

هم‌افزایی ترکیب لیپوزم گلايسريزيك اسيد و آلوم بر پاسخ‌های ایمنی علیه شکل کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم

زهرا زینالی^۱، سیدمیثم ابطحی فروشانی^۲، عبدالغفار اونق^۳، اصغر زمانی^۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۵/۲۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: شکل کشته‌شده میکروارگانیزم‌ها در ترکیب با آلوم، عمدتاً پاسخ‌های ایمنی سلولی قوی ایجاد نمی‌کند. گلايسريزيك اسيد یک ساپونین تری‌ترپنوئیدی با خواص تعدیل‌کننده ایمنی است. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی هم‌افزایی ترکیب لیپوزم گلايسريزيك اسيد (GL) و آلوم بر پاسخ‌های ایمنی علیه شکل کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم (HKST) صورت گرفته است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی موش‌های نر Balb/c در ۵ گروه ۱۵ تایی با واکسن HKST به‌تنهایی یا در ترکیب با آلوم، GL یا ترکیب آلوم-GL دو بار با فاصله دوهفته‌ای ایمن شدند. ۱۴ روز پس از آخرین واکسیناسیون، پاسخ‌های ایمنی در برابر سالمونلا تیفی موریوم و توان محافظتی واکسن‌ها بررسی شد. میزان بقا توسط تحلیل کاپلان-مایر بررسی شد. سایر یافته‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی موردبررسی قرار گرفت. سطح $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: واکنش ازدیاد حساسیت نوع تأخیری، تکثیر لنفوسیتی، تیترا آنتی‌بادی IgG2a و میزان بهبود زنده‌مانی در برابر چالش با سالمونلا تیفی موریوم زنده در گروه دریافت‌کننده ادجوانت ترکیبی و HKST نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود. در گروه دریافت‌کننده ادجوانت ترکیبی به‌طور معنی‌داری سطح IL-4 و IFN- γ به ترتیب افزایش و کاهش بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: ترکیب آلوم-GL به‌عنوان یک ادجوانت به‌طور هم‌افزایی ایمنی سلولی و هومورال را پس از ایمن‌سازی با واکسن HKST افزایش داد.

کلیدواژه‌ها: ادجوانت، آلوم، سالمونلا تیفی موریوم، لیپوزم گلايسريزيك اسيد، واکسن

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره ششم، ص ۳۲۰-۳۰۸، شهریور ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن: ۰۹۱۳۳۰۰۰۴۷۰

Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

مقدمه

داخل سلول‌ها وارد عمل می‌شود (۲، ۳). در نگاه اول، به‌منظور ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی مناسب در برابر میکروب‌های درون‌سلولی اختیاری یا اجباری، استفاده از نوعی از این میکروارگانیزم‌ها با حدت ضعیف شده منطقی به نظر می‌رسد. با این حال، این شکل از میکروارگانیزم همیشه در دسترس نیست. علاوه بر این، ترکیب اشکال کشته‌شده میکروارگانیزم‌ها و ادجوانت‌های متداول از قبیل آلوم عمدتاً تنها پاسخ‌های ایمنی هومورال را ایجاد می‌کنند (۴-۶). بنابراین، یک راه‌حل مناسب،

اگرچه واکسن‌ها به‌طور قابل‌توجهی مرگ‌ومیر و عوارض ناشی از عوامل عفونی را در انسان و حیوانات کاهش داده‌اند، اما هیچ واکسن مناسبی علیه برخی از پاتوژن‌ها وجود ندارد. یک پاسخ ایمنی مناسب در برابر بیشتر پاتوژن‌ها شامل ترکیبی از پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال است (۱، ۲). پاسخ هر دو بازوی ایمنی در عفونت‌های داخل سلولی مانند عفونت‌های سالمونلا لازم است. ایمنی هومورال مناسب از استقرار عفونت پیشگیری می‌کند، درحالی‌که ایمنی سلولی پس از استقرار عفونت و ورود میکروب به

^۱ دانشجوی دکتری ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲ دانشیار ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۴ استادیار شیمی آلی، گروه نانوفناوری، دانشکده شیمی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

طراحی انواع جدیدی از ادجوانت است که در ترکیب با شکل کشته شده پاتوژن ها، یک پاسخ ایمنی سلولی نیز ایجاد کند.

بسیاری از ادجوانت هایی که در مدل های حیوانی ایمنی سلولی ایجاد کرده اند، برای انسان به دلیل سمیت یا قیمت فوق العاده بالا قابل استفاده نیستند. به عنوان مثال، استفاده از ادجوانت کامل فروند، به عنوان یکی از قوی ترین عوامل در تحریک ایمنی سلولی و پاسخ های Th1، به دلیل سمیت بالا، القای واکنش های مرتبط با درد شدید، تنها به استفاده در حیوانات آزمایشگاهی محدود شده است (۷، ۸). ساپونین ها گروه ناهمگنی از استرول و تری ترپن گلیکوزیدها هستند که از طیف وسیعی از گیاهان جدا شده اند (۹). با توجه به اینکه ساپونین ها قدرت تحریک سیستم ایمنی حیوانات را دارند، علاقه زیادی نسبت به استفاده از آن ها به عنوان ادجوانت ایجاد شده است (۱۰). گلاسیریزیک اسید یا گلاسیرین یک ساپونین تری ترپنوئیدی استخراج شده از گیاه شیرین بیان هست. این ماده دارای خواص شناخته شده ای از قبیل اثرات بهبوددهنده زخم، ضد سرفه، ضد ویروس و القاگر تولید اینترفرون است (۱۰، ۱۱). ولی در استفاده از این ماده مشکلاتی از قبیل حلالیت کم وجود دارد. یکی از راهکارهای فائق آمدن بر این مسئله وارد کردن گلاسیریزیک اسید به لیپوزوم جهت افزایش رسانش آن است (۱۰).

لیپوزوم ها وزیکول های دولایه ای هستند که پس از توزیع آمفی فیل ها (دوگانه دوست ها) در محیط های آبی به طور خود به خود تشکیل می شوند. آمفی فیل ها معمولاً فسفولیپید هستند و از رایج ترین اجزای آن فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل گلیسرول هستند. مواد دیگری مانند کلسترول اغلب در فرمولاسیون گنجانده می شوند. ترکیبات آبدوست را می توان در داخل لیپوزوم به دام انداخت، در حالی که ترکیبات چربی دوست معمولاً در غشای لیپوزوم گنجانده می شوند (۱۲). لیپوزوم به دلیل استفاده بالقوه و واقعی خود در دارورسانی هدفمند شناخته شده اند (۱۳). علاوه بر این، به نظر می رسد لیپوزوم دارای مزایای بسیاری مانند ارزان قیمت بودن،

پایداری بالا، زیست تخریب پذیر بودن به همراه توانمندی تحریک پاسخ های ایمنی با واسطه هومورال و سلولی هستند (۱۴، ۱۵).

در این مطالعه به عنوان یک هدف فرعی، تأثیر لیپوزوم گلاسیریزیک اسید (GL) بر پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال بر موش های Balb/c ایمن شده با شکل کشته شده سالمونلا تیفی موریوم (HKST) سنجیده شد. همچنین به عنوان هدف اصلی تأثیر ترکیب آلوم و GL بر القای پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال در پاسخ به HKST در موش های Balb/c سنجیده شد.

مواد و روش کار

مواد: لیسیتین سویا، کلسترول، ساکاروز، محیط بلاد آگار، محیط کشت RPMI-1640، سرم جنین گاوی (FBS) و گلیسیریزیک اسید از شرکت Biowest-آلمان خریداری شد. دی متیل سولفوکساید (DMSO)، ۳-(۴،۵-دی متیل تiazول-۲-یل)-۵،۲-دی متیل تترازولیوم بروماید (MTT)، و ترشیوبوتیل الکل از شرکت MilliporeSigma - آلمان تهیه شد.

طراحی پژوهش و جامعه مورد مطالعه: این پژوهش از نوع تجربی بوده است که به صورت موردی-شاهدی انجام شده است. جامعه مورد مطالعه شامل موش های نر Balb/c شش تا هشت هفته ای بود که از مرکز حیوانات دانشکده داروسازی دانشگاه ارومیه خریداری شده بودند. ملاحظات اخلاقی در مورد آزمایش بر روی حیوانات به دنبال کنوانسیون هلسینکی در نظر گرفته شد و این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (کد IR-UU-AEC-3/5) تأیید شد.

پس از گذشت یک هفته جهت تطابق، موش ها به پنج گروه تقسیم شدند. هر گروه شامل ۲۵ موش بود. موش ها با حجم ۱۵۰ میکرولیتر، دو بار با فاصله ۱۴ روز به صورت زیر جلدی واکسینه شدند. تمام تزریقات زیر جلدی به روی پوست شل روی گردن طبق جدول زیر انجام شد.

جدول (۱): گروه بندی و ترکیبات تزریق شده هر گروه

| گروه | آلوم | لیپوزوم حاوی گلاسیریزیک اسید (۲۰ mg/kg) | PBS ^۱ | باکتری کشته شده (CFU ۱۰ ^۶) به ازای هر موش |
|--|-------|---|------------------|--|
| کنترل | - | - | ۲۵۰ µl | - |
| باکتری کشته شده (HKST) | ۵۰ µl | - | ۲۰۰ µl | ۵۰ µl |
| آلوم + باکتری کشته شده (HKST/A) | - | - | ۱۵۰ µl | ۵۰ µl |
| لیپوزوم گلاسیریزیک اسید + باکتری کشته شده (HKST/GL) | - | ۵۰ µl | ۱۵۰ µl | ۵۰ µl |
| آلوم + لیپوزوم گلاسیریزیک اسید + باکتری کشته شده (HKST/GL/A) | ۵۰ µl | ۵۰ µl | ۱۵۰ µl | ۵۰ µl |

^۱ Phosphate-buffered saline

تهیه شکل کشته‌شده باکتری سالمونلا تیفی موریوم

(HKST): سوش استاندارد باکتری سالمونلا تیفی موریوم از کلکسیون باکتریایی آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه ارومیه (ATCC14028) به مدت یک شبانه‌روز در محیط پلاک آگار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. کلنی‌های باکتری برداشت‌شده و ۳ بار در PBS شسته شد و سپس در ۸۰ °C به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. پس از اطمینان عدم رشد باکتری‌ها، در محیط پلاک آگار، غلظت سوسپانسیون باکتری به روش نیمه مک فارلند مشخص شد (۳).

تهیه میسل‌های حاوی اسیدگلیسیریزیک (GA): ساخت

لیپوزوم به روش Dehydration/Rehydration صورت گرفت. برای این منظور دو فاز آبی و آلی به‌صورت جداگانه تهیه و به‌صورت زیر مخلوط شدند (نسبت حجمی فاز آلی: آبی = ۴۵:۵۵) تا محلولی یکنواخت با حجم نهایی به دست آید. ۷/۴ میلی‌لیتر: فاز آلی: ۴۰ میلی‌گرم لیسیتین سویا ((SPC) ۱۰ میلی‌گرم کلسترول در حجم ۶/۲ میلی‌لیتر ترشیو بوتیل‌الکل در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد حل شد. فاز آبی: پنج میلی‌گرم GA و ۱۲۰ میلی‌گرم ساکارز در ۲/۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد حل شد. محلول به‌دست‌آمده لیوفیلیز شده و پودر سفیدرنگی به دست آمد و مجدداً در ۴/۷ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد پراکنده شد (۱۰).

ارزیابی حساسیت ازدیاد نوع تأخیری (DTH): ۱۴ روز

پس از آخرین ایمن‌سازی، تعداد یک‌میلیون باکتری کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم به‌صورت زیر جلدی به بالشتک کف‌پایی سمت چپ ۵ موش از هر گروه تزریق شد. همان حجم نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی به کف پای راست هر موش تزریق شد. پس از ۴۸ ساعت، ضخامت بالشتک پا توسط کولیس دیجیتال بررسی شد. میزان DTH بر اساس این فرمول محاسبه شد:

(ضخامت پای چپ) - (ضخامت پای راست) * 100/ [ضخامت پای راست]

ارزیابی‌های ایمنولوژیک: ۱۴ روز پس از آخرین ایمن‌سازی،

پنج موش در هر گروه با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند. ابتدا از موش‌های و همچنین موش‌های گروه شاهد نمونه خون گرفته شد و سرم آن‌ها جدا شد. تیترا اختصاصی IgG در برابر HKST و نسبت IgG2b/IgG1 سپس با استفاده از روش ELISA طبق روش کاری که در گذشته شرح شده، بررسی شد (۳، ۱۶).

تست تکثیر لنفوسیتی: بعد از خون‌گیری اقدام به

خارج‌سازی طحال از موش‌ها در شرایط آسپتیک گردید. هر نمونه طحال له‌شده و از یک شبکه سیمی به قطر ۲۰ میکرومتر عبور داده

شد. سوسپانسیون سلولی جداسازی شده با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای با گردابان چگالی فایکول-هایپیک جدا شدند. گلبول‌های قرمز خون توسط بافر لیز کننده ACK (کلرید آمونیوم ۰/۱۵ مولار، بی‌کربنات پتاسیوم ۰/۰۱ مولار، و اتیلن دی‌آمین تترااسات (EDTA) ۰/۰۱ مولار) حذف شدند. محیط کشت مورد استفاده برای سلول‌های طحالی RPMI-1640 و ۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) بود. شمارش سلول‌های زنده با استفاده از تریپان به‌لو صورت پذیرفت. هر چاهک با تعداد 4×10^4 سلول باکتری کشته‌شده در ۱۰۰ میکرولیتر تحریک شد. تعداد سلول طحالی به باکتری بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شده بود (۳، ۱۷). پس از ۷۲ ساعت، ۲۵۰ میکرولیتر MTT (۵ mg/ml) به هر چاهک اضافه شد و پس از چهار ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، مایع رویی خارج و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک افزوده گردید. با پیت کردن سریع، کریستال‌ها حل شد. پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با الیزا ریدر خوانده شد. شاخص تکثیر با توجه به نسبت جذب سلول‌های تحریک‌شده با HKST به جذب سلول‌های طحال تحریک نشده گزارش شد. مبنای شمارش تعداد باکتری‌ها بر اساس سنجش میزان کدورت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (روش نیمه مک فارلند) است. عدد 0.8×10^8 تا 0.1×10^8 بیانگر تعداد 10^8 باکتری بود (۳).

تعیین بار باکتریایی در کبد: دو هفته پس از آخرین

ایمن‌سازی، پنج موش از هر گروه به‌صورت داخل صفاقی با 10^3 باکتری سالمونلا تیفی موریوم زنده (به‌عنوان دوز غیر کشنده) تلقیح شدند. موش‌ها ۴۸ ساعت بعد آسان کشی شدند و ۲۰ میلی‌گرم از بافت کبد هر موش به‌طور جداگانه برداشته شد و همگن شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های مناسب از سلول‌های کبد (به نسبت یک‌به‌ده در Triton X-100 (۰/۵ درصد)) به‌طور جداگانه روی صفحات سویا تریپتیکاز قرار داده شد و به مدت یک روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت، واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (CFUs) شمارش شدند (۳).

ارزیابی درصد بقا: دو هفته پس از آخرین ایمن‌سازی، ده

موش از هر گروه به‌صورت داخل صفاقی با یک‌میلیون باکتری زنده سالمونلا تیفی موریوم (به‌عنوان دوز کشنده) ایمن شدند. در این آزمون هدف اصلی سنجش میزان زنده ماندن موش‌ها پس از چالش با دوز کشنده باکتری بود. بنابراین تنها واقعه مرگ جهت ترسیم منحنی کاپلان مایر ثبت شد. بقا به مدت سه هفته مورد بررسی قرار گرفت (۳).

ارزیابی میزان IL-4 و IFN-γ در مایع رویی حاصل از

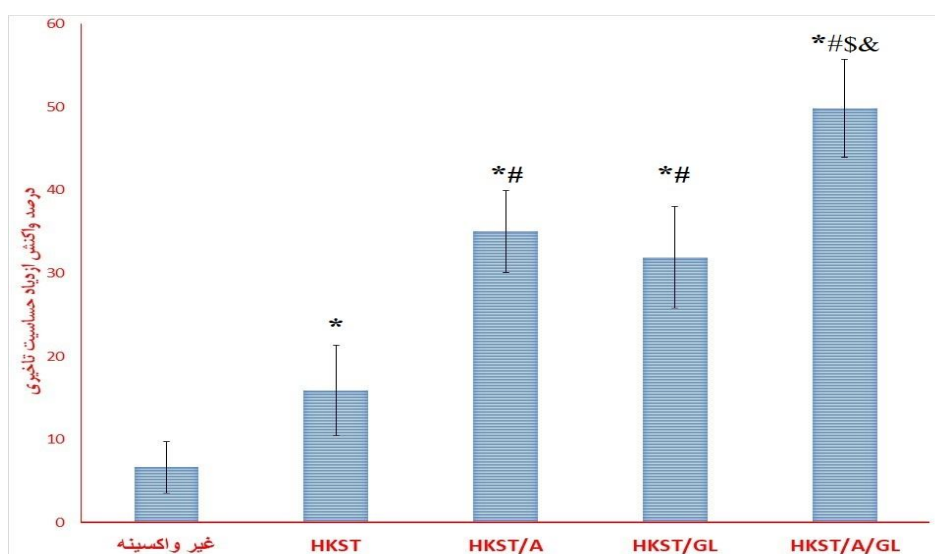
کشت سلول‌های طحالی: پس از ۴۸ ساعت کشت سلول‌های

طحالی در دمای ۳۷ و ۵٪ درصد CO₂ مایع رویی برداشت و برای سنجش این سایتوکائین‌ها به روش الیزا با کیت‌های شرکت Bendermed انگلستان و طبق دستورالعمل کیت انجام شد (۳).

روش‌های ارزیابی آماری: میزان بقا توسط تجزیه و تحلیل کاپلان-مایر بررسی شد. سایر یافته‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس‌از آن آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری پنج درصد تعیین شد. تمامی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد.

یافته‌ها

بیشترین شدت واکنش DTH در گروه دریافت‌کننده



نمودار (۱): اثرات استفاده از ادواجنت‌ها بر روی بر واکنش DTH.

× نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه غیر واکسینه است. # نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST است. \$ نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/A است. * نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/GL است. (باکتری کشته‌شده، HKST/A: باکتری کشته‌شده + آلود، HKST/GL: باکتری کشته‌شده + لیپوزوم و HKST/GL/A: باکتری کشته‌شده + آلود + لیپوزوم).

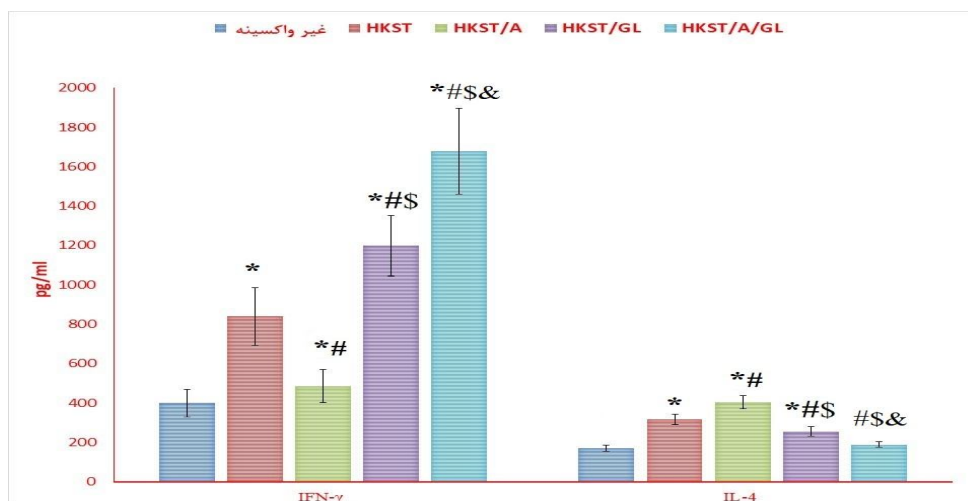
دریافت کردند، بالاتر بود. بیان IFN- γ در سلول‌های طحال موش‌هایی که تنها با HSKT واکسینه شده بودند به‌طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های گروه HKST/A یا گروه بدون واکسن بود (نمودار ۲-الف).

تولید IL-4 در سوپ رویی سلول‌های طحالی موش‌های تحت تیمار شده با HKST/A در مقایسه با گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (نمودار ۲-ب). بیان IL-4 در سلول‌های طحال موش‌هایی که HKST را به‌تنهایی دریافت کردند در مقایسه با

همان‌طور که در نمودار ۲-الف نشان داده شده است، بالاترین تولید IFN- γ در سوپ رویی سلول‌های طحال موش‌هایی که HKST/GL/A دریافت کرده بودند، مشاهده شد. به این ترتیب، در گروه دریافت‌کننده ادجوانت ترکیبی، افزایش ۲ برابری در تولید IFN- γ در مقایسه با گروهی که تنها با HKST واکسینه شده بودند، مشاهده شد (نمودار ۲). میزان IFN- γ در سوپ سلول‌های طحال موش‌های واکسینه شده با HKST/GL در مقایسه با سلول‌های طحال موش‌هایی که HKST/A، HSKT یا موش‌های کنترل

ترکیبی با گروه بدون واکسن تفاوت معنی‌داری نداشت (نمودار ۲-ب).

سلول‌های طحال موش‌هایی که با HKST/A/G یا HKST واکسینه شده بودند، بیشتر بود (نمودار ۲-ب). میزان تولید IL-4 در



سوپ رویی سلول‌های طحالی در گروه دریافت‌کننده ادجوانت

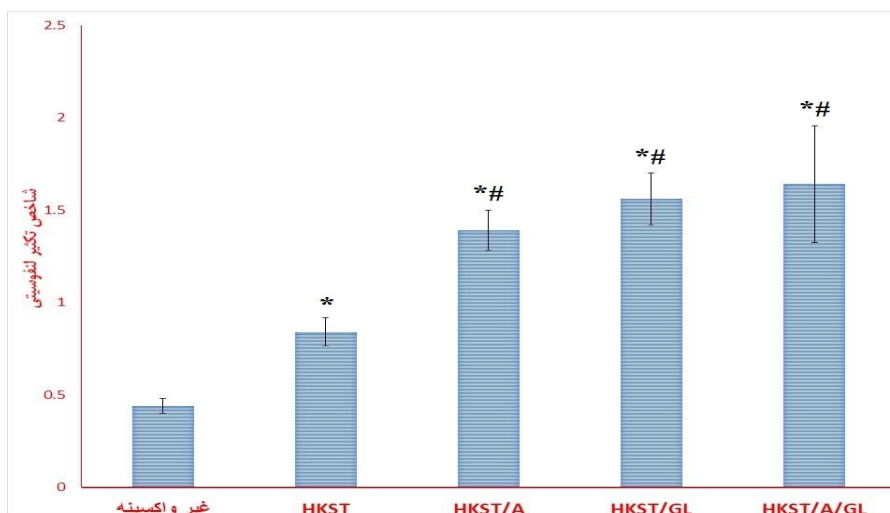
نمودار (۲): اثرات استفاده از ادواجنت‌ها بر روی میزان تولید سایتوکاین‌های IFN-γ (الف) و IL-4 در سوپ رویی کشت سلول‌های

طحالی

× نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه غیر واکسینه است. # نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/A است. \$ نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/GL است. (باکتری کشته‌شده، HKST/A: باکتری کشته‌شده + آلوم، HKST/GL: باکتری کشته‌شده + لیپوزوم و HKST/GL/A: باکتری کشته‌شده + آلوم + لیپوزوم).

دنبال آن گروه‌های HKST/GL و HKST/A به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده HKST بود. هرچند که بین سه گروه اخیر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۳).

تفاوت معنی‌داری در شدت تکثیر لنفوسیت‌های طحالی بین گروه‌های بدون واکسن و دریافت‌کننده HKST وجود داشت (نمودار ۳). شدت تکثیر لنفوسیت‌های طحالی در گروه HKST/GL/A و به

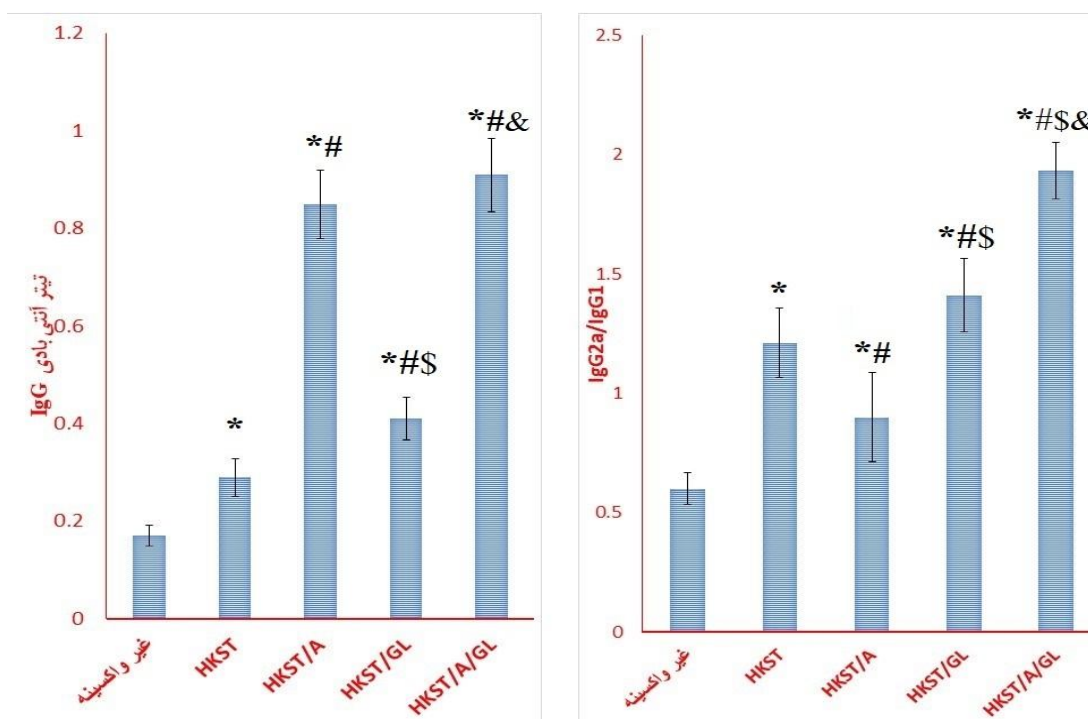


نمودار (۳): تأثیر ادواجنت‌ها بر روی شدت تکثیر لنفوسیت‌های طحالی

× نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه غیر واکسینه است. # نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/A است. \$ نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/GL است. (باکتری کشته‌شده، HKST/A: باکتری کشته‌شده + آلوم، HKST/GL: باکتری کشته‌شده + لیپوزوم و HKST/GL/A: باکتری کشته‌شده + آلوم + لیپوزوم).

IgG2b/IgG1 در موش‌هایی که با HKST/GL/A واکسینه شده بودند در مقایسه با حیواناتی که با پروتکل‌های دیگر واکسینه شده بودند به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. موش‌های گروه HKST/GL نسبت IgG2b/IgG1 به‌طور معنی‌داری در مقایسه موش‌های دریافت‌کننده HKST، HKST/A و کنترل بیشتر بود (نمودار ۴). به‌طور معنی‌داری نسبت IgG2b/IgG1 در موش‌هایی که با HKST/A واکسینه شدند پایین‌تر از این نسبت در حیواناتی که تنها HKST دریافت کردند، بود (نمودار ۴).

از نظر تیترهای IgG اختصاصی علیه HKST، گروهی که HKST/GL/A یا HKST/A را دریافت کردند، بالاترین تیترها را در مقایسه با گروه‌های دیگر داشتند (نمودار ۴). تیتر آنتی‌بادی در گروه HKST/GL در مقایسه با موش‌هایی که HKST یا گروه‌های کنترل دریافت کردند، بالاتر بود. باین‌حال، به‌طور معنی‌داری از گروه‌های دریافت‌کننده شکل کشته‌شده و آلوم و گروه دریافت‌کننده شکل کشته‌شده و ادجوانت ترکیبی کمتر بود (نمودار ۴). همان‌طور که در نمودار ۴ گزارش شده است، نسبت

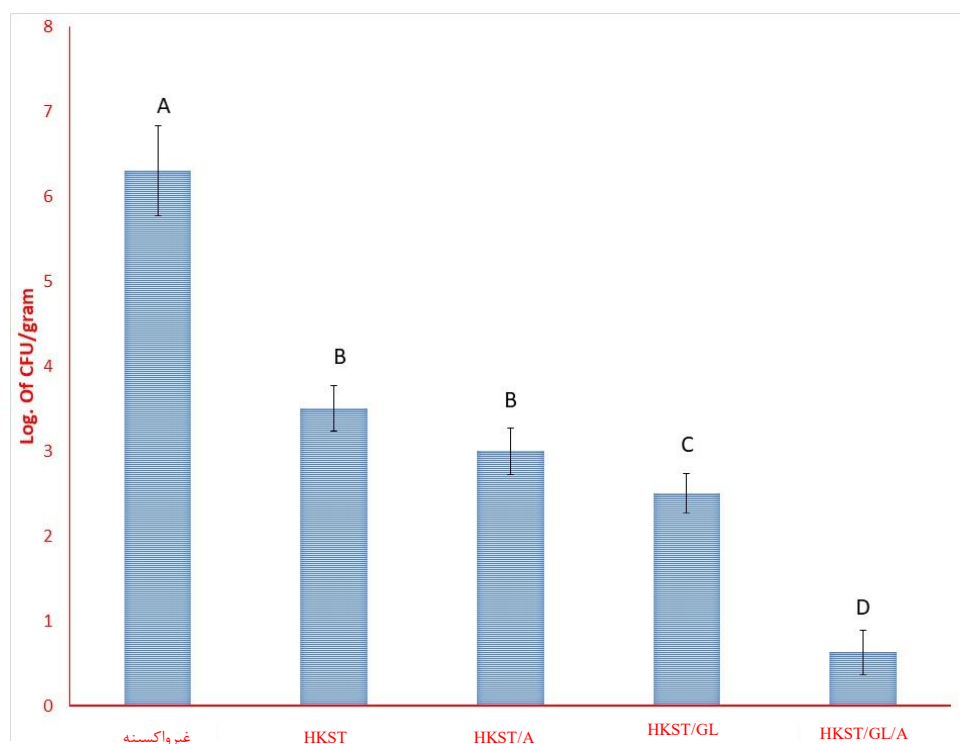


نمودار (۴): اثرات واکسیناسیون بر پاسخ آنتی‌بادی

سمت چپ) میانگین سطح سرمی IgG در برابر HKST، سمت راست) ارزیابی نسبت IgG2b/IgG1. × نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه غیر واکسینه است. # نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST است. \$ نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/A است. نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/GL است. (باکتری کشته‌شده، HKST/A: باکتری کشته‌شده + آلوم، HKST/GL: باکتری کشته‌شده + لیپوزوم و HKST/GL/A: باکتری کشته‌شده + آلوم + لیپوزوم).

HKST دریافت کردند، مشاهده شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، بیشترین تعداد کلنی‌های باکتریایی در گروهی که واکسینه نشده بودند مشاهده شد. علاوه بر این، بار باکتریایی در گروه HKST/GL به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه آلوم HKST/A بود. البته بار باکتریایی در گروه‌های HKST/GL و HKST/A به‌طور قابل‌توجهی کمتر از گروه‌های HKST و کنترل بود (نمودار ۵).

کشت کبدهای هموزن شده از موش‌هایی که HKST/GL/A دریافت کرده بودند نشان داد که میانگین تعداد کلنی‌های باکتریایی به‌طور قابل‌توجهی کمتر از میانگین تعداد کلنی‌های باکتریایی ثبت‌شده از گروه‌های دیگر است (نمودار ۵). به‌طور متوسط، یک کاهش ۸۲ درصدی در میانگین تعداد کلنی‌های باکتریایی در موش‌های واکسینه شده با HKST/GL/A در مقایسه با گروهی که

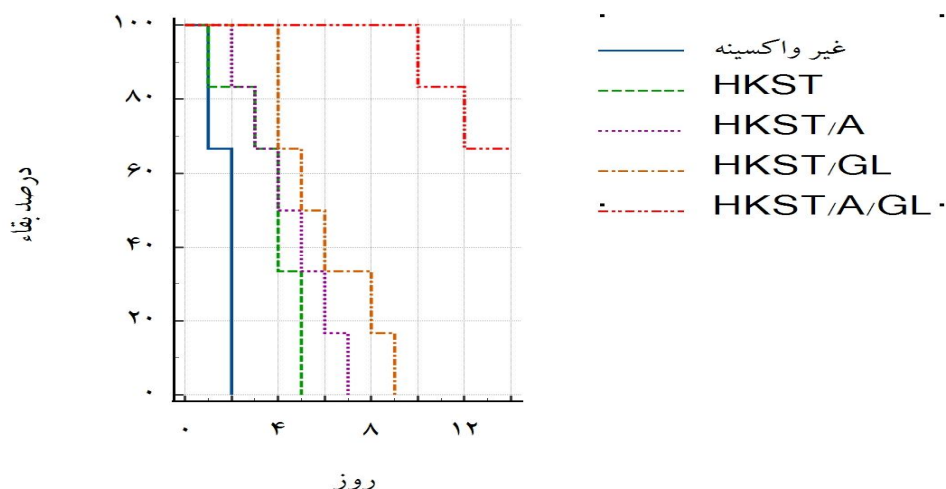


نمودار (۵): میزان بار باکتریایی در طحال موش‌های واکسینه شده

× نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه غیر واکسینه است. # نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST است. \$ نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/A است. % نشان‌دهنده اختلاف تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه HKST/GL است. (باکتری کشته‌شده، HKST/A: باکتری کشته‌شده + آلوم، HKST/GL: باکتری کشته‌شده + لیپوزم و HKST/GL/A: باکتری کشته‌شده + آلوم + لیپوزم).

هفته دوم پس از تلقیح با باکتری‌های زنده در دوز کشنده زنده نبودند (نمودار ۶). تنها یک موش در گروه دریافت‌کننده آلوم و شکل کشته‌شده باکتری توانست که یک هفته زنده بماند. تمام موش‌های گروه HKST پس از چالش با باکتری زنده تا روز ۵ تلف شدند. این عدد برای موش‌های گروه غیر واکسینه تنها دو روز بود (نمودار ۶).

همان‌طور که انتظار می‌رفت، با توجه به نتایج ذکرشده در بالا، بیشترین درصد بقای موش‌ها پس از دریافت دوز کشنده *S. typhimurium* زنده متعلق به گروه HKST/GL/A بود (نمودار ۶). در این گروه پس از سه هفته ۶۷ درصد موش‌ها زنده بودند. در گروه دریافت‌کننده واکسن‌های HKST/GL هیچ‌کدام از موش‌ها طی



نمودار (۶): میزان بقای موش‌ها پس از چالش با *S. typhimurium* زنده

حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است (باکتری کشته‌شده، HKST/A: باکتری کشته‌شده + آلوم، HKST/GL: باکتری کشته‌شده + لیپوزوم و HKST/GL/A: باکتری کشته‌شده + آلوم + لیپوزوم).

بحث و نتیجه‌گیری

دلیل اصلی استفاده از ادجوانت‌ها در واکسن‌های کشته‌شده فراهم آوردن آزادسازی تدریجی آنتی‌ژن‌ها و بیان مولکول‌های تحریک‌کننده مانند CD80 و CD86 توسط سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APC) (شامل سلول‌های دندریتیک، لنفوسیت‌های B و ماکروفاژها و نیز هدایت تولید سایتوکائین‌های پلاریزه‌کننده پاسخ‌های ایمنی توسط APC ها است (۲، ۱۷). منطق درمان ترکیبی برای کنترل بیماری‌های پیچیده مبتنی بر استفاده از دو یا چند دارو با مکانیسم‌های درمانی متفاوت است (۱۸، ۱۹). بدیهی است که ترکیب ادجوانت‌ها برای دستیابی به هم‌افزایی و حصول نتیجه مناسب‌تر هم به همان منطق نیاز دارد. آلوم (سولفات آلومینیوم پتاسیم) از سال ۱۹۲۰ به‌عنوان پرمصرف‌ترین ادجوانت شناخته‌شده است (۲۰). علاوه بر خاصیت ذخیره‌کنندگی و آزادسازی بطنی آنتی‌ژن، آلوم از طریق القای اینفلامازم ۲ توسط ماکروفاژهای بافتی موجب القای سایتوکائین و کموکائین‌هایی خواهد شد که در نهایت منجر به تجمع، بلوغ و مهاجرت APC ها پس از برداشت آنتی‌ژن می‌گردد (۱۷، ۲۰، ۲۱). درمجموع، آلوم یک پاسخ Th2 را القا می‌کند (۳، ۲۰)

در گذشته نشان داده شده است که سلول‌های دندریتیک تیمار شده با گلیسریریزیک اسید قادر به تأثیرگذاری بر تمایز سلول‌های T به سمت زیرمجموعه Th1 و در نتیجه ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی بودند. علاوه بر این، گلیسریریزیک اسید قادر به مسدود کردن سنتز پروستاگلندین-E2 از طریق مسدود کردن سیکلواکسیژناز-۲ است که منجر به افزایش هم‌زمان تولید اکسید نیتریک از طریق افزایش بیان ژن iNOS2 در ماکروفاژهای آلوده به لیسمانیا می‌شود. به عبارتی گلیسریریزیک اسید منجر به تقویت قدرت عملکردی ماکروفاژها می‌گردد. از سوی دیگر، Bhattacharjee و همکاران نشان داد که گلیسریریزیک اسید قادر به مسدود کردن بیان Th2، IL-10، و TGF- β از سلول‌های طحال موش‌های آلوده به لیسمانیا است. همچنین گزارش داده شده است که گلیسریریزیک اسید در موش موجب بلوغ DC ها را تقویت کند و این فعالیت ادجوانت مانند ممکن است ارزش درمانی بالقوه به دلیل افزایش بیان CD86، CD40، CD80، CD83 و کمپلکس اصلی سازگاری بافتی نوع II (MHC II) داشته باشد. همان‌طور که در مقدمه تشریح شده به دلیل حلالیت کم و اثرات جانبی گلیسریریزیک اسید، وارد کردن این ترکیب در یک فرم لیپوزومی منطقی است. لیپوزوم‌ها منجر به

¹ antigen-presenting

² Inflammasome

رسانش مؤثر گلاسرزیک اسید به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌گردند (۱۰).

نتایج پژوهش حاضر به‌وضوح نشان داد که لیپوزم گلاسرزیک اسید موجب تقویت پاسخ‌ها به سمت پاسخ‌های ایمنی سلولی در مقایسه با آلوم می‌گردد. مهم‌تر از آن، ترکیب آلوم و لیپوزم گلاسرزیک اسید پاسخ‌های قوی‌تر Th1 را القا کرد و به‌طور هم‌زمان ایمنی سلولی و ایمنی هومورال را تقویت کرد. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داده است که می‌توان پاسخ‌های ایمنی واکسن *S. typhimurium* را از طریق مخلوط متوکلوپرامید-آلوم، آلوم-نالوکسون یا مخلوط پروپرانولول-آلوم به‌عنوان کمک‌های واکسن تقویت کرد (۱۶). نتایج تحقیق حاضر در رابطه با مزایای لیپوزم اسید گلاسرزیک به‌عنوان یک ادجوانت همراه با شواهد قبلی در مورد فعالیت کمکی پروپرانولول و نالوکسان حاکی از آن است که ریزمحیط در زمان تشکیل پاسخ‌های ایمنی نقش اساسی در سرنوشت پاسخ ایمنی اکتسابی علیه آنتی‌ژن‌ها دارد. برخلاف یک ترکیب محرک ایمنی، یک ادجوانت باید در مخلوط کامل با یک آنتی‌ژن تزریق شود تا اثر مفید خود را در افزایش پاسخ ایمنی خاص در برابر یک آنتی‌ژن تنها زمانی که پاسخ‌های ایمنی خاص تشکیل می‌شود، اعمال کند (۲۰). به همین دلیل، مشابه آزمایش‌های ذکرشده در بالا، لیپوزم اسید گلاسرزیک در مخلوطی با شکل کشته‌شده سالمونلا تیفی موریوم تجویز شد.

نتایج پیشین نشان داد که لیپوزم‌های گلاسرزیک اسید به‌طور قابل‌توجهی تیتراژ آنتی‌بادی از کلاس‌های IgG و IgM را در مرغ‌های واکسینه شده با واکسن نیوکاسل افزایش داده است (۱۰). آلوم نیز یکی از ادجوانت‌های معروف است که ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی را به دنبال استفاده از شکل کشته‌شده پاتوژن‌ها افزایش می‌دهد (۷، ۸، ۱۷). براساس یافته‌های حاضر، هر دو ادجوانت‌های آلوم و لیپوزم‌های گلاسرزیک اسید در افزایش آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه سالمونلا تیفی موریوم موفق بودند. علاوه بر این، ترکیب این دو عامل منجر به اثر هم‌افزایی در تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه سالمونلا تیفی موریوم شد.

بسته به نوع ساینوکائین‌های تولید شده توسط APC ها، لنفوسیت‌های T در جهات مختلف پلاریزه می‌شوند و عملکردهای متفاوتی را به عهده می‌گیرند IFN- γ به‌عنوان ساینوکائین اصلی پاسخ‌های Th1 در نظر گرفته می‌شود (۲۲). از سوی دیگر، IL-4، به‌عنوان ساینوکائین اصلی Th2 محسوب می‌شود (۲۲، ۲۳). مطمئناً ریزمحیط ایجاد شده توسط ادجوانت‌ها در پلاریزه کردن پاسخ ایمنی مؤثر است. نقش آلوم در پلاریزه کردن پاسخ‌ها به سمت Th2 کاملاً شناخته شده است (۲۰). همان‌طور که ذکر شد بر عکس آلوم، سلول‌های دندریتیک تیمار شده با گلاسرزیک اسید قادر به

تأثیرگذاری بر تمایز سلول‌های T به سمت زیرمجموعه Th1 بوده‌اند (۲۴). بر این اساس، داده‌های حاضر نشان داد که تحریک *ex vivo* سلول‌های طحال موش‌هایی که HKST و آلوم دریافت کردند، منجر به بیان بالاتر mRNA IL-4 در مقایسه با سایر گروه‌ها شد. برعکس، تحریک *ex vivo* سلول‌های طحال موش‌هایی که HKST و ترکیبی از آلوم و لیپوزم گلاسرزیک اسید دریافت کردند، منجر به بیان بالاتر mRNA IFN- γ در مقایسه با گروه‌های دیگر شد. مرتبه دوم بیان mRNA IFN- γ مربوط به اسپلنوسیت سلول‌های طحالی موش‌هایی است که HKST و لیپوزم‌های گلاسرزیک اسید دریافت کرده‌اند.

لنفوسیت‌های T مسئول تولید آنتی‌بادی‌های با تیتراژ بالا از کلاس IgG هستند (۲۵، ۲۶). هر دو پاسخ‌های Th1 و Th2 در ایجاد پاسخ مؤثر ضد آنتی‌بادی مؤثر هستند (۲۶، ۲۷). با این حال، ایزوتیپ‌های آنتی‌بادی تولید شده در طول پاسخ‌های Th1، پتانسیل اپسونیزاسیون و قدرت فعال‌سازی مکمل قوی‌تری نسبت به آنتی‌بادی‌های تولید شده در طی پاسخ‌های Th2 دارند (۲۷). با توجه به موارد فوق، ایجاد پاسخ Th1 برای کنترل عفونتی مانند عفونت سالمونلا اهمیت بیشتری دارد. در موش‌ها، IFN- γ تولید شده توسط سلول‌های Th1 از سوئیچ ایزوتیپ IgG2a پشتیبانی می‌کند، درحالی‌که IL-4 تولید شده توسط سلول‌های Th2 از سوئیچ ایزوتیپ IgG1 پشتیبانی می‌کند (۲۸). تجزیه و تحلیل نتایج تحقیقات ما نشان داد که بیشترین نسبت آنتی‌بادی IgG2b به IgG1 در گروهی که HKST و ادجوانت ترکیبی دریافت کردند مشاهده شد. در این راستا، حیواناتی که HKST را با آلوم تجویز کردند، نسبت IgG2b/IgG1 کمتری در مقایسه با نسبت‌های مشاهده‌شده در موش‌هایی که HKST و لیپوزم گلاسرزیک اسید دریافت کردند، داشتند. این نتایج کاملاً مطابق با نتایج تجزیه و تحلیل انجام شده در مورد بیان mRNA IFN- γ و IL-4 بود.

سنجش واکنش حساسیت تأخیری (DTH) یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی در برابر یک آنتی‌ژن خاص است. بازیگران اصلی در واکنش DTH، Th1 و ماکروفاژها هستند. نتایج این سنجش با نتایج مربوط به پلاریزاسیون و بقای T-helper مطابقت داشت و بهترین نتایج در موش‌های دریافت‌کننده HKST و ادجوانت‌های ترکیبی مشاهده شد. ارزیابی تکثیر لنفوسیت اختصاصی *S. typhimurium* روش دیگری بود که برای ارزیابی ایمنی سلولی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. در اینجا، نتایج همچنین یک هم‌افزایی بین آلوم و لیپوزم اسید گلاسرزیک را در افزایش پاسخ‌های ایمنی ناشی از واکسن HKST نشان می‌دهد.

که اثرات ترکیب آلوم و لیپوزم گلاسرزیک اسید را به عنوان یک عنوان ادجوانت در واکسن حاصل از شکل کشته شده یک باکتری ارزیابی نموده است. بنابراین، مطالعات بعدی برای تأیید این نتایج و همین تأیید قابلیت کاربردی ترکیب آلوم و لیپوزم گلاسرزیک اسید در صورت ترکیب با واکسن‌هایی علیه سایر میکروارگانیسم‌هایی که نیاز به پاسخ‌های ایمنی هومرال و سلولی دارند، مورد نیاز است. همچنین برای نتیجه بخشی بهتر، می‌توان از روش‌های به دام اندازی آنتی‌ژن خالص در داخل لیپوزم نیز در پژوهش‌های آینده استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه ارومیه جهت حمایت مالی و تجهیزات، همچنین از جناب آقای اصغر علیاری کارشناس محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

بیشترین درصد بقا پس از به چالش کشیدن سلول‌ها با باکتری‌های زنده متعلق به گروه دریافت‌کننده واکسن و ادجوانت ترکیبی بود و پس از آن موش‌های دریافت‌کننده HKST و لیپوزم گلاسرزیک اسید، موش‌هایی که HKST و آلوم دریافت کردند و در نهایت موش‌هایی که فقط HSKT دریافت کردند، قرار گرفتند. همان‌طور که انتظار می‌رفت، گروهی که کمترین درصد بقا را داشتند، گروهی بودند که هیچ واکسنی دریافت نکردند.

به‌طور کلی، ترکیب آلوم و لیپوزم گلاسرزیک اسید به عنوان یک ادجوانت در ارتباط با واکسن HKST می‌تواند ایمنی سلولی و هومرال را ایجاد کند و پاسخ ایمنی را به سمت Th1 تغییر دهد. بنابراین، این ترکیب ممکن است ابزارهای جدید و ایمن را برای تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی ناشی از واکسن در برابر میکروب‌ها و سرطان‌های مختلف آماده کند. علاوه بر این، نتایج حاضر نشان داد که تجویز لیپوزم گلاسرزیک اسید، حتی بدون آلوم، همراه با واکسن HKST باعث افزایش ایمنی سلولی می‌شود. بر اساس اطلاعات نویسندگان پژوهش حاضر، این مطالعه اولین تحقیقی است

References:

- Andre FE, Booy R, Bock HL, Clemens J, Datta SK, John TJ, et al. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. *Bull World Health Organ* 2008;86(2):140-6. <https://doi.org/10.2471/BLT.07.040089>
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009;30(1):23-32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>
- Mazloomi E, Jazani NH, Shahabi S. A novel adjuvant, mixture of alum and the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol, elicits both humoral and cellular immune responses for heat-killed *Salmonella typhimurium* vaccine. *Vaccine* 2012;30(16):2640-6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.017>
- Takaya A, Yamamoto T, Tokoyoda K. Humoral immunity vs. *Salmonella*. *Front Immunol* 2020; 10: 3155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03155>
- Enesl  tt K, Golovliov I, Ryd  n P, S  jstedt A. Vaccine-mediated mechanisms controlling replication of *Francisella tularensis* in human peripheral blood mononuclear cells using a co-culture system. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00027>
- Chan J, Mehta S, Bharrhan S, Chen Y, Achkar JM, Casadevall A, et al., editors. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell Infect* 2014; Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.10.005>
- Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo J-E, Choi J, et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res* 2017;40(11):1238-48. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
- Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR, Shi J. Adjuvants for animal vaccines. *Viral Immunol* 2018;31(1):11-22. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
- Ye Y, Chen F, Sun H, Li X, Xu S. Stemucronatoside K, a novel C21 steroidal glycoside from *Stephanotis mucronata*, inhibited the cellular and humoral immune response in mice. *Int. Immunopharmacol* 2008;8(9):1231-8.

- <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.04.014>
10. Zhao X, Fan Y, Wang D, Hu Y, Guo L, Ruan S, et al. Immunological adjuvant efficacy of glycyrrhetic acid liposome against Newcastle disease vaccine. *Vaccine* 2011;29(52):9611-7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.053>
 11. Abe N, Ebina T, Ishida N. Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol Immunol* 1982;26(6):535-9. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1982.tb00207.x>
 12. Gløgård C, Stensrud G, Hovland R, Fossheim SL, Klaveness J. Liposomes as carriers of amphiphilic gadolinium chelates: the effect of membrane composition on incorporation efficacy and in vitro relaxivity. *Int J Pharm* 2002;233(1-2):131-40. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00935-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00935-8)
 13. Gregoriadis G, Gursel I, Gursel M, McCormack B. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J Control Release* 1996;41(1-2):49-56. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(96\)01355-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(96)01355-7)
 14. Perrie Y, Crofts F, Devitt A, Griffiths HR, Kastner E, Nadella V. Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;99:85-96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.005>
 15. Gregoriadis G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol Today* 1990;11(3):89-97. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90034-7](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90034-7)
 16. Mohammadi A, Abtahi Froushani SM, DelireZh N, Ownagh A. Alum and metoclopramide synergistically enhance cellular and humoral immunity after immunization with heat-killed *Salmonella typhimurium* vaccine. *Int Immunopharmacol* 2021;101(Pt A):108185. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108185>
 17. Jazani NH, Parsania S, Sohrabpour M, Mazloomi E, Karimzad M, Shahabi S. Naloxone and alum synergistically augment adjuvant activities of each other in a mouse vaccine model of *Salmonella typhimurium* infection. *Immunobiology* 2011;216(6):744-51. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.10.005>
 18. Ghimire TR. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. *Springerplus* 2015;4(1):1-18. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0972-0>
 19. Abtahi Froushani SM, Delirezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. *Immunol Invest* 2014;43(1):54-68. <https://doi.org/10.3109/08820139.2013.825269>
 20. Golbahari S, Froushani SMA. Synergistic benefits of nicotine and thymol in alleviating experimental rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2019;239:117037. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117037>
 21. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *Int J Med Microbiol* 2012;61(7):927-34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038943-0>
 22. Harte C, Gorman AL, McCluskey S, Carty M, Bowie AG, Scott C, et al. Alum activates the bovine NLRP3 inflammasome. *Front Immunol* 2017;8:1494. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01494>
 23. Shushtari N, Froushani SMA. Caffeine augments the instruction of anti-inflammatory macrophages by the conditioned medium of mesenchymal stem cells. *Cell J (Yakhteh)* 2017;19(3):415.
 24. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Front Immunol* 2019;10:1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
 25. Richard SA. Exploring the pivotal immunomodulatory and anti-inflammatory potentials of glycyrrhizic and glycyrrhetic acids.

- Mediators Inflamm 2021;2021.
<https://doi.org/10.1155/2021/6699560>
26. Froushani SMA, Galeh HEG. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. Iran J Basic Med Sci 2014;17(9):632.
27. Muraile E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? Front Immunol 2014;5:603.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603>
28. Moriyama M, Nakamura S. Th1/Th2 immune balance and other T helper subsets in IgG4-related disease. Curr Top Microbiol Immunol 2017;401:75-83.
https://doi.org/10.1007/82_2016_40
29. Cêtre C, Pierrot C, Cocude C, Lafitte S, Capron A, Capron M, et al. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by Schistosoma mansoni in the semipermissive rat host. Infect Immun 1999;67(6):2713-9.
<https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.2713-2719.1999>

THE SYNERGISM OF THE COMBINED GLYCYRRHIZIC ACID AND ALUM LIPOSOME ON IMMUNE RESPONSES AGAINST THE KILLED FORM OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Zahra Zeinali¹, Seyyed Meysam Abtahi Froushani^{2*}, Abdolghafar Ownagh³, Asghar Zamani⁴

Received: 07 May, 2023; Accepted: 15 August, 2023

Abstract

Background & Aims: The killed preparation of microorganisms in combination with alum does not generally produce strong cellular immune responses. Glycyrrhizic acid is a triterpenoid saponin with immunomodulating properties. The present study was conducted to investigate the synergism of glycyrrhizic acid (GL) and alum liposome on immune responses against the killed form of *Salmonella Typhimurium* (HKST).

Materials & Methods: In this experimental study, male Balb/c mice in 5 groups of 15 were immunized with HKST vaccine alone or in combination with alum, GL or alum-GL combination twice with two weeks' interval. Fourteen days after the last vaccination, the immune responses against *Salmonella Typhimurium* and the protective potential of the vaccines were evaluated. Survival rate was monitored by Kaplan-Meier analysis. Other findings were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test. A level of $P < 0.05$ was considered significant.

Results: Delayed type hypersensitivity reaction, lymphocyte proliferation, IgG2a antibody titer and the rate of improvement of survival against challenge with live were significantly increased in the group receiving combined adjuvant and HKST compared to other groups. In the group receiving combined adjuvant, the level of IFN- γ significantly increased and IL-4 significantly decreased more profound than other groups.

Conclusion: Alum-GL combination as an adjuvant synergistically increased cellular and humoral immunity after immunization with the HKST vaccine.

Keywords: Adjuvant, Alum, Glycyrrhizic Acid Liposome, *Salmonella typhimurium*, Vaccine

Address: Department of microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, Postal Code: 571531177

Tel: +989133000470

Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2023; 34(6): 320 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Ph.D Candidate, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³ Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁴ Assistant Professor of Chemistry, Department of Nanotechnology, Faculty of Chemistry, Urmia University, Urmia, Iran