مقاله پژوهشی

مقایسه یاورهای نانوذره‌ای بایاور مونتاناید در بیش ایمن‌سازی برای تولید سرم ضد مارگزیدگی

پریا ملجائی[۱]، حسین ذوالفقاریان[۲*]، مهدی بابائی[۳]، ناصر محمدپور دونیقی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، البرز، ایران
۳. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: امروزه انتخاب و به‌کارگیری یاورهای نانوذره‌ای مناسب بسیار مهم است. در تهیه ضد زهر به دلیل فقدان سرم‌های ضد مارگزیدگی مؤثر برای درمان آن و هزینه‌های زیاد خرید سرم‌های ضد مارگزیدگی خارجی، اهمیت تهیه نانوذره‌های مناسب داخلی برای تولید پلاسمای بیش ایمن را دوچندان می‌کند. به‌منظور کاهش معایب یاورهای متداول و تولید ضد زهر با توانمندی بالا بین یاورهای مختلف مقایسه‌ای ازنظر توانایی تولید سرم با عیار بالا و عوارض کم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۱۵ گوسفند در سه گروه انجام گرفت. گوسفندها با زهر خام مار کبرا (کفچه‌مار) به همراه سه یاور مونتاناید، فسفات آلومینیوم و یاور نانوذره‌ای پلی متیل متاکریلات به طریق زیر جلدی بیش ایمن‌سازی شدند. فاصله تزریقات متوالی یک هفته بود و بررسی‌های عوارض محل تزریق در هر هفته انجام شد.

نتایج: قدرت خنثی‌سازی نمونه سرم‌های به‌دست‌آمده از سه گروه مذکور بعد از ۹ هفته به ترتیب LD_{50} ۲/۲، ۱/۵ و ۲ در هر میلی‌لیتر به دست آمد. گوسفندان گروه پلی متیل متاکریلات حداقل واکنش موضعی را در محل تزریق نشان دادند. درصورتی‌که در دو گروه دیگر علائمی با شدت متوسط دیده شد.

نتیجه‌گیری: یاورهای نانوذره‌ای پلی متیل متاکریلات به علت افزایش پاسخ ایمنی قابل‌قبول و بی‌ضرری بسیار خوب، قابلیت جایگزینی بایاورهای روغنی را حداقل در شروع ایمن‌سازی برای تولید ضد زهر دارد.

کلمات کلیدی: یاورهای نانوذره‌ای، کفچه‌مار، پلی متیل متاکریلات، فسفات آلومینیوم، مونتاناید

مقدمه

سرم ضد مارگزیدگی به سرمی اطلاق می‌شود که خاصیت خنثی‌کننده سم مار را داشته باشد. این سرم کم‌وبیش هترولوگ (Heterologous) است و با ایمن‌سازی حیوان (غالباً اسب) بر ضد سموم مار تهیه می‌گردد. حیوان با مقادیر فزاینده یک زهر یا مخلوطی از سم‌ها به مدت چندین ماه مورد تلقیح قرار می‌گیرد. تلقیح یک زهر خاص منجر به تولید سرم ضد مارگزیدگی اختصاصی یک‌گونه می‌شود. درحالی‌که با تلقیح مخلوطی از سم‌ها می‌توان به سرمی بر ضد مارگزیدگی گونه‌های مختلف مارهایی که زهر آن‌ها در مخلوط مورد تلقیح مورداستفاده قرار گرفته است، دست یافت. تلقیح مداوم و فزاینده زهر به حیوان باعث تولید پادتن خنثی‌کننده (IgG) در خون حیوان، بدون تأثیر زهر بر روی حیوان می‌شود. امروزه یاورهایی که در مخلوط تلقیح مورداستفاده قرار می‌گیرند، با آزادسازی تدریجی پادگن، باعث کاهش خطر برای حیوان می‌شوند. درنهایت از حیوان خون‌گیری شده و سرم بیش ایمن (هایپرایمن) به‌عنوان منبع تولید سرم ضد مارگزیدگی مورداستفاده قرار می‌گیرد (۱).

انتخاب صحیح زهرمارها برای تولید ضد سم‌هایی که ظرفیت پوشش غالب موارد مارگزیدگی را در یک منطقه جغرافیایی داشته باشد، از اهمیت بسزایی برخوردار است. ترکیب زهرمارها

*نویسنده مسئول: **حسین ذوالفقاریان**، بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، البرز، ایران
Email: zolfagharianh@yahoo.com

بسیار پیچیده است و تفاوت‌های قابل‌ملاحظه‌ای در ترکیب زهرمارهای داخل یک‌گونه و در بین گونه‌ها وجود دارد. به همین دلیل طراحی یک مخلوط پادگنی برای تولید یک سرم ضد مارگزیدگی حائز اهمیت است (۲).

دوزی که برای ایمن‌سازی انتخاب می‌شود باید به نحوی تعیین گردد که حداکثر پاسخ ایمنی را ایجاد کند و درعین‌حال هزینه‌های مربوط به استحصال سم را کاهش دهد و برای حیوان بی‌خطر باشد (۳).

استفاده از نانوذره‌ها به‌عنوان یاور برای واکسن از اولین زمینه‌هایی است کهاز کاربرد آن‌ها موردتوجه قرار گرفت. رایج‌ترین روش برای آماده‌سازی نانوذره‌ها برای چنین مقصودی پلیمریزاسیون امولسیونی است. پلیمرهایی که عموماً بدین منظور مورداستفاده قرار می‌گیرند، عبارت‌اند از پلی متیل متاکریلات (۴)، پلی اکریل آمید و پلی الکیل سیانواکریلات‌ها که از میان آن‌ها پلی متیل متااکریلات به‌عنوان مناسب‌ترین و مطلوب‌ترین ماده شناخته شده است (۵). عیب عمده نانوذره‌های ساخته‌شده از پلی اکریل آمید و یا پلی الکیل سیانواکریلات آن است که برای تولید آن‌ها نیاز به مقدار زیادی حلال‌های آلی و سطح‌فعال وجود دارد که فرآیند تمیزی پرزحمت (در مورد پلی اکریل آمید) و یا تقلیل تأثیر یاورهای حاصله (در مورد پلی آلکیل سیانواکریلات) را به دنبال خواهد داشت (۶).

در مقابل، نانوذره‌های پلی متیل متاکریلات (PMMA) با تعداد قابل‌توجهی از پادگن‌ها بازده بسیار خوبی از خود به نمایش می‌گذارند. فرآیند تولید آن‌ها ساده و راحت بوده، بدون مشکل می‌توان مقیاس را افزایش داد و خود ماده PMMA ازنظر سمیت به‌کندی زیست تجزیه‌پذیر است (۷ و ۸).

می‌توان نانوذره‌های PMMA را با حل کردن مونومر متیل متاکریلات در آب مقطر و یا بافر تا غلظت ۲٪ تهیه کرد. پلیمریزاسیون را می‌توان با اشعه دهی گاما و یا با حرارت در حضور یک آغازگر پلیمریزاسیون مانند آمونیوم پرکسو دی سولفات یا پتاسیم پروکسودی سولفات انجام داد (۹ و ۱۰).

درنهایت باید اذعان داشت که مشکلات عمده در تهیه و استفاده از سرم‌ها (مانند غیرفعال شدن زهر قبل از تلقیح آن به حیوان، تخلیص سرم ضد مارگزیدگی، ارزیابی توانمندی سرم ضد مارگزیدگی و عوارض جانبی سرم‌های ضد مارگزیدگی) هنوز هم کاملاً برطرف نشده‌اند. امروزه علاوه بر ملاحظات همه‌گیر شناختی، زیست‌شیمیایی و ایمنی‌شناختی، نقطه نظرات تجاری و اقتصادی نیز مدنظر قرار گرفته است (۱۱).

درمان با سرم در حال حاضر تنها درمان اختصاصی برای مارگزیدگی است و عدم دسترسی به سرم‌های ضد مارگزیدگی مؤثر برای درمان مارگزیدگی‌هایی که در نقاط مختلف دنیا اتفاق می‌افتند، همچنان یکی از موارد حساس بهداشتی در سطح جهانی است. پیچیدگی‌های موجود در تولید سرم‌های ضد مارگزیدگی و به‌طور مشخص اهمیت تهیه زهرمار مناسب برای تولید پلاسمای بیش ایمن، کاهش تعداد تولیدکنندگان و آسیب‌پذیر بودن سیستم‌های تولید در کشورهای درحال‌توسعه (۱۲)، تحقیقات در مورد استفاده از یاورهای نانوذره‌ای را در مقایسه با دیگر یاورها در بیش ایمن‌سازی برای تولید سرم ضد مارگزیدگی ضروری می‌سازد.

مواد و روش ها

سم لیوفیلیزه مار کبرا (کفچه‌مار؛ *Naja naja oxiana*) از بخش جانوران سمی مؤسسه رازی تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم سم لیوفیلیزه مار پس از توزین در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. تعداد ۲۰ سر گوسفند در چهار گروه ۵ تایی (سه گروه آزمایشی و یک گروه شاهد) انتخاب شد.

تهیه پادگن بایاور نانوذره پلی متیل متاکریلات

خالص‌سازی مونومر

برای خالص‌سازی ترکیبات بازدارنده پلی متیل متاکریلات، ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول حاوی ۲۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم و ۵ گرم کلرید سدیم خارج شد. مرحله خالص‌سازی دوباره انجام شد تا همه پایدارکننده‌ها خارج شوند. در ادامه متیل متاکریلات با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سه بار شسته شد و مونومر اشباع‌شده با آب در دمای ۸-۲ °C نگهداری گردید.

پلیمریزاسیون با تابش اشعه گاما و آغازگر شیمیایی

مقدار ۱٪ از مونومر خالص‌سازی شده پلی متیل متاکریلات، در محلول ۰/۹٪ نمک، حل شد. این مخلوط سپس در پژوهشگاه انرژی اتمی تحت تابش اشعه گاما قرار گرفت.

برای پلیمریزاسیون با تابش آغازگر شیمیایی، ۵ لیتر آب مقطر، در فرمانتور به مدت یک ساعت توسط نیتروژن گازدهی شد. مقدار ۳۳/۷۵ میلی‌مول از مونومر پلی متیل متاکریلات به آب مقطر اضافه و حل گردید. ۱/۶۵ میلی‌مول پتاسیم پروکسی دی سولفات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل و به محلول فوق اضافه

شد. برای پلیمریزاسیون دما تا ۶۵ °C افزایش یافت و محلول به مدت دو ساعت در همین دما قرار گرفت. برای پلیمریزه شدن کامل تمام باقیمانده‌های مونومری دما تا ۹۰ °C افزایش یافت (۱۳). سوسپانسیون به‌دست‌آمده در ۸۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در مقدار کمی آب مقطر حل شد و در ویال‌های ۸ میلی‌لیتری لیوفیلیزه گردید.

سپس ۵۰ میلی‌گرم از نانوذره‌های لیوفیلیزه شده به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و در حمام حاوی یخ حداقل به مدت یک ساعت در سونیکاتور قرار گرفت. سوسپانسیون فوق با نسبت ۱:۱۰۰ رقیق گردید و مجدداً به مدت یک ساعت در سونیکاتور قرار داده شد. از سوسپانسیون سونیکه شده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM عکس‌برداری شد.

آماده‌سازی پادگن

پلیمریزاسیون در حضور پادگن توسط تابش گاما انجام گرفت. دوزهایی در حدود ۵ kgy در حضور پادگن انتخاب شد و برای پادگن‌های حساس به تابش گاما نیز از دوزهایی در حدود ۱/۵ kgy استفاده شد (۱۴).

برای جذب سطحی پادگن، سوسپانسیون با پادگن موردنظر مخلوط گردید و حداقل به مدت ۱۴ ساعت هم زده شد. نانوذره‌های لیوفیلیزه شده با استفاده از اولتراسونیک مجدداً حل شد (۴۵ دقیقه) و سونیکاسیون در سه زمان ۱۵ دقیقه‌ای و در سه روز متوالی انجام گرفت. محلول سونیکه شده در دمای ۸-۲ °C نگهداری شد. درصورتی‌که پادگن مربوطه در مقابل اولتراسونیک پایدار نباشد، می‌بایست نانوذره‌ها را جداگانه با آب، محلول نمک ۰/۹٪ و یا محلول بافر مرطوب نمود و سپس با پادگن مخلوط کرد (۱۵).

نانوذره‌های آماده‌شده با پادگن تا غلظت نهایی ۰/۵٪ از PMMA به دست آمد. سوسپانسیون قبل از به‌کارگیری به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد و در طی این مدت به‌آرامی روی همزن مغناطیسی هم خورد.

تهیه پادگن

تهیه پادگن بایاور روغنی: برای این منظور از روغن معدنی مونتاناید ۷۰ به نسبت ۷۰ به ۳۰ استفاده شد. پس از اضافه کردن پادگن به روغن به مدت ۳۰ دقیقه با هموژنایزر در آب همگن گردید.

تهیه پادگن بایاور فسفات آلومینیوم: برای تهیه ژل فسفات آلومینیوم، میزان زهر موردنیاز در ۱۶ میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد و سپس با افزودن تدریجی و هم‌زمان ۱/۵ میلی‌لیتر تری کلرید آلومینیوم ۱۰٪ و ۱/۷ میلی‌لیتر سود ۰/۵ نرمال روی استیرر ژل تشکیل گردید.

تهیه پادگن بایاور فروند کامل: یاور فروند کامل به نسبت مساوی با مقدار مناسب پادگن مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه با هموژنایزر همگن گردید. در جریان هموژنیزاسیون لوله حاوی پادگن در آب یخ قرار داده شد.

بیش ایمن‌سازی حیوان

برای این منظور ۱۵ سر گوسفند دوساله و سالم که ازنظر سلامتی مورد آزمایش بالینی و نیز خون‌شناسی و بیوشیمیایی خون قرار گرفته بودند، انتخاب و در سه گروه ۵ تایی تقسیم

جدول ۱- پروتکل ایمن‌سازی زهر کبرا با مونتاناید، فسفات آلومینیوم و PMMA

روز	سم (mg)	یاور (ml)			حجم تزریق (ml)	نحوه تزریق
		مونتاناید	فسفات آلومینیوم	PMMA		
۱	۰/۰۱۵	۱	۱	۱	۲	SC
۷	۰/۰۳	۱	۱	۱	۲	SC
۱۴	۰/۰۶	۱	۱	۱	۲	SC
۲۱	استراحت					
۲۸	۰/۱۲	۱/۴	۱/۹*	۱*	۲	SC
۳۵	۰/۲۴	۱/۴	۱/۹	۱	۲	SC
۴۲	۰/۵	۱/۴	۱/۹	۱	۲	SC
۴۹	۱	۱/۴	۱/۹	۱	۲	SC
۵۶	۲	۱/۴	۱/۹	۱	۲	SC
۶۲	خون‌گیری					

* یاور همراه با بافر

شد. ایمن‌سازی اولیه بایاور فروند کامل در تمام گروه‌ها انجام شد و در ادامه ایمن‌سازی، هر گروه به‌طور جداگانه بایاورهای مونتاناید، فسفات آلومینیوم و PMMA مورد تزریق قرار گرفتند. جدول ۱ زمان‌بندی ایمن‌سازی را نشان می‌دهد.

از تمامی گوسفندان در هفته هشتم (یک هفته پس از آخرین تزریق)، خون‌گیری شد. خون‌گیری توسط سرنگ‌های ۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۵ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۳۰٪ انجام گردید. پلاسمای خون حیوانات بعد از یک‌شب قرار گرفتن در یخچال جدا شد و تا زمان آزمایش در فریزر ۷۰°C- نگهداری گردید.

آزمایش توانمندی آنتی سرم

در این روش ترکیب زهر و سرم به‌دست‌آمده در مقادیر متفاوت مخلوط شد و به موش تزریق گردید. توانمندی ضد زهر بر اساس میزانی از زهر خشک که توسط یک میلی‌لیتر سرم خنثی می‌شود، در نظر گرفته شد. در آزمایش توانمندی، سنجش بر مبنای زهر مرجع انجام گرفت.

ارزیابی عوارض جانبی

دمای بدن تمام حیوانات (سه گروه آزمایشی و یک گروه شاهد) به مدت ۳ روز پس از تزریق ارزیابی شد. ضایعات محل تزریق به‌طور مداوم در طول انجام آزمایش بررسی گردید. بررسی‌ها بر اساس میزان التهاب، تورم و زخم در محل تزریق انجام گرفت. علاوه بر آن معاینات بالینی ازنظر سلامتی حیوان و شرایط مطلوب بدنی مدنظر قرار داشت.

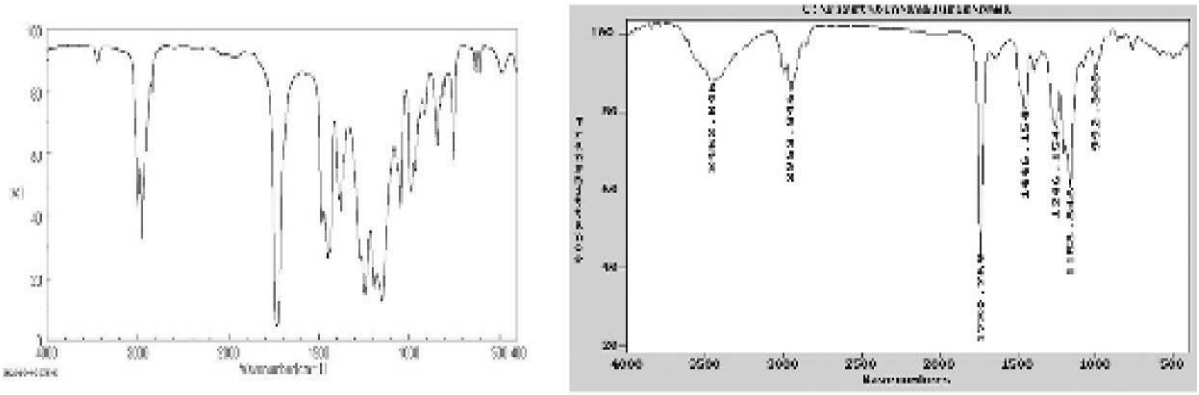
نتایج

تهیه پلیمر نانوذره متیل متاکریلات

با توجه به اینکه تابش اشعه در پژوهشگاه انرژی اتمی قابلیت مهار چندانی نداشت، تابش با حداکثر گریدهای حفاظتی و فاصله از مرکز انجام گرفت. به علت بالا بودن میزان اشعه تابش، تغییر رنگ در شیشه‌ها ایجاد شد و ذرات بسیار بزرگ و نامحلول پدید آمد. راندمان بهینه در نرخ تابشی در حدود ۲۵-۵ gy بر دقیقه به دست آمد. پلیمریزاسیون در دوز حدود ۰/۳ kgy تا ۰/۴ شروع شد و دوزی در حدود ۲۵ kgy تقریباً منجر به تبدیل کامل گردید. دوز تقریبی مورداستفاده با پرتودهنده‌های موجود در مدت یک دقیقه (حداقل زمان تابش) به ۷۰۰ kgy رسید.

با پلیمریزاسیون به‌وسیله آغازگر شیمیایی با استفاده از ۱/۶۵ میلی‌مول آغازگر برای ۳۳/۷۵ میلی‌مول و MMA با دمای ۸۵ °C و به مدت ۲ ساعت ذراتی در حد ۱۶۹ نانومتر حاصل شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی ذراتی را در حدود ۱۱۰ تا ۲۰۰ نانومتر نشان داد (۱۱).

بر روی PMMA لیوفیلیزه شده طیف‌سنجی FTIR انجام گرفت و مقایسه آن با اینفروگرام مرجع (طیف نشری یک لامپ با گستره طیفی وسیع) نشان داد که طیف حاصل از محصول (طیف نشری همان لامپ وقتی‌که از نمونه می‌گذرد) تطابق خوبی با طیف مرجع دارد (نمودار ۱).



نمودار ۱- طیف‌سنجی FTIR (سمت راست: طیف به‌دست‌آمده از فراورده و سمت چپ: طیف مرجع)

آزمایش توانمندی آنتی سرم

یاور نانوذره پلی متیل متاکریلات درعین‌حال که آسیب کمتری در محل تزریق ایجاد کرد، در تولید عیار پادتن بایاور روغنی قابل‌مقایسه بود (جدول۲). PMMA در یک دوره ایمن‌سازی، پادتنی با عیار متوسط LD_{50} ۲ ایجاد کرد که در مقایسه با مونتاناید که عیاری برابر LD_{50} ۲/۲ ایجاد کرد، اندکی پایین‌تر بود. گروه فسفات آلومینیوم پایین‌ترین دوز کشندگی را در بین سه گروه ایجاد کرد (LD_{50} ۱/۵) که اختلاف آن با دوز کشندگی متوسط گروه PMMA معنادار بود ($P< 0.01$).

جدول ۲- تیتر سرم‌های به‌دست‌آمده

پلی متیل متاکریلات		مونتاناید		فسفات آلومینیوم	
LD_{50}/ml	شماره نمونه	LD_{50}/ml	شماره نمونه	LD_{50}/ml	شماره نمونه
۲/۱۳	۱	۲/۲۱	۶	۱/۴۸	۱۱
۱/۸۸	۲	۲/۳۳	۷	۱/۶۸	۱۲
۲/۱۱	۳	۲/۱۳	۸	۱/۵۰	۱۳
۲/۰۶	۴	۲/۲۴	۹	۱/۴۶	۱۴
۱/۹۱	۵	۲/۳۱	۱۰	۱/۵۳	۱۵

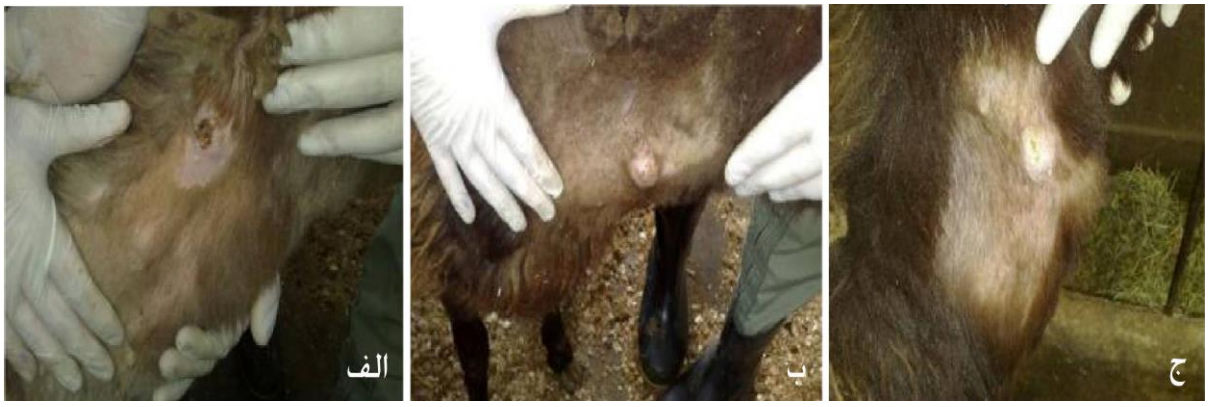
عوارض جانبی تزریق

تمامی گوسفندان تحت آزمایش، بدون در نظر گرفتن این‌که با کدام یاور مورد ایمنی‌زایی قرار گرفته‌اند، افزایش درجه حرارت گذرایی در حدود ۰/۵ تا ۱ درجه سانتی‌گراد نشان دادند که به‌طور متوسط ۴۸ ساعت طول کشید. طول مدت تب در مورد گوسفندانی که با PMMA مورد تزریق قرار گرفته بودند، ۱۲ ساعت کمتر بود. هیچ‌کدام از نمونه‌های گروه PMMA عارضه قابل‌توجهی در محل تزریق نشان ندادند، ولی در نمونه‌های گروه مونتاناید در هر ۵ مورد تورم و سفتی در محل تزریق مشاهده شد که در ۲ مورد تورم منجر به زخم گردید که مورد درمان با اسپری کلرامفنیکل قرار گرفت (شکل ۱). در گروه فسفات آلومینیوم اگرچه تورم و سفتی در محل تزریق به وجود آمد، ولی منجر به زخم در محل تزریق نشد (شکل ۱، ج و جدول ۳).

بحث

از زمانی که تولید ضد زهر به‌صورت تجاری آغاز شد تا به امروز آنتی سرم‌های تولیدشده از همان اصول اولیه پیروی می‌کنند. با توجه به پیشرفت‌هایی که درزمینه ایمنی‌شناسی پدید آمده است، بسیاری از تولیدکنندگان ضد زهر در سراسر دنیا کماکان از یاورهای سنتی در حیوانات اهداکننده استفاده می‌کنند (۱۸ و ۱۹). البته این موضوع چندین سال است که موردبحث واقع می‌شود. با در نظر گرفتن اهمیت جایگزین کردن یک یاور مناسب برای یاورهای سنتی موجود به‌طوری‌که هم کارآیی و هم بی‌ضرری آن به نحو مطلوبی تأمین شود، انجام چنین تحقیقاتی ضروری به نظر می‌رسد.

امروزه آنتی‌سرم‌ها با روش مشابهی تولید می‌شوند. یاورها اگرچه در حوزه ایمنی‌شناسی توسعه فراوانی یافته‌اند، اما



شکل ۱- الف: زخم و تورم ناشی از تزریق پادگن به همراه مونتاناید؛ ب: آبسه ناشی از تزریق پادگن به همراه مونتاناید؛ ج: قرمزی و سفتی ناشی از تزریق پادگن به همراه فسفات آلومینیوم

جدول ۳- عوارض محل تزریق پس از تزریق زیر جلدی (s: تورم، a: آبسه، r: قرمزی، w: زخم)

یاور مورداستفاده	گوسفندان مورد آزمایش	هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳	هفته ۴	هفته ۵	هفته ۶	هفته ۷	هفته ۸	هفته ۹	هفته ۱۰
پلی متیل متاکریلات	۱	nd	s, r	s, r	s, r	nd	-	-	-	-	-
	۲	nd	s, r	-	s	nd	-	-	-	-	-
	۳	nd	s	s,r	s	nd	-	-	-	-	-
	۴	nd	s, r	r	s	nd	-	-	-	-	-
	۵	nd	s	s	s, r	nd	-	-	-	-	-
مونتانايد	۶	nd	s, r	s	s	nd	s, r, w	s, r	s	s, r	s
	۷	nd	s	s	s	nd	s	s	s	s	s
	۸	nd	s	s	s, r	nd	s, r	s	s	s	-
	۹	nd	s, r	s	s	nd	s, r	s, r, w	s	s	s
	۱۰	nd	s	s	s	nd	s	s	s	s	s
فسفات آلومینیوم	۱۱	nd	s	s	s, r	nd	s	s	s	s, r	s
	۱۲	nd	s	s	s	nd	s, r	s	s	s, r	s
	۱۳	nd	s, r	s, r	s, r	nd	s	s, r	s	s	s
	۱۴	nd	s	s	s	nd	s	s	s	s	s, r
	۱۵	nd	s, r	s	s	nd	s	s, r	s	s, r	s

تولیدکنندگان ضد زهر در سراسر دنیا از یاورهای سنتی و حیوانات اهداکننده مثل اسب استفاده می‌کنند (۱۶). به‌طورمعمول، اسب برای تولید سرم‌های درمانی مورداستفاده زیادی دارد. اسب‌ها آرام بوده و مقدار زیادی سرم یا پلاسما تولید می‌کنند و درعین‌حال دوزهای بالای زهر را برای تولید پادتن‌های خنثی‌کننده می‌توانند تحمل کنند. اگرچه واکنش‌های بافتی می‌توانند مشکل‌ساز باشند، بااین‌حال معایبی هم دارند؛ بعضی از افراد نسبت به پروتئین‌های اسبی حساس هستند و غالباً بروز واکنش نسبت به سرم‌های درمانی در آن‌ها محتمل است. به‌علاوه نگهداری اسب‌ها نیاز به تخصص‌های قابل‌ملاحظه‌ای دارد و در مناطق گرمسیری قابلیت پرورش خوبی ندارند. همین محدودیت باعث شد، گوسفند برای این پژوهش به کار گرفته شود. سرم‌های درمانی گوسفندی ارزان‌تر تولید می‌شوند و علاوه بر آن، نگهداری گوسفند در بیشتر کشورهایی که مارگزیدگی در آن‌ها بومی است، بسیار راحت‌تر است (۳).

جابجایی، ایمن‌سازی و خون‌گیری از گوسفند آسان است و یاورهایی با پایه روغنی را خوب تحمل می‌کند. هر گوسفند سالانه ۴ تا ۵ لیتر ضد سرم تولید می‌کند و ۵ تا ۸ سال می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد. گلبول‌های سفید در خون گوسفند حاوی ماده ضد انعقاد، بسیار آرام‌تر رسوب می‌کنند و ازاین‌رو پلاسمافرزهای ساده‌تری را می‌توان برای آن‌ها طراحی کرد. خون گوسفند در عرض ۳۰ دقیقه لخته می‌شود و با یک سانتریفیوژ ساده می‌توان آن را جدا کرد.

مزیت اصلی استفاده از گوسفند پاسخ ایمنی خونی عالی آن است که احتمالاً تا حدی به خاطر امکان استفاده از یاور فروند در این حیوان است. پاسخ ایمنی سریع است و ضد سرم مناسب برای تولید ضد سم ۱۴ هفته پس از ایمن‌سازی اولیه به دست می‌آید.

این مطالعه تلاش کرده است یاور مناسبی را برای جایگزینی بایاورهای سنتی معرفی کند و همین‌طور امکان تولید آنتی‌سرم در حیوانات دیگری مثل گوسفند را بررسی نماید. انتخاب یک

یاور درواقع یک انتخاب اساسی بر پایه توازن بین میزان پادتن موردنیاز، اثرات التهابی پادگن و درد و ناراحتی حیوان است. یاور PMMA اگرچه در زمره یاورهایی نیست که اجازه مصرف آن در حیوانات اهلی داده شده باشد، ولی با توجه به قدرت ایمنی‌زایی بالا و ایجاد انتخاب و عوارض جانبی کم در محل تزریق می‌تواند در مواردی که حیوانات در چرخه غذایی انسان قرار نمی‌گیرند مورداستفاده قرار گیرد (۱۷).

در مطالعه واگمر و همکاران استفاده از نانوذره‌های IMS 3012 نشان داد که این نانوذره پاسخ ایمنی در برابر زهر کبرا را به طرز قابل‌توجهی افزایش می‌دهد (۱۳). نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه در طی ۴۳ هفته ایمنی‌زایی انجام گرفته بود. نتایج این تحقیق نیز با نتایج پژوهش واگمر همخوانی داشت، به‌طوری‌که یاور نانوذره PMMA درعین‌حالی که آسیب کمتری در محل تزریق ایجاد کرد، در تولید پاسخ ایمنی در یک دوره ایمن‌سازی، نسبت به گروه فسفات آلومینیوم، افزایش نشان داد.

در مورد غلظت‌های مختلف زهر و تأثیر آن درروند پاسخ ایمنی، تحقیقات نشان داده است که در غلظت‌های صفر تا ۲٪ مونومر متیل متاکریلات که به همراه ویروس آنفولانزا مورداستفاده قرار گرفته است، افزایش غلظت زهر تا میزان ۰/۵٪ زهر در محلول پلیمریزاسیون باعث افزایش پاسخ‌دهی می‌شود. با استفاده از غلظت‌های بالاتر کاهش پاسخ ایمنی را به همراه داشته است که این امر می‌تواند ناشی از افزایش قطر ذرات PMMA (تا ۵۰۰ نانومتر) و کاهش کارآیی یاور گردد. کپسوله شدن ویروس آنفولانزا در مقایسه با جذب سطحی آن روی PMMA عیار پادتن بیشتری ایجاد کرده است. این امر می‌تواند به خاطر محافظت بیشتر پادگن در برابر تخریب و عرضه تدریجی آن به سلول‌های عرضه‌کننده پادگن باشد. غلظت پادگن به‌عنوان یکی از عوامل اثرگذار در فرمولاسیون عنوان‌شده است و نشان می‌دهد که افزایش غلظت پادگن باعث افزایش میزان عیار پادتن می‌گردد (۱۷).

ترکیبات آلومینیوم مانند فسفات آلومینیوم یکی از قدیمی‌ترین و پرکاربردترین یاورهای مورداستفاده در واکسن‌های انسانی و دامی است. این ترکیب به علت بی‌ضرری، کم‌هزینه بودن و قابلیت استفاده با پادگن‌های مختلف، سال‌هاست که پرکاربردترین یاور در صنعت بشمار می‌رود (۱۱).

در بررسی نتایج در مورد پاک شدن فسفات آلومینیوم در محل تزریق، عدد تعجب‌برانگیز ۲۴ ساعت ذکر شده است؛ اما واقعیت این است که علیرغم از بین رفتن خود یاور، پادگن مدت زیادی در بدن حضور دارد. در مطالعه با نشانگر رادیواکتیو، ۹۰٪ فسفات آلومینیوم طی ۲۴ ساعت در محل تزریق جذب می‌شود. درصورتی‌که یاورهای نانوذره‌ای پلیمرها مدت‌زمان بیشتری در محل تزریق باقی می‌مانند. جذب شدن یاور و باقی ماندن پادگن نشان می‌دهد که مکانیسم دیگری برای ذخیره شدن پادگن در محل وجود دارد. نشان داده شده است به وجود آمدن گرانول در محل تزریق، مانع از تخلیه و جذب پادگن می‌شود و به همین دلیل پادگن می‌تواند مدت‌زمان زیادی (۷-۴ هفته) در محل تزریق بماند (۱۱).

نتیجه گیری

در انتخاب یک یاور، باید تعادل میان میزان تولید پادتن، حداقل اثرات التهابی پادگن و درد و ناراحتی که حیوان متحمل می‌شود برقرار گردد. در حال حاضر تمایل به مواردی چون آسانی مصرف، مقرون‌به‌صرفه بودن، بی‌ضرر و کارا بودن یاور که در برخی یاورهای روغنی دیده می‌شود، افزایش پیدا کرده است. بسیاری از این یاورها در مراحل مختلف کارآزمایی روی انسان و حیوان هستند. اهمیت این یاورها در عوارض جانبی کم و آماده مصرف بودن آن‌هاست. از طرف دیگر، پایین بودن کارایی تولید ضد زهر علیه زهر کبرا در مقایسه با سایر زهرها با استفاده از یاورهای مرسوم لزوم استفاده از یاورهای جدیدتر بر پایه نانوذره‌ها را برای پیدا کردن یاوری کارا نشان می‌دهد.

با در نظر گرفتن نتایج به‌دست‌آمده، یاور PMMA با توجه به ایجاد عارضه کم و عدم نیاز به آماده‌سازی‌های قبل از تزریق (مانند هموژنیزاسیون) و نیز ایجاد تیتر سرمی قابل‌قبول می‌تواند حداقل برای شروع ایمن‌سازی در تولید سرم‌های درمانی به کار گرفته شود. شایان‌ذکر است که هنوز ابهاماتی در خصوص نحوه تجزیه و دفع این یاور از بدن وجود دارد و همین امر باعث شده است که مصرف آن در حیواناتی که در چرخه غذایی انسان قرار می‌گیرند، مورد تأیید مراجعی چون FDA قرار نگیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه کسانی که سهمی در به انجام رساندن این تحقیق داشته‌اند قدردانی می‌نمایند. کد پایان‌نامه مربوط به این مقاله ۸۷۰۰۶-۱۸-۱۸-۲ می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Chatterjee SC, Dass B, Devi P. A comparative study on different methods of hyperimmunization of horses for the preparation of polyvalent anti-snake venom serum. Indian J Med Res. 1968;56(5):678-85.
2. Kalyan kumar B, Nanda SS, Venkateshwarlu P, Kiran kumar Y, Jadhav RT. Antisnake Venom Serum (ASVS). IJPBR. 2010;1(3):76-89.
3. Lalloo DG, David R, Theakston G. Snake Antivenoms. Clin Toxicol. 2003;41(3): 277-290.
4. Kreuter J, Speiser PP. In vitro studies of poly (methyl methacrylate) adjuvants. J Pharm Sci. 1976;65(11):1624-1627.
5. Vogel FR, Powell MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients: PMMA, in Vaccine Design. Pharm Biotechnol. 1995;6:141-228.
6. Zhaoa L, Setha A, Wibowoa N, Zhaoa C, Mitter N, Yua C, et al. Nanoparticle vaccines. Vaccine. 2014;32(3):327-337.
7. Ortiz R, Chen JL, Stuckey DC, Steele TWJ. Poly (methyl methacrylate) Surface Modification for Surfactant-Free Real-Time Toxicity Assay on Droplet Microfluidic Platform. ACS Appl Mater Interfaces. 2017;19;9(15):13801-13811.
8. Capelle MA, Brügger P, Arvinte T. Spectroscopic characterization of antibodies adsorbed to aluminium adjuvants: correlation with antibody vaccine immunogenicity. Vaccine. 2005;23(14):1686-1694.
9. Baissac L, Buron CC, Hallez L, Berçot P, Hihn JY, Chantegrel L, Gosse G. Synthesis of sub-micronic and nanometric PMMA particles via emulsionpolymerization assisted by ultrasound: Process flow sheet and characterization. Ultrason Sonochem. 2017;4177(17):30120-30127.
10. Koh BT, Tan JH, Ramruttun AK, Wang W. Effect of storage temperature and equilibration time on polymethyl methacrylate (PMMA) bone cement polymerization in joint replacement surgery. J Orthop Surg Res. 2015;10(1):178-184.
11. Russell FE. Snake venom immunology: historical and practical consideration. J toxic: toxin reviews. 1988;7(1):1-82.
12. Stone SF, Isbister GK, Shahmy S, Mohamed F, Abeysinghe C, Karunathilake H, et al. Immune response to snake envenoming and treatment with antivenom; complement activation, cytokine production and mast cell degranulation. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(7):1-9.
13. Waghmarea A, Deopurkarb RL, Salvi N, Khadilkara M, Kalolikara M, Gadea SK. Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (Emulsion based) alongwith incomplete Freund's adjuvant for hyperimmunization of equines used for production of polyvalent snake antivenum. Vaccine. 2009;27(7):1067-1072.
14. Foss S, Grevys A, Sand KM, Bern M, Blundell P, Michaelsen TE, et al. Enhanced FcRn-dependent trans-epithelial delivery of IgG by Fc-engineering andpolymerization. J Control Release. 2016;10(223):42-52.
15. Kreuter J. Evaluation of nanoparticles as drug delivery systems I: preparationmethods. Pharm Acta Helv. 1983;58(8):196-209.
16. Fingola FF, Albertino SR, Abrantes Sde M, Zamith HP. Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus amebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-bothropic serum. J Pharm Biomed Anal. 2013;85(4):93-98.
17. Kreuter J, Nefzger M, Liehl E, Czok R, Voges R. Distribution and elimination of poly (methyl methacrylate) nanoparticles after subcutaneous administration to rats. J Pharm Sci. 1983;72(10):1146-1149.
18. Angulo Y, Estrada R, Gutierrez JM. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venom for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. Toxicon 1997;35(1):81–90.
19. Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, Koedam MA, Claassen I, Claassen I. Comparison of adjuvants for immune potentiating properties and side effects in mice. Veterinary Immunol Immunopathol 1995;48(1):123-38.

Original Article

The Comparison of Nanoparticle Adjuvant with the Montanide Adjuvant for Hyper-Immunization to Produce Anti-Snakebite Serum

Maljaee P[1], Zolfagharian H[2]*, Babaie M[3], Mohammadpour Dounighi N[2]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran
2. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3. Young Researchers and Elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 11 Aug 2017 Accepted: 25 Nov 2017

Abstract

Background & Objective: Currently selection and use of nanoparticle adjuvant is very important. Due to the lack of effective anti-snakebite serums to treat it and high cost of purchasing external anti-snakebite serums, preparation of suitable internal nanoparticles to produce hyper-immunization plasma has become very important. In order to minimize the disadvantages associated with traditionally used adjuvants in ovines and to produce potent antivenum, a comparison was made between various adjuvants for their immune-potentiation capacity and safety.

Material & Methods: The present study was conducted in 15 sheep, divided into three groups and hyper-immunized using crude venom of cobra snake (Naja naja oxiana) along with three adjuvants, Montanide, aluminum phosphate and poly methyl methacrylate through subcutaneous route at intervals of a week. Periodic standard safety assessments were done.

Results: The neutralization activity (LD_{50}) of pooled sera samples by 9^{th} week, obtained with aluminum phosphate, Montanide and poly methyl methacrylate groups were 1.5, 2.2 and 2 LD_{50}/ml respectively. The sheep of poly methyl methacrylate group showed minimum local reactions at injection site, while sheep from other two groups exhibited moderate reactions. However, these were transient and reabsorbed or healed subsequently.

Conclusion: Poly methyl methacrylate nanoparticle adjuvant could be a possible alternative to the emulsion adjuvants for primary phase of immunization in antivenomous preparation considering its acceptable immunopotentiation capacity and safety in donor animals.

Keywords: Nanoparticle adjuvant, Naja naja oxiana, Poly methyl methacrylate, aluminum phosphate, Montanide

***Corresponding Author: : Hossein Zolfagharian,** Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Email: zolfagharianh@yahoo.com