

## ارزیابی الگوی سایتوکائینی مدل حیوانی به دنبال ایمونیزاسیون با کمپلکس لیپو پلی ساکارید بروسلا آبورتوس S99 - وزیکول غشاء خارجی نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B

دکتر سید داور سیادت<sup>۱</sup>، هدی شیردست<sup>۲</sup>، دکتر محمد رضا آقاصادقی<sup>۳</sup>، دکتر داریوش نوروزیان<sup>۴</sup>، دکتر  
سید محمد اطیابی<sup>۵</sup>، سید مهدی سادات<sup>۶</sup>، ساناز سلیمانیه<sup>۲</sup>، علی شریفیات<sup>۶</sup>، ارفع مشیری<sup>۷</sup>

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول: استادیار باکتری شناسی پزشکی، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. E-mail: d.siadat@gmail.com

<sup>۲</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

<sup>۳</sup> استادیار بیوتکنولوژی پزشکی، گروه هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران <sup>۴</sup> دانشیار بیوشیمی، گروه پیلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

<sup>۵</sup> استادیار بیوفیزیک-بیوشیمی، گروه پیلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران <sup>۶</sup> کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، گروه هیاتیت و ایدز، انستیتو

پاستور ایران <sup>۷</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** پژوهش‌ها نشان می‌دهد که لیپوپلی ساکارید (LPS) بعنوان مهمترین ساختمان آنتی ژنیکی سوبه‌های صاف بروسلا، کاندیدای مناسبی برای طراحی واکسن‌های زیرواحدی است. از طرفی کاربرد ادجوانت‌های با منشأ میکروبی در القاء پاسخهای ایمنی سبب طراحی نسل جدید واکسنهای زیرواحدی شده است که نمونه آن وزیکول غشای خارجی (Outer Membrane Vesicle: OMV) نیسریا مننژیتیدیس است. وزیکول غشای خارجی باعث افزایش عیار آنتی بادی از کلاس IgM و IgG علیه آنتی ژنی می‌شود که به همراه آن تزریق شده است. در این تحقیق، تاثیر کمپلکس غیر کوالان LPS+OMV در القای ایمنی سلولی با ارزیابی مقدار تولید و ترشح IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL-10 بررسی و الگوی فعالسازی زیر گروه های Th<sub>1</sub> و Th<sub>2</sub> تعیین گردید.

**روش کار:** لیپو پلی ساکارید توسط روش بهینه سازی شده فنلی تخلیص شد و سپس برنامه ایمونیزاسیون در سه گروه شش تایی موش BALB/c در روزهای ۰، ۱۴، ۲۸ و ۴۲ به صورت زیرپوستی با LPS بروسلا آبورتوس به تنهایی، LPS به همراه ادجوانت فروند و کمپلکس LPS بروسلا آبورتوس و OMV نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B انجام گردید. پس از تهیه سوسپانسیون سلول‌های طحالی، عیار سایتوکائین های IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL-10 با روش الایزا بررسی گردید.

**یافته‌ها:** ایمونیزاسیون با LPS بروسلا آبورتوس به تنهایی باعث القاء معنی دار عیار IFN- $\gamma$  نسبت به دو گروه دیگر (LPS+FA و LPS+OMV) شد ( $p < 0.05$ ) در حالی که عیار IL-4 و IL-10 در تمام گروه‌ها افزایش اندکی نشان داد. اگرچه به دنبال تزریق کمپلکس LPS+OMV در مقایسه با LPS عیار IL-4 و IL-10 افزایش یافته است ولی در همین گروه نیز عیار IFN- $\gamma$  در مقایسه با IL-4 و IL-10 بیشتر است.

**نتیجه گیری:** در هر سه گروه، حیوانات ایمونیزه شده دارای عیار سرمی بالای IFN- $\gamma$  در مقایسه با IL-4 و IL-10 می‌باشند. افزایش IFN- $\gamma$  به دنبال ایمونیزاسیون مدل حیوانی با LPS (به تنهایی، به صورت کمپلکس با OMV و به همراه ادجوانت) نشان دهنده پاسخ‌های سلولی Th<sub>1</sub> است که باعث افزایش فعالیت سلول‌های پلی مورفونوکلتر و در نتیجه تسهیل پاکسازی عفونت می‌شود. عیار کمتر IL-4 و IL-10 در مقایسه با IFN- $\gamma$  که نشان دهنده مهار پاسخ سلول‌های Th<sub>2</sub> می‌باشد در هر سه گروه به دنبال ایمونیزاسیون با LPS مشاهده می‌شود که می‌تواند به عنوان عاملی مؤثر در کارآیی واکسن زیر واحدی بروسلا (بر پایه LPS) مطرح گردد چراکه پاسخ سلول‌های Th<sub>2</sub> اساساً در ساز و کارهای دفاعی علیه بروسلا نه تنها کاربردی ندارد بلکه با مهار جمعیت‌های مؤثر از سلول‌های Th (Th<sub>1</sub>) باعث افزایش احتمال بقای درون سلولی این میکروارگانیسم می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** بروسلا آبورتوس؛ لیپو پلی ساکارید؛ نیسریا مننژیتیدیس؛ وزیکول غشای خارجی؛ اینترفرون گاما؛ اینترلوکین ۴؛ اینترلوکین ۱۰

## مقدمه

بروسلوز مهمترین بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام (زئونوز) است که در اثر آلودگی با بروسلا به وجود می‌آید. این بیماری انتشار جهانی دارد و باعث خسارات اقتصادی زیاد به دامداران و تهدید سلامتی جوامع انسانی می‌شود [۱]. با این که عفونت در بسیاری از مناطق مثل خاورمیانه، آمریکای مرکزی و جنوبی و برخی از نواحی اروپا در حوزه دریای مدیترانه گسترش زیادی دارد، واکسن انسانی موثر و تأیید شده علیه این بیماری وجود ندارد [۲-۴].

امروزه کنترل بیماری بروسلوز بر سه اصل کشتن دام‌های آلوده، پاستوریزه کردن محصولات لبنی و واکسیناسیون استوار است. واکسیناسیون دام‌ها بر پایه تلقیح سویه‌های زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوس<sup>۱</sup> (45/20,S19) و بروسلا ملیتنسیس<sup>۲</sup> (Rev1) است که استفاده از این واکسن‌ها در دام با محدودیت‌هایی همراه است [۵،۶]. همچنین واکسن‌های بروسلوز انسانی شامل باکتری غیر فعال شده و یا سویه‌های زنده تخفیف حدت یافته با دو مشکل اساسی مواجه اند: نخست آنکه گاهی ایجاد بیماری می‌نمایند و دوم آنکه با واکنش‌های ازدیاد حساسیت ناخواسته همراهند. در همین راستا، در سال‌های اخیر ایمنی‌زایی با آنتی‌ژن‌های مختلفی از گونه‌های بروسلا به شکل مونووالان طبیعی، کونژوگه و یا نوترکیب مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است [۷،۸].

از بین عوامل ویروالانس این ارگانیزم، لیپوپلی ساکارید (LPS)<sup>۳</sup> به عنوان عامل ویروالانس اصلی شناخته شده است و سویه‌های جهش یافته و فاقد این جزء از دیواره سلولی فاقد ویروالانس و توان بقای درون سلولی هستند. همچنین LPS به لحاظ

ایمونولوژیک، آنتی‌ژن اصلی سطح سلولی بروسلا محسوب می‌شود [۹،۸]. به همین دلیل امروزه استفاده از LPS بروسلا به دلیل داشتن خواص آنتی‌ژنیک و ایمونوژنیک قوی جهت طراحی و تولید یک واکسن موثر انسانی بسیار مورد ارزیابی و مطالعه قرار می‌گیرد [۹،۱۰].

در اوایل سیر عفونت، سایتوکاین IL-12، تولید و ترشح انترفرئون گاما (IFN- $\gamma$ ) را افزایش داده که منجر به افزایش پاسخ‌های سلولی Th<sub>1</sub> و تحریک فعالیت ماکروفاژها می‌گردد. ماکروفاژها فعال شده با تولید اکسید نیتریک (NO) مقاومت در مقابل بروسلوز را تقویت می‌کنند و همچنین سبب تولید IgG2a می‌شود و با فعالسازی کمپلمان عفونت‌پاسخ‌سازی می‌شود [۱۰]. در بروسلوز تعادل بین پاسخ‌های Th<sub>1</sub> و Th<sub>2</sub> سبب کنترل یا پیشرفت بیماری می‌گردد. در مجموع سایتوکاین‌های IL-4 و IL-10 سبب تنظیم منفی در عملکرد ماکروفاژ و تولید IFN- $\gamma$  و سوق پاسخ‌های ایمنی به سمت ایمنی همورال (Th<sub>2</sub>) می‌شوند [۱۱،۱۲]. در نتیجه در طراحی واکسن بروسلوز، تحریک و راه‌اندازی پاسخ‌های اختصاصی سلولی در کنار پاسخ‌های همورال اصلی‌ترین استراتژی است [۱۲].

ادجوانت‌ها سبب تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی و افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شوند [۱۳،۱۴]. در این مطالعه وزیکول غشای خارجی (OMV)<sup>۴</sup> نیسریا مننژیتیدیس<sup>۵</sup> به عنوان ادجوانتی با منشاء میکروبی انتخاب شد که بر اساس روش پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی (۱۹۶۷)، بی‌زیانی مصرف OMV خالص با انجام آزمون تب‌زایی در خرگوش به اثبات رسیده است [۱۵].

در این تحقیق ارزیابی القای IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL-10، به دنبال ایمونیزاسیون کمپلکس غیر کووالان

<sup>1</sup> *Brucella abortus*

<sup>2</sup> *Brucella melitensis*

<sup>3</sup> Lipopolysaccharide

<sup>4</sup> Outer membrane vesicle

<sup>5</sup> *Neisseria meningitidis*

اتانول، سدیم استات اشباع و تری کلرو استیک اسید به فاز فنلی، LPS استخراج گردید.

نمونه استخراج شده مورد ارزیابی های شیمیایی شامل سنجش مقدار پروتئین (با استفاده از دستگاه پیکودراپ (Picodrop Ltd, Cambridge, UK)، اندوتوکسین (با استفاده از روش LAL)<sup>۴</sup> و الگوی الکتروفورزیک LPS (در مقایسه با LPS استاندارد سالمونلا (Sigma) با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت [۹].

### تخلیص وزیکول غشای خارجی نیسریا مننژیتیدیس

#### سر و گروه B

بدین منظور از سویه استاندارد CSBPI.G245 نیسریا مننژیتیدیس سر و گروه B استفاده گردید. ابتدا توده سلولی از کشت انبوه باکتری در فرمانتور حاوی ۴۰ لیتر محیط کشت فرانتز اصلاح شده تهیه گردید. پس از تعیین وزن مرطوب توده سلولی، استخراج OMV به روش دزاکسی کولات-اولترا سانتریفوژ افتراقی انجام شد [۱۶،۱۵].

#### برنامه ایمونیزاسیون

در این مطالعه ۳ گروه از موش های BALB/c در گروه های ۶ تایی انتخاب شدند و ایمونیزاسیون در روزهای ۰، ۱۴، ۲۸ و ۴۲ به صورت زیرپوستی<sup>۵</sup> صورت پذیرفت. در گروه یک، تزریق ۱۰ μg/mL LPS بدون ادجوانت، گروه دو ۱۰ μg/mL LPS به همراه ۱۰۰ μL ادجوانت فروند۲ و گروه سه ۱۰ μg/mL LPS به همراه ۵۰ μg OMV به عنوان ادجوانت انجام شد.

#### استخراج سلول های طحالی

طحال حیوان ایمونیزه را با استفاده از محیط کشت سلولی RPMI شستشو داده سپس محیط داخل پلیت به مدت ۵ دقیقه و ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و بعد از جدا سازی مایع رویی، جهت لیز

LPS-OMV در مدل حیوانی به عنوان کاندید واکسن انسانی علیه بروسلاز، مورد بررسی قرار گرفت تا پس از مطالعات تکمیلی وارد بررسی فازهای بالینی گردد.

### روش کار

#### سویه باکتری، شرایط کشت و فرماتاسیون

بروسلا آبورتوس S99 بیوار ۱ که سویه ای صاف و مستقل از دی اکسید کربن<sup>۱</sup> می باشد از کلکسیون سویه های استاندارد بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران تهیه شد. به طور خلاصه این سویه ابتدا در محیط کشت بروسلا آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد و سپس به منظور تهیه بذر سلولی مجدداً به مدت ۷۲ ساعت در بروسلا برات کشت داده شد. فرایند فرماتاسیون به منظور تهیه توده سلولی بروسلا آبورتوس در محیط کشت حاوی PDAT<sup>۲</sup> (۱۵g/L) و PDC<sup>۳</sup> (۱۵g/L)، سدیم بی سولفات ۰/۱ g/L و عصاره مخمر ۱۰ g/L در ۰/۱ ± ۶/۴ pH صورت گرفت. بذر سلولی تهیه شده به مخزن ۶۰ لیتری فرمانتور (Contact-Flow- (b.v.Bilthoven unit) صنعتی حاوی محیط کشت فوق تلقیح و در نهایت توده سلولی حاصل برای استخراج (LPS) مورد استفاده قرار گرفت [۹].

#### فرآیند استخراج لیپو پلی ساکارید و ارزیابی

#### شیمیایی نمونه استخراج شده

استخراج LPS با استفاده از روش بهینه سازی فنلی صورت گرفت [۹]. در این روش به توده سلولی فنل اضافه کرده و پس از جدا شدن لایه فاز آبی در سطح و فاز فنلی در طی مراحل، با اضافه کردن اتانول ۲۵٪ و تری کلرواستیک اسید به فاز آبی و با اضافه کردن

<sup>1</sup> CO<sub>2</sub>-independent

<sup>2</sup> Peptic digest of animal tissue

<sup>3</sup> Pancreatic digest of casein

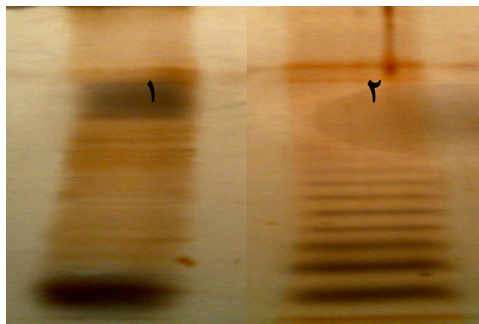
<sup>4</sup> Limulus amoebocyte lysate

<sup>5</sup> Subcutaneous

سلول‌ها به حداکثر رشد خود رسیده و مقدار ۱۰۱/۲ گرم توده سلولی حاصل شد. به دنبال استخراج LPS از توده سلولی و ارزیابی‌های شیمیایی این نمونه مقدار ۱۰۸ Eu/ml LPS حاصل شد. همچنین مقدار پروتئین با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, USA) ۲۱۰ μg/ml پروتئین در نمونه LPS تخلیص شده گزارش گردید. الگوی الکتروفوریتیک LPS (SDS-PAGE) در ژل ۱۴٪ در مقایسه با مارکر استاندارد (لیپو پلی ساکارید سالمولا، Sigma) به صورت یک باند سبک و چند باند سنگین است (شکل ۱).

#### استخراج OMV

نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B سویه G-CSBPI 245 برای استخراج OMV مورد استفاده قرار گرفت. به دنبال استخراج OMV، مقدار پروتئین، ۷۳۰ mg اندازه گیری شد.



شکل ۱. الگوی الکتروفوریتیک لیپو پلی ساکارید بروسلا آبورتوس S99 (ستون ۱) در مقایسه با LPS استاندارد سالمولا تیفی موریوم (ستون ۲)

#### ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی

ایمونیواسیون زیرجلدی با LPS بروسلا آبورتوس S99 باعث افزایش IFN- $\gamma$  در مقایسه با IL-4 و IL-10 در تمام گروه‌ها شد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود با تزریق LPS مقدار IFN- $\gamma$  در مقایسه با IL-4 و IL-10 افزایش یافته است. بعد از تزریق کمپلکس LPS-OMV مقدار IFN- $\gamma$  افزایش پیدا می‌کند و این مقدار نسبت افزایش القاء شده

گلبول‌های قرمز به رسوبات بافر ACK (NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) اضافه شد. سوسپانسیون مخلوط شده برای ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت و در دور ۲۰۰۰ rpm و برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله آخر پس از جدا سازی سوپرناتانت، رسوب سفید رنگ با محیط کشت سلولی شستشو شد و غلظت ۱۰<sup>۶</sup> سلول در هر میلی لیتر تنظیم گردید [۱۷].

در نوبت اول ایمونیزاسیون، ادجوانت کامل فروند (CFA)<sup>۱</sup> و در نوبت‌های دوم و سوم ادجوانت ناقص فروند (IFA)<sup>۲</sup> به کار رفته است و به همین دلیل در متن، ادجوانت به صورت C/IFA نشان داده شده است.

#### ارزیابی سایتوکاین‌های تولید شده با روش الایزا

بعد از تهیه سوسپانسیون سلول‌های طحالی، سایتوکاین‌های IL-4 و IL-10 و IFN- $\gamma$  مورد ارزیابی قرار گرفت. عیار این سایتوکاین‌ها در کشت سلولی فوق به روش ELISA اندازه‌گیری شد [۱۵].

#### آنالیز آماری

برای بررسی مقادیر بدست آمده در گروه‌های آزمایشی، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شده است و در تمام موارد، تفاوت‌ها در صورتی که مقدار  $p < 0.05$  بوده باشد، از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده‌اند.

#### یافته‌ها

##### کشت انبوه باکتری و استخراج LPS

در تحقیق حاضر پس از تلقیح بذور مورد نظر به فرمانتور تا انتهای فاز لگاریتمی رشد کلیه پارامترهای تخمیری در شرایط کاملاً کنترل شده و اپتیمم کشت غوطه‌ور در فرمانتور تنظیم گردید [۹]. در نهایت

<sup>1</sup> Complete Freund's Adjuvant

<sup>2</sup> Incomplete Freund's Adjuvant

انسانی محسوب می گردد. زیان های اقتصادی ناشی از بروسلوز دامی و انسانی در ایران طبق برآوردها بسیار بالا است و هزینه های زیادی را تحمیل کشور می کند [۴].

عدم دسترسی به واکسن موثر انسانی و همچنین عوارض ناشی از مصرف واکسن های حیوانی از جمله عواملی هستند که مانع از ریشه کنی این بیماری در سراسر جهان شده اند.

با توجه به عفونت‌زایی بروسلا به صورت داخل سلولی، پاسخ های ایمنی موثر علیه بروسلا وابسته به پاسخ های سلولی می باشد. به عبارت دیگر افزایش قدرت ماکروفاژها در کشتن باکتری های داخل سلولی به واسطه القا این توانایی با ترشح سایتوکاین هایی مثل IFN- $\gamma$  انجام می پذیرد. بنابراین انتخاب آنتی ژن (و یا آنتی ژن ها) در جهت تحریک پاسخ های سلولی برای حذف باکتری در بدن بسیار مهم است [۱۹،۱۸].

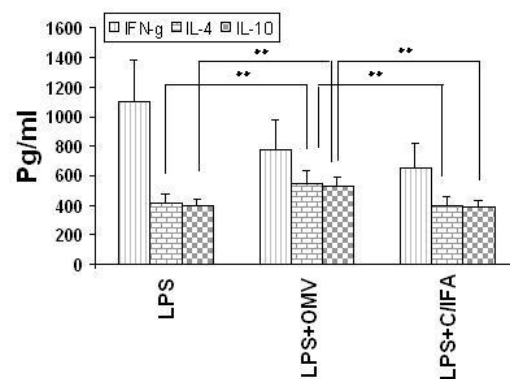
به منظور طراحی یک واکسن مناسب جهت ایجاد ایمنی حفاظت بخش نیاز به ترکیب آنتی ژنی مناسب می باشد که از شناخته شده ترین آنتی ژن های بروسلا، LPS است به طوری که بخش عمده پاسخ های سرولوژیک ایجاد شده در بیماری بروسلوز علیه LPS باکتری القاء می شود [۲۰،۱۹،۷].

ایمنوژنیسیته بالای LPS و زنجیره های پلی ساکاریدی آن باعث شده است که در تحقیقات مختلفی این ساختار به عنوان آنتی ژن جهت طراحی واکسن انسانی بروسلوز استفاده شود. از طرفی LPS به دلیل ماهیت فیزیکی و شیمیایی خود قادر به تحریک ایمنی سلولی و لنفوسیت های T نبوده و جز آنتی ژن های مستقل از سلول T طبقه بندی می شود [۳]. یکی از مهمترین استراتژی ها در سویچ پاسخ های مستقل از سلول T به سمت پاسخ های وابسته به سلول T، ایجاد کونژوگه هاپتن- ناقل<sup>۱</sup> است [۲۲،۲۱]. این روش

بعد از مصرف کمپلکس LPS و ادجوانت بیشتر است [جدول ۱ و نمودار ۱].

جدول ۱. عیار IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL-10 در گروه های ایمونیزه شده با

گروه	عیار IFN- $\gamma$	عیار IL-4	عیار IL-10
LPS : ۱	۱۱۰۰ Pg/mL	۴۱۰ Pg/mL	۴۰۰ Pg/mL
LPS+OMV : ۲	۷۸۰ Pg/mL	۵۵۰ Pg/mL	۵۳۰ Pg/mL
LPS+C/IFA : ۳	۶۵۰ Pg/mL	۴۰۰ Pg/mL	۳۹۰ Pg/mL



شکل ۱. آنالیز ترشح سایتوکاین در موشهای ایمن شده بوسیله LPS در فرمولهای مختلف. سلولهای طحال موش دو هفته بعد از آخرین تزریق جداسازی و بوسیله (۱۰  $\mu$ g/mL) از آنتی ژن به مدت سه روز تحریک و سپس سطح IL-4، IL-10 و IFN- $\gamma$  مترشحه اندازه گیری شدند، هر فرمول به صورت مخفف در هر ستون عمودی در نمودار نشان داده شده است (در قسمت مواد و روش های متن توضیح داده شده است) هر تست برای ۶ موش و برای سه بار انجام شده است. انحراف از معیار و میانگین و SD در مقیاس pg/mL بیان شده است (\*\*: بیانگر اختلاف معنادار بین دو گروه می باشد)

## بحث

امروزه بروسلوز مشکلی جهانی است. به استثنای تعداد محدودی از کشورهای جهان که عاری از بیماری بوده یا موفق به ریشه کنی شده اند، اکثر کشورهای به این بیماری آلوده اند. در تازه ترین گزارش سازمان بهداشت جهانی تنها ۱۷ کشور عاری از بروسلوز است. در منطقه مدیترانه شرقی و خاورمیانه، تمامی کشورها آلوده بوده و ایران یکی از مناطق آندمیک با شیوع بالا برای بروسلوز دامی و

<sup>۱</sup> Hapten-Carrier Complex

IL-4 و IL-10 در تمام گروه‌ها افزایش می‌یابد که نشان دهنده پاسخ ایمنی سلولی به واسطه  $Th_1$  و ترشح IFN- $\gamma$  است. IFN- $\gamma$  با اثر روی ماکروفاژها، آنها را برای تولید ترکیبات حد واسطه اکسیژن، اکسید نیترو (NO) و آنزیم‌های لیزوزیمی فعال می‌کند و همچنین سبب تولید ایزوتیپ‌هایی از آنتی‌بادی می‌شود که با فعالسازی کمپلکس‌ها و القای اپسونیزاسیون باکتری‌ها عمل بلع آنها توسط نوتروفیل‌ها و سلولهای نوتروفیل‌ها را تسهیل می‌نمایند [۱۸].

در این تحقیق به دنبال تزریق LPS، مقدار IFN- $\gamma$  افزایش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) یافت و این افزایش در مقایسه با دو گروه دیگر نیز معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). اگر چه افزایش IFN- $\gamma$  به دنبال تزریق LPS در مقایسه با کمپلکس OMV+LPS به طور معنی‌داری بیشتر ( $p < 0.05$ ) است اما LPS را به تنهایی نمی‌توان به عنوان یک واکنش مطرح نمود زیرا با وجود آنکه LPS بروسلا نسبت به LPS سایر باکتری‌های گرم منفی مانند انتروباکتریاسه سمیت و تب‌زایی بالایی ندارد ولی استفاده از آن در مقداری که بتواند پاسخ‌های ایمنی مناسب را تحریک کند، باعث القای پاسخ‌های ازدیاد حساسیت می‌شود [۲۳، ۲۲]. از طرفی با به کارگیری OMV، مقادیر کمتری از LPS به منظور القای پاسخ‌های ایمنی هم‌مورد نیاز خواهد بود و همچنین می‌توان به سطح بسیار بالاتری از پاسخ‌های هم‌مورد با استفاده از OMV به عنوان یک ادجوانت بی‌زیان علیه بروسلا دست یافت.

این تحقیق نشان داد که کمپلکس LPS-OMV مثل کمپلکس C/IFA+LPS قادر به القای شیفت پاسخ‌های سلولی به سمت  $Th_1$  است. یادآور می‌شود که ادجوانت فروند منع مصرف انسانی دارد در حالیکه بی‌زیان مصرف OMV به تایید سازمان بهداشت جهانی رسیده است [۱۵].

پایین بودن معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) عیار IL-4 و IL-10 در مقایسه با IFN- $\gamma$  در تمام گروه‌ها نشان دهنده مهار

بسیار با ارزش ولی دارای مشکلاتی از جمله هزینه زیاد، انتخاب دقیق اندازه و ساختمان مولکولی هر دو جزء ماکرومولکول، روش کونژوگاسیون، کار تکنیکی فرد عامل، پایین بودن راندمان فرآیند کونژوگاسیون و پایداری کونژوگاسیون است. به همین دلیل اگر با استراتژی ساده‌تر تا حدودی به هدف اصلی که همان القای پاسخ‌های وابسته به سلول T است تحقق یابد بسیار ارزشمند و کاربردی‌تر می‌باشد که این عمل با کاربرد بعضی از ادجوانت‌ها قابل اجرا است. در این مطالعه OMV نیسریا مننژیتیدیس به عنوان ادجوانتی با منشا میکروبی انتخاب شد.

بتز<sup>۱</sup> و همکارانش نشان دادند که LPS بروسلا آبورتوس باعث القای IFN- $\gamma$  از لنفویست‌های T می‌شود و وندورگ<sup>۲</sup> و همکارانش از OMPs نیسریا مننژیتیدیس گروه B به عنوان ادجوانت برای LPS بروسلا ملی تنسیس در مدل حیوانی استفاده کردند و نشان دادند که استفاده از کمپلکس OMP مننگوکوک با LPS بروسلا ملی تنسیس باعث تحریک  $Th_1$  و آنتی‌بادی‌های IgG2a می‌شود [۲۳، ۷].

باتاچارجی<sup>۳</sup> و همکارانش از کمپلکس LPS بروسلا ملی تنسیس با پروتئین‌های غشای خارجی نیسریا مننژیتیدیس سرگروه B برای ایمن‌سازی در موش استفاده کردند و انتشار باکتری به طحال و کبد را مهار نمودند [۸].

در این تحقیق از LPS بروسلا آبورتوس استفاده شد. در پژوهش‌های گذشته از OMPs به عنوان ادجوانت استفاده شده است ولی استفاده از OMV نیسریا مننژیتیدیس به علت داشتن ساختار وزیکولی به طور موثری جزء آنتی‌ژنیک LPS را در برگرفته و بهتر از OMP نقش ادجوانتی برای LPS ایفا می‌کند [۲۳].

همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شد به دنبال ایمونیزاسیون مدل حیوانی، عیار IFN- $\gamma$  نسبت به

1 Betts

2 Vande verg

3 Bhattacharjee

### نتیجه گیری

در خاتمه با توجه به نتایج به دست آمده و الگوی سایتوکاینی تعیین شده به دنبال ایمونیزاسیون مدل حیوانی با کمپلکس غیر کووالان OMV+LPS، این ترکیب فاقد تب زایی و سمیت و در عین حال دارای ایمنوژنیسیته بالایی می باشد و به عنوان یک کاندیدای واکسن مناسب جهت تحریک پاسخ های سلولی یعنی پاسخ های موثر و حفاظت بخش علیه عفونت داخل سلولی بروسلا، پیشنهاد می شود.

و کاهش پاسخ های ایمنی سلولی به واسطه  $Th_2$  می باشد که می تواند به عنوان عاملی مؤثر در کارآیی واکسن زیر واحدی بروسلوز (بر پایه LPS) مطرح گردد زیرا پاسخ سلول های  $Th_2$  اساساً در ساز و کارهای دفاعی علیه بروسلا نه تنها کاربردی ندارد بلکه با مهار جمعیت های مؤثر از سلول های  $Th_1$  باعث افزایش احتمال بقای درون سلولی این میکروارگانیسم می گردد.

### References

- 1- Boschirola ML, Foulongne V, Callaghan DO. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*. 2001 Feb; 4(1): 58-64.
- 2- Cutler SJ, Whatmore AM, Commander, NJ. Brucellosis – new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol*. 2005; 98(6):1270-81.
- 3- Karami S, Siadat SD, Tabaraie B, et al. Extraction and molecular evaluation of *Brucella abortus* S99 major outer membrane proteins, Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2009 Autumn; 13(3): 174-179. (Full text in Persian)
- 4- World Health Organization. 1997. Fact sheet N 173, July 1997. World Health organization, Geneva, Switzerland.
- 5- Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*. 2005 Feb; 8(1): 60-6.
- 6- Ragan VE. The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States, *Vet Microbiol*. 2002 Dec; 90(1-4): 11-8.
- 7- Betts M. Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* behaves as a T-cell-independent type I carrier in murine antigen-specific antibody responses. *Infec Immun*. 1993May; 61(5): 1722-29.
- 8- Bhattacharjee KA. Protection of mice against brucellosis by intranasal immunization With *Brucella melitensis* lipopolysaccharide as a noncovalent complex with *Neisseria meningitidis* group B outer membrane-protein. *Infec Immun*. 2002 Jul; 70(7): 3324-3336.
- 9- Sharifat SA, Siadat SD, Norouzian D, Ahmadi H, Nejati M, Tabaraie B, et al. Optimization of *Brucella abortus* S99 lipopolysaccharide extraction by phenol and butanol methods. *RJBS*. 2008; 3(6): 576-80.
- 10- Caroff M, Bundle DR, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119- 3. *Infect Immun*. 1984 Nov; 46(2): 384-8.
- 11- Schuring GG, Sriranganathan N, Corbel MJ, Brucellosis vaccines: past, present and future, *Vet microbial*. 2002 Dec; 90(1-4): 479-96.
- 12- The Development of new/improved brucellosis vaccines: Report of WHO meeting WHO/EMC/ZDI/98. 14, Geneva, Switzerland. 1997; 11-12.
- 13- Behzadiannejad Q, Siadat SD, Kheirandish M, Tabaraie B, Ahmadi H, Norouzian D, et al. Comparison among opsonic activity against meningococci in rabbit sera form vaccines after immunization with outer membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Res J Microbiol*. 2008; 3(3): 105-113.
- 14- Bendelac A, Medzhitov R. Adjuvants of immunity: Harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. *J Exp Med*. 2002 Mar; 195(5): 19-23.
- 15- Sharifat SA, Siadat SD, Norouzian D, Izadi Mobarakeh J, Kheirandish M, et al. Outer Membrane Vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as an adjuvant to induce specific

- antibody response against the lipopolysaccharide of *Brucella abortus* S99. *Annals of Microbiology*. 2009; 59(1): 145-149.
- 16- Siadat SD, Norouzian D, Tabaraei B, Behzadiannejad Q, Ahmadi H, Najari-Peerayeh S, et al. Comparative studies of conjugated capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Res J Microbiol*. 2007; 2(4): 337-45.
- 17- Prussin C, Metcalf D. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995 Dec; 188(1): 117-128.
- 18- Jinkyung KO, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan; 16(1): 65-78.
- 19- Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet Microbiol*. 2002 Dec; 90 (1-4): 367-82.
- 20- Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smith LH. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Dec; 7 (12): 775-86.
- 21- Delvecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA, Kraycer JA, Estock F, et al. *Brucella proteomes-a review*. *Vet. Microbiol*. 2002 Dec; 90(1-4): 539-603.
- 22- Sharifat Salmani A, Siadat SD, Fallahian MR, Ahmadi H, Norouzian D, Yaghmai P, et al. Serological evaluation of *Brucella abortus* S 99 lipopolysaccharide extracted by an optimized method. *Am J Infect Dis*. 2009; 5(1): 11-16.
- 23- Van de verg LL, Hartman AB, Bhattacharjee AK, Tall BD, Yuan L, Sasala K, et al. Outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* as a mucosal adjuvant for lipopolysaccharide of *Brucella melitensis* in mouse and Guinea pig intranasal immunization models. *Infect Immun*. 1996 Dec; 64(12): 5263-68.



## Determination of cytokine profile following the immunization with *Brucella abortus* S99 lipopolysaccharide\_ *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane vesicle complex in animal model

Siadat SD<sup>1</sup>, Ph.D; Shirdast H<sup>2</sup>, MSc; Aghasadeghi MR<sup>3</sup>, Ph.D; Norouziyan D<sup>4</sup>, Ph.D; Atyabi SM<sup>5</sup>, Ph.D; Sadat SM<sup>6</sup>, MSc; Soleymaniyeh S<sup>2</sup>, MSc; Sharifat A<sup>6</sup>, MSc; Moshiri A<sup>7</sup>

1- Corresponding Author, Assistant Prof. of Medical Bacteriology, Dept. of Hepatitis & AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. E-mail: d.siadat@gmail.com

2- MSc in Microbiology, Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Islamic of Azad University, Zanjan, Iran 3- Assistant Prof. of Medical Biotechnology, Dept. of Hepatitis & AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. 4- Associated Prof. of Biochemistry, Dept. of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. 5- Assistant Prof. of Biophysic, Dept. of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. 6- MSc in Molecular Biology, Dept. of Hepatitis & AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. 7- MSc Student in Medical Biotechnology, Faculty of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### ABSTRACT

**Background & Objectives:** Lipopolysaccharide (LPS) is the main antigenic structure expressed on the surface of smooth strains of *Brucella*. It has been shown that Outer membrane vesicle (OMV) of *Neisseria meningitidis* efficiently promote IgG and IgM response against the administrated antigen as an adjuvant. The aim of this study is to evaluate the effect of LPS-OMV noncovalent complex in producing of T helper 1 cytokine (IFN- $\gamma$ ) and T helper 2 cytokines (IL-4 and IL-10) in mice.

**Methods:** LPS extracted by an optimized method based on hot phenol-water extraction. Groups of six BALB/c mice were injected subcutaneously with LPS alone, LPS with Freund adjuvant and LPS-OMV complex on 0, 14 and 28 days. Levels of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 were evaluated in spleen cell suspension supernatant by ELISA.

**Result:** Immunization with *B. abortus* LPS significantly induced high level of IFN- $\gamma$  in comparison to the other groups immunized with LPS-OMV and LPS+ adjuvant ( $p<0.05$ ). In contrast, lower levels of IL-4 and IL-10 were elicited by LPS in the rest groups. Immunization with the non-covalent complex of *B. abortus* LPS-*N. meningitidis* serogroup B OMV caused a significant increase of IL-4 and IL-10 compared with the mice immunized with *B. abortus* LPS ( $p<0.05$ ), while the titer of IFN- $\gamma$  is still significantly higher than IL-4 and IL-10 ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** The raise of IFN- $\gamma$  following the immunization with all of the compounds (LPS, LPS-OMV non-covalent complex and LPS+adjuvant) indicates the activation of Th<sub>1</sub> population that would be correlated to the clearance of the organism due to the amplification of anti-microbial activity of Polymorphonuclear cells. Low levels of IL-4 and IL-10 following the immunization with all compounds would be a sign of Th<sub>1</sub> responses dominancy or inhibition of Th<sub>2</sub> population proliferation and activity. Such a cytokine pattern would be a sign of the efficiency of brucellosis subunit vaccine because Th<sub>2</sub> responses basically have no role in the immune responses against *Brucella* and may lead to the persistence of intracellular infection.

**Key words:** *Brucella abortus*; Lipopolysaccharide; *Neisseria meningitidis*; Outer membrane vesicle; IFN- $\gamma$ ; IL-10; IL-4