLA در ترکیب با r-Autolysin و آلوم باعث بهبود پاسخ ایمنی و عملکرد در برابر عفونت بیمارستانی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* شده است.

اما باید به این موضوع توجه داشت که سنجش آنتی‌بادی‌های Total IgG، IgG1 و IgG2a تنها در محیط برون‌تنی نمی‌تواند نمایانگر نوع پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه عامل پاتوژن باشد، بلکه شبکه‌ای گسترده از پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال و حتی تغییرات بافتی است که نوع پاسخ ایمنی را به درستی تعیین می‌کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آینده این موارد (بررسی پاسخ‌های ایمنی سلولار) بررسی شود تا مکانیسم ایمنی‌زایی کاندید واکسن بطور کامل و دقیق مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله‌ی مقطع دکتری تخصصی فارماکولوژی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران، دانشکده‌ی داروسازی بود. در این پژوهش از امکانات آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی علوم نوین، حیوانخانه‌ی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، آزمایشگاه شرکت دارویی آریوژن فارمد و شرکت دارویی نیواد فارمد سلامت استفاده شد.

References

1. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5(7): 509-14.
2. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clin Microbiol Rev 2013; 26(2): 185-230.
3. Ranjbariyan A, Haghighat S, Yazdi MH, Arbabi Bidgoli S. Synthetic selenium nanoparticles as co-adjuvant improved immune responses against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. World J Microbiol Biotechnol 2023; 39(1): 16.
4. Tiwari KB, Gatto C, Walker S, Wilkinson BJ. Exposure of Staphylococcus aureus to targocil blocks translocation of the major autolysin Atl across the membrane, resulting in a significant decrease in autolysis. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62(7): e00323-18.
5. Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated Staphylococcus aureus biofilm phenotype. Infect Immun 2011; 79(3): 1153-65.
6. Mortazavi SS, Haghighat S, Mahdavi M. Recombinant PBP2a of methicillin-resistant S. aureus formulation in Alum and Montanide ISA266 adjuvants induced cellular and humoral immune responses with protection in Balb/C mice. Microb Pathog 2020; 140: 103945.
7. Pasztor L, Ziebandt A-K, Nega M, Schlag M, Haase S, Franz-Wachtel M, et al. Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins. J Biol Chem 2010; 285(47): 36794-803.
8. Haghighat S, Siadat SD, Sorkhabadi SMR, Sepahi AA, Mahdavi M. A novel recombinant vaccine candidate comprising PBP2a and autolysin against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus confers protection in the experimental mice. Mol Immunol 2017; 91: 1-7.
9. Casella CR, Mitchell TC. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. Cell Mol Life Sci 2008; 65(20): 3231-40.
10. Alemalhoda D, Ajamian F, Khorasani A, Haghighat S, Amreie MM, Moghadas FSS, et al. Formulation of FMD vaccine in Naloxone/Alum mixture: A potency study. bioRxiv 2022.
11. Haghighat S, Siadat SD, Sepahi AA, Mahdavi M. Recombinant PBP2a/autolysin conjugate as PLGA-based nanovaccine induced humoral responses with opsonophagocytosis activity, and protection versus methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Iran J Basic Med Sci 2022; 25(4): 442-50.
12. Pérez O, Romeu B, Cabrera O, González E, Batista-Duharte A, Labrada A, et al. Adjuvants are key factors for the development of future vaccines: lessons from the finlay adjuvant platform. Front Immunol 2013; 4: 407.
13. Schijns VEJC, Lavelle EC. Trends in vaccine adjuvants. Expert Rev Vaccines 2011; 10(4): 539-50.
14. Chen C, Zhang C, Li R, Wang Z, Yuan Y, Li H, et al. Monophosphoryl-lipid A (MPLA) is an efficacious adjuvant for inactivated rabies vaccines. Viruses 2019; 11(12): 1118.
15. Di Lorenzo F, Kubik Ł, Oblak A, Lore NI, Cigana C, Lanzetta R, et al. Activation of Human Toll-like receptor 4 (TLR4)· myeloid differentiation factor 2 (MD-2) by hypoacylated lipopolysaccharide from a clinical isolate of Burkholderia cenocepacia. J Biol Chem 2015; 290(35): 21305-19.
16. Gupta A, Cooper ZA, Tulapurkar ME, Potla R, Maity T, Hasday JD, et al. Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release. J Biol Chem 2013; 288(4): 2756-66.
17. Han Y, Li Y, Chen J, Tan Y, Guan F, Wang X. Construction of monophosphoryl lipid A producing Escherichia coli mutants and comparison of immuno-stimulatory activities of their lipopolysaccharides. Mar Drugs 2013; 11(2): 363-76.
18. García-González PA, Maggi J, Schinnerling K, Sepúlveda-Gutiérrez A, Soto L, Neira O, et al. Regulation of tolerogenic features on dexamethasone-modulated MPLA-activated dendritic cells by MYC. Front Immunol 2019; 10: 1171.
19. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. Nature 2009; 458(7242): 1191-5.
20. Nguyen QT, Kim E, Yang J, Lee C, Ha DH, Lee CG, et al. E. *coli*-Produced Monophosphoryl Lipid a

Significantly Enhances Protective Immunity of Pandemic H1N1 Vaccine. Vaccines (Basel) 2020; 8(2): 306.
21. Haghighat S, Siadat SD, Sorkhabadi SMR, Sepahi AA, Mahdavi M. Cloning, expression and purification of autolysin from methicillin-resistant Staphylococcus aureus: potency and challenge study in Balb/c mice. Mol Immunol 2017; 82: 10-8.
22. Rodríguez-Baño J, López-Prieto MD, Portillo MM, Retamar P, Natera C, Nuño E, et al. Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. Clin Microbiol Infect 2010; 16(9): 1408-13.
23. Pollard AJ, Perrett KP, Beverley PC. Maintaining protection against invasive bacteria with protein–polysaccharide conjugate vaccines. Nat Rev Immunol 2009; 9(3): 213-20.
24. Patterson J, Kagina BM, Gold M, Hussey GD, Muloiwa R. Comparison of adverse events following immunisation with acellular and whole-cell pertussis vaccines: A systematic review. Vaccine 2018; 36(40): 6007-16.
25. Geall A, Settembre E. Immunogenic combination compositions and uses thereof. Google Patents; 2018.
26. Reed SG, Hsu FC, Carter D, Orr MT. The science of vaccine adjuvants: advances in TLR4 ligand adjuvants. Curr Opin Immuno 2016; 41: 85-90.
27. Kalali Y, Haghighat S, Mahdavi M. Passive immunotherapy with specific IgG fraction against autolysin: analogous protectivity in the MRSA infection with antibiotic therapy. Immunol Lett 2019; 212: 125-31.
28. Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG. Adjuvants for human vaccines. Curr Opin Immunol 2012; 24(3): 310-5.
29. Patil HP, Murugappan S, Ter Veer W, Meijerhof T, De Haan A, Frijlink HW, et al. Evaluation of monophosphoryl lipid A as adjuvant for pulmonary delivered influenza vaccine. J Control Release 2014; 174: 51-62.
30. Cheng R, Fontana F, Xiao J, Liu Z, Figueiredo P, Shahbazi M-A, et al. Recombination monophosphoryl lipid A-derived vacosome for the development of preventive cancer vaccines. ACS Appl Mater Interfaces 2020; 12(40): 44554-62.

DOI: *10.48305/jims.v41.i737.0835*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 737, 1st Week, December 2023**

Received: 13.07.2023 Accepted: 20.11.2023 Published: 28.11.2023

Investigating the Effect of Monophosphoryl Lipid A as a *Co-Adjuvant* on Humoral Immune Response against *Staphylococcus Aureus* Infection in a Mouse Model

Mehdi Mirshekar[1], Setareh Haghighat[2], Seyedeh Zahra Mousavi[3], Amir Hossein Abdolghaffari[4], Mohammad Hossein Yazdi[5]

Original Article

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is one of the leading causes of nosocomial infections, therefore, it is necessary to develop a suitable vaccine candidate to prevent infections caused by this bacterium. Autolysin protein as a virulence factor plays an important role in bacterial division. Monophosphoryl lipid A (MPLA) as a Toll-like receptor 4 agonist is currently used as an adjuvant. In this study, autolysin protein along with MPLA was investigated as a vaccine candidate.

Methods: Recombinant autolysin was expressed with IPTG and purified by Ni-NTA affinity chromatography. To increase the immunogenicity of vaccine candidates, Monophosphoryl lipid A (biologic and synthetic) was formulated in combination with Alum in four groups of Balb/c mice. Animals were injected subcutaneously three times at intervals of two weeks. Total IgG and IgG1, IgG2a isotype antibodies were measured in sera by indirect ELISA technique. Then, experimental mice were challenged with a sub-lethal dose of *Staphylococcus Strain* (5×10^8 CFU) and following that, the number of bacteria from internal organs was assessed. Also, the survival rate was monitored daily for 30 days.

Findings: Total IgG, IgG1, and IgG2a isotype antibody levels were significantly improved in vaccinated groups in comparison to the control group. Bacterial burden in the internal organ (Liver, spleen, and kidney), and animal mortality of the vaccinated group especially r-Autolysin+Alum+MPLA Synthetic and r-Autolysin+Alum+MPLA biologic were decreased in comparison to the control group.

Conclusion: We concluded that synthetic MPLA is a reliable candidate for immune response improvement against *Staphylococcal* infection.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Monophosphoryl lipid A; Autolysin; Immunogenicity; Vaccines

Citation: Mirshekar M, Haghighat S, Mousavi SZ, Abdolghaffari AH, Yazdi MH. **Investigating the Effect of Monophosphoryl Lipid A as a *Co-Adjuvant* on Humoral Immune Response against Staphylococcus Aureus Infection in a Mouse Model.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(737): 835-45.

1- PhD Student, Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
5- Associate Professor, Biotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Corresponding Author: Setareh Haghighat, Associate Professor, Department of Microbiology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Email: haghighat.s@iaups.ac.ir