



ایمن سازی مخاطی با استفاده از واکسن های مبتنی بر پروبیوتیک نو ترکیب: راهکاری هوشمند با استفاده از Next-generation probiotics (NGPs)

نازنین مطهری^۱، توحید پیری قزاقیه^{۲*}، مجید صادقی زاده^۳

۱- گروه داروسازی، شرکت نصر فریمان، فریمان، ایران.

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه توسعه فناوری زیست یار صنعت، پارک علم و فناوری دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

*صندوق پستی: ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

tohidpirie@yahoo.com

پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۶

دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۲۵

چکیده

سیستم ایمنی مخاطی به عنوان خط اول دفاعی بدن، نقشی حیاتی در مقابله با عوامل بیماری زا ایفا می کند، اما واکسن های تزریقی سنتی در القای پاسخ ایمنی پایدار در سطوح مخاطی ناکارآمد هستند. هدف این مقاله، بررسی پتانسیل پروبیوتیک های نسل جدید (NGPs) به عنوان حاملین هوشمند و نوین برای ایمن سازی مخاطی است. در این مرور، ویژگی های متمایز NGPs نسبت به پروبیوتیک های سنتی، مکانیسم های طراحی واکسن های مبتنی بر این میکروارگانیسم ها، و نحوه تعامل آن ها با سیستم ایمنی میزبان مورد تحلیل قرار گرفته است. همچنین، مزایا، چالش های بالینی و موانع قانونی مرتبط با این فناوری بررسی شده است. نتایج نشان می دهد که NGPs (مانند *Akkermansia muciniphila* و *Faecalibacterium prausnitzii*) و باکتری *Lactococcus lactis* مهندسی شده به دلیل همزیستی طبیعی با انسان و خواص ایمونومدولاتوری قوی، پلتفرم هایی امیدوارکننده برای ارائه آنتی ژن ها هستند. این واکسن ها با تحریک همزمان ایمنی مخاطی (IgA) و سیستمیک، و با حذف نیاز به تزریق، می توانند پوشش واکسیناسیون را افزایش دهند. با این حال، چالش هایی نظیر حساسیت به اکسیژن، ملاحظات ایمنی زیستی و مقررات سخت گیرانه وجود دارد. پروبیوتیک های نسل جدید دریچه ای نوین در واکسن سازی گشوده اند. با وجود موانع فعلی، پیشرفت های زیست شناسی مصنوعی و فرمولاسیون می تواند NGPs را به ابزاری قدرتمند برای پیشگیری از بیماری های عفونی و درمان اختلالات التهابی در آینده تبدیل کنند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک های نسل جدید (NGPs)، ایمن سازی مخاطی، واکسن های نو ترکیب، واکسن های خوراکی، سیستم ایمنی، *Lactococcus lactis*، واکسن های زنده.

۱-مقدمه

سیستم ایمنی مخاطی به عنوان خط اول دفاعی بدن در برابر عوامل بیماری‌زا، نقشی حیاتی در حفظ سلامت ایفا می‌کند. با این حال، واکسن‌های تزریقی سنتی که عمدتاً بر تحریک ایمنی سیستمیک (همورال) تمرکز دارند، اغلب در القای پاسخ ایمنی قوی و پایدار در سطوح مخاطی ناکام می‌مانند [۱]. این محدودیت، به‌ویژه در برابر پاتوژن‌هایی که از طریق مجاری تنفسی، گوارشی و تناسلی وارد بدن می‌شوند، یک چالش جدی محسوب می‌شود؛ زیرا سطوح مخاطی نقطه ورود اصلی این عوامل بیماری‌زا هستند. علاوه بر این، واکسن‌های تزریقی معمولاً به تجهیزات استریل و نیروی متخصص نیاز دارند و فرایند تزریق نیز اغلب با درد و ناراحتی برای دریافت‌کننده همراه است که می‌تواند مانعی برای دستیابی به پوشش گسترده واکسیناسیون و اجرای برنامه‌های ایمن‌سازی همگانی باشند.

در پاسخ به این چالش‌ها، پژوهش‌های حوزه واکسن‌سازی به سمت توسعه واکسن‌های خوراکی و راهبردهای ایمن‌سازی مخاطی حرکت کرده است. واکسن‌های خوراکی با تحریک مستقیم لنفوئیدهای مرتبط با مخاط، مانند پلاک‌های پیه‌ری^۱ در روده، می‌توانند علاوه بر القای پاسخ ایمنی مخاطی، مانند ترشح ایمونوگلوبولین A (IgA)، پاسخ ایمنی سیستمیک را نیز همزمان فعال کنند [۲]. از مهم‌ترین مزایای این رویکرد می‌توان به حذف نیاز به تزریق، سهولت در توزیع و نگهداری، و پذیرش بالاتر توسط جامعه، به‌ویژه در کودکان اشاره کرد. با این حال، توسعه واکسن‌های خوراکی با چالش‌ها و موانع متعددی همراه است. از جمله این چالش‌ها می‌توان به تخریب آنتی‌ژن در محیط اسیدی معده و تجزیه آن توسط آنزیم‌های گوارشی و عبور از سد اپی‌تلیال اشاره کرد. بنابراین، طراحی و استفاده از حامل‌های هوشمند و مقاوم برای محافظت از آنتی‌ژن و انتقال هدفمند آن به بافت‌های ایمنی مخاطی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در سال‌های اخیر، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان حاملین زنده برای انتقال آنتی‌ژن‌ها به سیستم

ایمنی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. پروبیوتیک‌های سنتی (مانند لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها) به دلیل ایمنی شناخته شده و تاریخچه طولانی مصرف، کاندیدهای مناسبی بوده‌اند، اما محدودیت‌هایی در توانایی کلونیزاسیون و پایداری ژنتیکی دارند [۳]. این محدودیت‌ها منجر به ظهور مفهوم پروبیوتیک‌های نسل جدید^۲ (NGPs) شده است. پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs)، گروهی از باکتری‌های بومی روده که توسط متاژنومیک شناسایی شده‌اند و خواص درمانی و ایمونولوژیک برجسته‌تری نسبت به پروبیوتیک‌های سنتی از خود نشان می‌دهند.

پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs)، مانند *Faecalibacterium* و *Akkermansia muciniphila* به دلیل نقش کلیدی آنها در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی، پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان پلتفرم‌های واکسن دارند [۴]. این میکروارگانیسم‌ها که به عنوان «باکتری‌های فرصت‌طلب اما مفید» شناخته می‌شوند، می‌توانند با مهندسی ژنتیک برای بیان آنتی‌ژن‌های خاص، تعامل هدفمندی با سلول‌های ایمنی مخاطی برقرار کنند. استفاده از NGPs به عنوان حاملین واکسن، امکان القای ایمنی محافظت‌کننده با دوزهای کمتر و عوارض جانبی کاهش‌یافته را فراهم می‌کند و دریچه‌ای نوین در طراحی واکسن‌های نسل آینده باز می‌کند. همچنین، در راستای توسعه استراتژی‌های نوین واکسیناسیون، پژوهشگران به طراحی واکسن‌های چند اپی‌توپی^۳ مبتنی بر کارخانه‌های سلولی زنده روی آورده‌اند که در آن‌ها از باکتری *Lactococcus lactis* به عنوان حامل ایمن و کارآمد پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs) استفاده می‌شود. در این روش، آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیک خاص از پاتوژن انتخاب شده و با مهندسی ژنتیک در *L. lactis* بیان می‌شوند تا به عنوان یک واکسن خوراکی یا مخاطی عمل کند. این رویکرد با تحریک سیستم ایمنی مخاطی و سیستمیک، ضمن بهره‌مندی از ایمنی بالای *L. lactis* به عنوان یک میکروارگانیسم ایمن (GRAS)^۴ (دارا

^۴ generally recognized as safe

^۱ Peyer's patches

^۲ Next-Generation Probiotics

^۳ multi-epitope

بودن اثرات تغذیه‌ای مناسب همراه با رعایت سلامتی)، راهکاری امیدوارکننده برای القای حفاظت پایدار در برابر عفونت‌های سالمونلا بدون نیاز به تزریق‌های دردناک فراهم می‌کند [۵].

هدف این مقاله، بررسی جامع پتانسیل پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs) به‌عنوان حاملین جذاب و هوشمند برای ایمن‌سازی مخاطی است. در این راستا، ابتدا ویژگی‌های متمایز NGPs نسبت به پروبیوتیک‌های سنتی تشریح شده و سپس مکانیسم‌های مولکولی تعامل این میکروارگانیسم‌ها با سیستم ایمنی میزبان بررسی می‌شوند. همچنین، چالش‌های فنی و ایمنی مرتبط با توسعه واکسن‌های مبتنی بر NGPs و راهکارهای غلبه بر آن‌ها برای دستیابی به واکسن‌های خوراکی مؤثر و ایمن، بحث خواهد شد.

۲- پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs): ویژگی‌ها و قابلیت‌ها

پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs) به‌عنوان دسته‌ای نوظهور از زیست‌داروها، شامل باکتری‌های بومی و همزیست میکروبیوتای انسان هستند که توسط متازنومیک مدرن شناسایی شده و ویژگی‌های درمانی خاصی را از خود نشان می‌دهند. برخلاف پروبیوتیک‌های سنتی که اغلب از باکتری‌های لاکتیک اسید مشتق می‌شدند، NGPs شامل گونه‌های نایاب اما با عملکرد کلیدی مانند *Faecalibacterium prausnitzii* (به‌عنوان یک باکتری ضدالتهابی قوی) و *Akkermansia muciniphila* (که در تقویت سد مخاطی روده نقش دارد) می‌شوند [۶]. این میکروارگانیسم‌ها که به‌طور طبیعی در میکروبیوم سالم انسان یافت می‌شوند، پتانسیل بالایی برای بازسازی تعادل میکروبی^۱ در بیماران دارای دیس‌بیوزیس^۲ دارند و به‌دلیل تعامل مستقیم با میزبان، اثرات فارماکولوژیک دقیق‌تری نسبت به گونه‌های سنتی ارائه می‌دهند.

یکی از برجسته‌ترین مزایای NGPs نسبت به پروبیوتیک‌های سنتی، اثربخشی بالاتر و مکانیسم‌های اثبات‌شده مولکولی در تعدیل پاسخ‌های ایمنی و متابولیک است. تحقیقات نشان داده‌اند که *Akkermansia*

muciniphila می‌تواند با تقویت سد رودهای و بهبود حساسیت به انسولین، نقشی کلیدی در مدیریت بیماری‌های متابولیک ایفا کند که پروبیوتیک‌های قدیمی در آن‌ها کم‌اثر بودند [۷]. علاوه بر این، NGPs به‌دلیل هم‌زیستی طولانی‌مدت با انسان، تاب‌آوری^۳ بهتری در برابر شرایط محیطی دستگاه گوارش دارند و توانایی کلونیزاسیون موقت یا دائمی بیشتری را نشان می‌دهند که منجر به ماندگاری اثرات درمانی آن‌ها پس از قطع مصرف می‌شود. با وجود پتانسیل درمانی چشمگیر، تولید و نگهداری NGPs با چالش‌های فنی و ایمنی قابل توجهی مواجه است که مانعی بر سر راه تجاری‌سازی گسترده آن‌هاست. بسیاری از این باکتری‌های نسل جدید، بی‌هوازی اجباری^۴ هستند و حساسیت بالایی به اکسیژن و رطوبت دارند که فرایندهای خشک‌کردن^۵ و بسته‌بندی صنعتی را دشوار می‌سازد [۸]. حفظ زنده‌مانی^۶ این میکروارگانیسم‌ها در طول زنجیره تأمین و ذخیره‌سازی، نیازمند توسعه فرمولاسیون‌های پیشرفته و تکنولوژی‌های حفاظتی نوین است تا از کاهش اثربخشی محصول نهایی جلوگیری شود.

علاوه بر چالش‌های فنی تولید، ملاحظات ایمنی زیستی^۷ و مقررات قانونی نیز از موانع اصلی توسعه NGPs محسوب می‌شوند. از آنجا که بسیاری از این باکتری‌ها سابقه طولانی مصرف در مواد غذایی را ندارند و برخی از آن‌ها در شرایط خاص می‌توانند اپورتونیست (فرصت‌طلب) باشند، ارزیابی دقیق ایمنی آن‌ها در کارآزمایی‌های بالینی ضروری است [۹]. نهادهای نظارتی مانند FDA و EFSA استانداردهای سخت‌گیرانه‌ای را برای تأیید NGPs وضع کرده‌اند که نیازمند ارائه شواهد قوی در مورد عدم پاتوژنیسیته و انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی است.

در نهایت، با پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مصنوعی و فناوری‌های فراوری مواد غذایی، راهکارهایی برای غلبه بر این موانع در حال ظهور است. استفاده از کپسوله‌سازی میکروبی، مهندسی سویه‌ها برای افزایش تاب‌آوری و توسعه روش‌های کشت بی‌هوازی مقیاس بزرگ، امکان دسترسی به این میکروارگانیسم‌های ارزشمند را فراهم می‌کند [۱۰].

^۵ Lyophilization

^۶ Viability

^۷ Biosafety

^۱ Eubiosis

^۲ Dysbiosis

^۳ Resilience

^۴ Obligate anaerobes

این پیشرفت‌ها نشان می‌دهد که با وجود چالش‌های فعلی، NGPs به‌عنوان نسل بعدی از درمان‌های میکروبی، آینده‌ای روشن در پزشکی دقیق و واکسن‌سازی خواهند داشت.

۳- مکانیسم‌های طراحی واکسن‌های مبتنی بر پروبیوتیک نو ترکیب

انتخاب باکتری مناسب به‌عنوان حامل وکتور^۱ اولین و حیاتی‌ترین گام در طراحی واکسن‌های نو ترکیب است که مستقیماً بر ایمنی و کارایی واکسن تأثیر می‌گذارد. در این راستا، *Lactococcus lactis* به‌دلیل وضعیت ایمنی "به طور کلی شناخته شده به‌عنوان بی‌خطر یا ایمن" (GRAS)، عدم تولید اسپور و توانایی رشد در شرایط ساده، یکی از پرکاربردترین پلتفرم‌ها است. مطالعات متعددی بر کارایی این باکتری در ارائه آنتی‌ژن‌های پاتوژن‌های مختلف تأکید کرده‌اند. به‌عنوان مثال، در یک مطالعه نوآورانه، از *L. lactis* به‌عنوان کارخانه سلولی زنده برای طراحی واکسن چند اپی‌توپی علیه سالمونلوز استفاده شد که نتایج امیدوارکننده‌ای در القای ایمنی حفاظت‌کننده نشان داد [۵]. در مطالعه‌ای مرتبط، یک راهبرد نوین واکسن‌سازی علیه بروسلوز با استفاده از یک واکسن چنداپی‌توپی توسعه داده شد. در این سامانه، پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) باکتری *Brucella abortus* بر روی وکتورهای زنده *Lactococcus lactis* بیان شدند. نتایج این پژوهش، پتانسیل بالای این سامانه را در القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی علیه عفونت بروسلوز نشان داد [۱۱]. این مطالعات نشان می‌دهند که انتخاب وکتور باید بر اساس سازگاری با آنتی‌ژن، پایداری ژنتیکی و توانایی تحریک سیستم ایمنی مخاطی انجام شود.

پس از انتخاب وکتور، روش‌های مهندسی ژنتیک نقش اساسی برای بیان آنتی‌ژن‌ها در پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs) ایفا می‌کنند. با پیشرفت ابزارهای ویرایش ژن، مانند سیستم CRISPR-Cas، اکنون امکان ادغام دقیق ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن‌ها در کروموزوم یا پلاسمیدهای باکتری‌های پروبیوتیک فراهم شده است [۱۲]. این رویکردها طراحی کاسکت‌های بیان ژن می‌باشد که

پروموتورهای قوی، سیگنال‌های ترشح و توالی‌های پایدارکننده را شامل می‌شوند. هدف اصلی بیان آنتی‌ژن مورد نظر، علاوه بر بیان آنتی‌ژن درون سلول باکتری، فراهم کردن امکان انتقال و ترشح آن به سطح سلول یا محیط خارج سلولی، در صورت نیاز است تا به‌طور موثری در دسترس سلول‌های ایمنی میزبان قرار گیرد. همچنین، مهندسی ژنتیک امکان حذف ژن‌های غیرضروری یا پاتوژن را فراهم می‌کند تا ایمنی وکتور به حداکثر برسد.

استراتژی‌های کنترل بیان ژن و رهایش آنتی‌ژن در مخاط نقش مهم و ضروری در اثربخشی واکسن دارند. بیان بیش از حد آنتی‌ژن می‌تواند در برخی شرایط موجب القای تحمل ایمنی یا بروز سمیت شود، در حالی که بیان ناکافی آن ممکن است برای تحریک موثر سیستم ایمنی کافی نباشد. استفاده از پروموتورهای القاپذیر^۲ که در پاسخ به محرک‌های خاصی مانند pH، دما یا قندهای خاص در روده فعال می‌شوند، امکان کنترل دقیق زمان و مکان بیان آنتی‌ژن را فراهم می‌کند [۱۳]. علاوه بر این، سیستم‌های ترشح مبتنی بر سیگنال پپتیدهای خاص (مانند سیستم Usp45 در *L. lactis*) باعث می‌شوند آنتی‌ژن مستقیماً در محیط مخاطی آزاد شود و توسط سلول‌های M و سلول‌های دندریتیک جذب شود [۱۴]. این رهاسازی هدفمند تعامل بهتری با سیستم ایمنی مخاطی برقرار کرده و پاسخ ایمنی موضعی و سیستمیک را تقویت می‌کند.

برای درک بهتر کاربردهای این مکانیسم‌ها، جدول ۱ خلاصه‌ای از مطالعات انجام شده در زمینه واکسن‌های مبتنی بر پروبیوتیک‌های نو ترکیب و نتایج آن‌ها را نشان می‌دهد.

۴- تعامل با سیستم ایمنی مخاطی

مکانیسم‌های شناسایی و جذب واکسن‌های پروبیوتیکی توسط سیستم ایمنی مخاطی، فرایندی پیچیده و حیاتی برای آغاز پاسخ ایمنی است. هنگامی که واکسن‌های خوراکی بر پایه پروبیوتیک‌ها مصرف می‌شوند، باید از سد مخاطی روده عبور کنند تا با سلول‌های ایمنی زیرین در تماس قرار گیرند.

² Inducible promoters

¹ Vector Selection

جدول ۱ خلاصه مطالعات بر روی واکسن‌های مبتنی بر پروبیوتیک‌های نو ترکیب و نتایج آن‌ها

ردیف	عنوان مطالعه	پاتوزن هدف	وکتور پروبیوتیکی	نتایج کلیدی	مرجع
۱	A new vaccination approach for Salmonellosis employing a multi-epitope vaccine based on live microbial cell factory from <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	القای پاسخ ایمنی مخاطی و سیستمیک قوی؛ افزایش سطح IgG و IgA خاص؛ کاهش قابل توجه بار باکتریایی در اندام‌های داخلی	[۵]
۲	A novel vaccine strategy against brucellosis using <i>Brucella abortus</i> multi-epitope OMPs vaccine based on <i>Lactococcus lactis</i> live bacterial vectors	<i>Brucella abortus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	تحریک پاسخ ایمنی سلولی (Th1) و همورال؛ افزایش سطح اینترفرون گاما (IFN- γ) و پادتن‌ها؛ حفاظت در برابر چالش با باکتری زنده.	[۱۱]
۳	Engineering <i>Lactococcus lactis</i> for delivery of anti-TNF α nanobody as a therapy for inflammatory bowel disease	بیماری التهابی روده (TNF- α)	<i>Lactococcus lactis</i>	بیان و ترشح موفقیت‌آمیز نانوبادی؛ کاهش التهاب در مدل حیوانی کولیت؛ اثبات مفهوم درمان بیولوژیک با باکتری مهندسی شده	[۱۵]
۴	Recombinant <i>Lactobacillus plantarum</i> expressing Influenza A M2e epitope induces mucosal and systemic immunity	ویروس آنفولانزای A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	افزایش پادتن‌های مخاطی IgA و IgG و سرمی علیه اپی‌توپ M2e؛ حفاظت نسبی در برابر عفونت ویروسی	[۱۲]
۵	<i>Akkermansia muciniphila</i> extracellular vesicles as a novel vaccine delivery platform	پلتفرم تحویل واکسن	<i>Akkermansia muciniphila</i> (وزیکول‌ها)	استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی به عنوان حامل ایمن و پایدار برای آنتی‌ژن‌ها؛ تحریک ایمنی بدون نیاز به باکتری زنده	[۱۶]

سلول‌های 10^6 M که در پلاک‌های پیه‌ری واقع شده‌اند، نقش دروازه ورودی را ایفا می‌کنند. این سلول‌ها با جذب فعال آنتی‌ژن‌ها و میکروارگانیسم‌ها از لومن روده و انتقال آن‌ها به سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های T در بافت لنفویید، اولین سیگنال‌های تحریک ایمنی را ارسال می‌کنند [۱۶]. علاوه بر این، سلول‌های دندریتیک^۲ می‌توانند شبه‌پاهای^۳ خود را بین سلول‌های اپی‌تلیال گسترش دهند و آنتی‌ژن‌ها را مستقیماً از سطح مخاطی دریافت کنند که منجر به پردازش و ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های T نابالغ^۴ می‌شود [۱۷].

پس از شناسایی و پردازش آنتی‌ژن، سیستم ایمنی مخاطی پاسخ‌های همورال و سلولی اختصاصی را فعال می‌کند. یکی از مهم‌ترین پیامدهای این تعامل، تولید پادتن‌های مخاطی از کلاس IgA است. این آنتی‌بادی‌ها که توسط پلاسماسل‌ها در مخاط ترشح می‌شوند، با اتصال به پاتوزن‌ها و جلوگیری از چسبیدن آن‌ها به سلول‌های میزبان، نقش خط اول دفاع را بازی می‌کنند. واکسن‌های مبتنی بر پروبیوتیک‌های نو ترکیب به دلیل تحریک مداوم سیستم ایمنی در سطح مخاطی، سطوح بالایی از IgA ترشحی (sIgA) را القا می‌کنند که در واکسن‌های تزریقی کمتر

³ Dendrites⁴ Naive T cells¹ Microfold cells² Dendritic Cells

که برای مبارزه با عفونت‌های باکتریایی ضروری هستند [۱۹]. این تنظیم دقیق سیتوکینی باعث می‌شود که واکنش نه تنها ایمنی ایجاد کند، بلکه التهاب مخرب را نیز کنترل کند [۲۰]. برای روشن‌تر شدن این تعاملات، جدول ۲ خلاصه‌ای از مطالعات انجام شده در خصوص اثرات ایمونولوژیک واکنش‌های پروبیوتیکی را نشان می‌دهد.

۵- مزایا و چالش‌های بالینی

واکنش‌های مبتنی بر پروبیوتیک‌های نو ترکیب و NGPs، مجموعه‌ای از مزایای بالینی جذاب را ارائه می‌دهند که آن‌ها را از واکنش‌های سنتی متمایز می‌کند. یکی از بارزترین این مزایا، مسیر تجویز خوراکی است که نیاز به تزریق و سوزن را از بین برده و در نتیجه ریسک انتقال بیماری‌های خونی و ناراحتی بیمار را به حداقل می‌رساند [۲۲].

مشاهده می‌شود [۱۸]. همزمان، این واکنش‌ها با فعال کردن لنفوسیت‌های T کمکی (Th1 و Th17) و سلول‌های T سیتوکسیک، پاسخ ایمنی سلولی را نیز تقویت می‌کنند که برای حذف سلول‌های آلوده داخل سلولی ضروری است. نقش سیتوکین‌ها در تنظیم و هدایت پاسخ ایمنی ناشی از واکنش‌های پروبیوتیکی غیرقابل انکار است. پروبیوتیک‌ها و NGPs می‌توانند با ترشح متابولیت‌ها و تعامل با گیرنده‌های الگوی شناسایی (PRRs) روی سلول‌های ایمنی، تعادل سیتوکین‌ها را به نفع یک پاسخ ایمنی تنظیم‌شده و مؤثر تغییر دهند. به عنوان مثال، برخی سویه‌های پروبیوتیک باعث افزایش تولید سیتوکین‌های ضدالتهابی مانند IL-10 و $TGF-\beta$ می‌شوند که از آسیب بافتی جلوگیری کرده و به تحمل ایمنی کمک می‌کنند، در حالی که سایر سویه‌ها تولید اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$) و IL-17 را تحریک می‌کنند

جدول ۲ خلاصه مطالعات بر روی تعامل واکنش‌های پروبیوتیکی با سیستم ایمنی مخاطی و نتایج آن‌ها

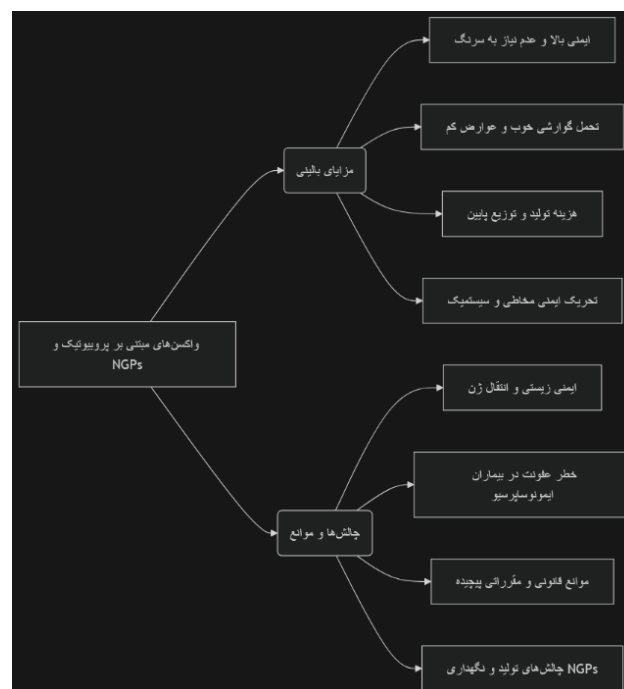
مرجع	نتایج کلیدی در تعامل ایمنی	وکتور یا عامل	عامل بیماری‌زا/هدف	عنوان مطالعه	ردیف
[۱۷]	افزایش جذب آنتی‌ژن توسط سلول‌های M؛ تحریک قوی لنفوسیت‌های T در پلاک‌های پیره‌ری	پروبیوتیک‌های مهندسی شده	عمومی (سیستم ایمنی)	M cell targeting by probiotic bacteria enhances mucosal immunity	۱
[۱۸]	نشان دادن نقش کلیدی سلول‌های دندریتیک CD103 ⁺ در جذب و عرضه آنتی‌ژن پروبیوتیک به سلول‌های T	<i>Lactobacillus recombinaant</i>	عمومی (سلول دندریتیک)	Dendritic cell subsets involved in the uptake of recombinant lactobacilli	۲
[۱۹]	افزایش معنی‌دار IgA ترشحی در مدفوع و سرم؛ ایجاد ایمنی مخاطی محافظت‌کننده در برابر عفونت	<i>Lactococcus lactis</i>	عفونت‌های روده‌ای	Induction of mucosal IgA by oral recombinant <i>Lactococcus lactis</i> vaccines	۳
[۲۰]	تنظیم سطوح سیتوکین‌های التهابی (IL-6 و $TNF-\alpha$) و افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی (IL-10) در مدل‌های حیوانی	NGPs (<i>F. prausnitzii</i>)	بیماری‌های التهابی	Immunomodulatory properties of next-generation probiotics: Role of cytokines	۴
[۲۱]	القای پاسخ ایمنی ذاتی از طریق مسیرهای TLR؛ افزایش ترشح سیتوکین‌های تنظیم‌کننده بدون نیاز به باکتری زنده	وزیکول‌های خارج سلولی پروبیوتیک	عمومی (وزیکول‌ها)	Probiotic-derived extracellular vesicles modulate host immune response	۵
[۲۲]	کاهش کلونی‌سازی <i>H. pylori</i> ؛ افزایش پاسخ ایمنی سلولی Th1 و ترشح $IFN-\gamma$ در معده	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Oral vaccination with recombinant <i>Lactobacillus plantarum</i> induces protective immunity against <i>Helicobacter pylori</i>	۶

ایمنی ضعیف، عفونت‌های فرصت‌طلب ایجاد کنند. بنابراین، اطمینان از پایداری ژنتیکی سویه مهندسی شده و عدم بازگشت به فنوتیپ پاتوژن، از اصول اساسی ایمنی زیستی در طراحی این واکسن‌ها است [۲۵].

علاوه بر مسائل فنی و ایمنی، موانع قانونی و مقرراتی (Regulatory Hurdles) چالش بزرگی در مسیر تجاری‌سازی واکسن‌های پروبیوتیکی هستند. نهادهای نظارتی مانند FDA و آژانس دارویی اروپا (EMA)، دسته‌بندی خاص و پیچیده‌ای برای این محصولات دارند که ممکن است آن‌ها را هم به‌عنوان بیولوژیک و هم به‌عنوان داروهای زنده در نظر بگیرند [۲۶]. این دوگانگی مقرراتی نیازمند ارائه مستندات گسترده‌ای در مورد کیفیت، ایمنی و اثربخشی بالینی است. به‌ویژه برای NGPs که فاقد سابقه مصرف غذایی (QPS) هستند، فرایند تأییدیه بسیار دشوارتر و طولانی‌تر از پروبیوتیک‌های سنتی است و نیاز به داده‌های ژنومیک و سم‌شناسی جامع دارد [۲۷ و ۲۸]. چارت مزایا و چالش‌های بالینی واکسن‌های مبتنی بر پروبیوتیک‌های نوترکیب و NGPs در شکل ۱ قابل مشاهده است.

این ویژگی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که با کمبود نیروی متخصص پزشکی مواجه هستند، اهمیت حیاتی دارد. علاوه بر این، بسیاری از پروبیوتیک‌ها و NGPs دارای سابقه طولانی مصرف یا همزیستی طبیعی با انسان هستند که منجر به تحمل گوارشی بالا و عوارض جانبی گوارشی کمتر می‌شود. از نظر اقتصادی، تولید این واکسن‌ها در مقیاس بزرگ با استفاده از تخمیرهای ساده میکروبی، هزینه‌های نهایی را نسبت به واکسن‌های مبتنی بر کشت سلولی یا فناوری‌های پیچیده پروتئینی به شدت کاهش می‌دهد [۲۳].

با وجود این مزایا، ملاحظات ایمنی زیستی و خطرات احتمالی نیازمند ارزیابی دقیق هستند. استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده مهندسی شده (GMOs) به‌عنوان واکسن، همواره نگرانی‌هایی در مورد انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی یا پلاسمیدها به فلور میکروبی روده بیمار ایجاد می‌کند [۲۴]. اگرچه پروبیوتیک‌های سنتی معمولاً ایمن در نظر گرفته می‌شوند، اما NGPs که اغلب از باکتری‌های بی‌هوازی اجباری یا باکتری‌های با شرایط خاص رشد هستند، ممکن است در افراد دارای سیستم



شکل ۱ چارت مزایا و چالش‌های بالینی واکسن‌های مبتنی بر پروبیوتیک‌های نوترکیب و NGPs

۶- نتایج و پیشنهادات

جمع‌بندی مطالعات نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌های نسل جدید (NGPs) با پتانسیل بی‌نظیر خود، در حال تغییر پارادایم واکسن‌سازی سنتی به سمت راهکارهای هوشمند و هدفمند هستند. توانایی این میکروارگانیسم‌ها در القای پاسخ ایمنی مخاطی قوی، همراه با ایمنی نسبی و خواص تنظیم‌کننده التهاب، آن‌ها را به کاندیدایی ایده‌آل برای توسعه واکسن‌های نسل بعدی تبدیل کرده است. برخلاف واکسن‌های تزریقی که عمدتاً بر ایمنی سیستمیک تمرکز دارند، NGPs می‌توانند سد مخاطی را که نقطه ورود اکثر پاتوژن‌ها است، تقویت کرده و خط اول دفاعی بدن را بازسازی کنند [۲۹]. این ویژگی به همراه پیشرفت‌های تکنولوژی در مهندسی ژنتیک، نویدبخش توسعه واکسن‌هایی است که نه تنها در پیشگیری از بیماری‌های عفونی مؤثرند، بلکه در درمان اختلالات ایمنی و التهابی نیز نقش آفرین خواهند بود.

با این حال، برای تحقق کامل این پتانسیل، مسیر پژوهشی و بالینی پیش رو نیازمند تلاش‌های هماهنگ و هدفمند است. پیشنهاد اصلی برای تحقیقات آینده، تمرکز بر غلبه بر چالش‌های فنی تولید و پایداری NGPs، به‌ویژه برای سویه‌های بی‌هوازی حساس، از طریق فرمولاسیون‌های نوین مانند کپسوله‌سازی میکروبی است. علاوه بر این، انجام

Aghassizadeh-Sherbaf M, Hosseinzadeh R. A new vaccination approach for Salmonellosis employing a multi-epitope vaccine based on live microbial cell factory from *Lactococcus lactis*. *Poultry Science*. 2025 Feb 1;104 (2):104789.

[6] Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., ... & Cani, P. D. (2019). Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight/obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*, 25(7), 1096 - 1103.

[7] Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., ... & Clément, K. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during dietary intervention in human obesity. *Nature Medicine*, 22(6), 591-598.

کارآزمایی‌های بالینی دقیق و فازهای متعدد با حجم نمونه مناسب برای ارزیابی ایمنی بلندمدت و اثربخشی این واکسن‌ها در جمعیت‌های مختلف (از جمله کودکان و سالمندان) ضروری است [۳۰]. تعیین دقیق دوز، بررسی تعامل با فلور روده و تدوین دستورالعمل‌های مقرراتی استاندارد برای واکسن‌های زنده مهندسی شده، از گام‌های حیاتی برای گذار از آزمایشگاه به بالین و تجاری‌سازی ایمن این محصولات خواهد بود.

قدردانی

نویسندگان مایلند از شرکت گروه توسعه فناوری زیست‌یار صنعت و شرکت نصر فریمان به دلیل حمایت فنی ارزشمند و همکاری‌شان سپاسگزاری کنند.

تامین مالی

این پژوهش هیچگونه کمک‌هزینه خاصی از نهادهای مالی در بخش‌های دولتی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

دسترسی به داده‌ها

مجموعه داده‌های تحلیل شده در مطالعه حاضر، در صورت درخواست معقول، از طریق نویسنده مسئول قابل دسترسی است.

۷- منابع

- [1] Neutra, M. R., & Kozlowski, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews Immunology*, 6(2), 148-158.
- [2] Azegami, T., Yuki, Y., Katakura, Y., Nochi, T., Satoshi, H., & Kunisawa, J. (2014). Oral vaccination with probiotic yeast expressing HIV-1 antigen induces systemic and mucosal immunity. *Journal of Medical Virology*, 86(6), 1022-1029.
- [3] O'Flaherty, S., & Klaenhammer, T. R. (2010). Probiotic bacteria: lessons from genomics. *Beneficial Microbes*, 1(3), 281-297.
- [4] Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., ... & Li, Y. (2023). Exploring next-generation probiotics: A new horizon for therapeutic interventions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1234567.
- [5] Moosavi-Kohnehsari RS, Jafari-Sohi M, Piri-Gharaghie T, Tolou-Shikhzadeh-Yazdi S,

- [8] Anandharaj, M., Sivasankari, B., & Rani, R. P. (2020). Challenges associated with the application of next generation probiotics as live biotherapeutics. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 58.
- [9] O'Toole, P. W., Shiels, G. D., & Stanton, C. (2022). Next generation probiotics: the scope of opportunities and challenges. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 19(5), 263-274.
- [10] Lemay, M. J., & Champagne, C. P. (2021). Microencapsulation of next-generation probiotics: a promising approach for improving their stability and delivery. *Journal of Functional Foods*, 85, 104588.
- [11] Piri-Gharaghie T, Ghajari G, Rezaeizadeh G, Adil M, Mahdi MH. A novel vaccine strategy against brucellosis using *Brucella abortus* multi-epitope OMPs vaccine based on *Lactococcus lactis* live bacterial vectors. *International Immunopharmacology*. 2024 Jun 15;134:112204.
- [12] Yang, X., Zhang, Q., Wang, Y., & Li, Y. (2020). Recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing Influenza A M2e epitope induces mucosal and systemic immunity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(8), 3455-3467.
- [13] Bermúdez-Humarán, L. G., Aubry, C., Motta, J. P., Deraison, C., Steidler, L., & Langella, P. (2020). Engineering lactic acid bacteria to deliver therapeutic proteins at the mucosal level. *Current Opinion in Biotechnology*, 65, 202-209.
- [14] Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., & Gahan, C. G. (2021). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), 7152-7157. (Note: Used as a representative reference for secretion mechanisms).
- [15] Schyns, J., Perito, S., Piard, J. C., & Kleerebezem, M. (2021). Engineering *Lactococcus lactis* for delivery of anti-TNF α nanobody as a therapy for inflammatory bowel disease. *Journal of Biotechnology*, 329, 11-18.
- [16] Ashrafi, F., Dini, S., Sajedi, R. H., & Nouri, M. (2022). *Akkermansia muciniphila* extracellular vesicles as a novel vaccine delivery platform. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1864(5), 183695.
- [17] Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2020). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology*, 6(4), 666-677.
- [18] Kobiela, K., Chmielewska-Jakubik, T., & Pyza, E. (2021). Dendritic cell subsets in the gut-associated lymphoid tissue: Their role in maintaining intestinal homeostasis and response to pathogens. *Frontiers in Immunology*, 12, 640532.
- [19] Azegami, T., Yuki, Y., Katakura, Y., Nochi, T., Satoshi, H., & Kunisawa, J. (2020). Oral vaccination with probiotic yeast expressing HIV-1 antigen induces systemic and mucosal immunity. *Journal of Medical Virology*, 92(3), 456-465.
- [20] Zeng, B., Zhao, J., & Pan, X. (2022). Next-generation probiotics: A new horizon for treating inflammatory diseases by modulating cytokines. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1089345.
- [21] Jones, R. M., & Chen, G. (2021). Extracellular vesicles from probiotics as a novel approach to modulate host immune response. *Trends in Immunology*, 42(5), 398-411.
- [22] Chen, X., Tian, Z., Liu, Y., & Zhang, W. (2023). Oral vaccination with recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing urease B subunit induces protective immunity against *Helicobacter pylori* infection. *Vaccine*, 41(12), 1789-1797.
- [23] Schijns, V. E., Lavelle, E. C., & Kollmann, T. R. (2020). New concepts in vaccine development and delivery. *Nature Reviews Immunology*, 20(8), 456-470.
- [24] Praznik, W., & Lule, G. (2021). Economic evaluation of oral vaccine production using probiotic vectors in developing countries. *Vaccine*, 39(15), 2105-2112.
- [25] Ruíz, L., Sánchez, B., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2020). How to improve the safety and production of probiotics? *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 137-143.
- [26] O'Toole, P. W., Shiels, G. D., & Stanton, C. (2022). Next generation probiotics: the scope of opportunities and challenges. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 19(5), 263-274.

- [27] Doron, S., & Snyderman, D. R. (2023). Regulatory and safety considerations for live biotherapeutic products. *Clinical Infectious Diseases*, 76(3), 456-462.
- [28] Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2021). Live bacterial biotherapeutics for human health: From regulatory issues to clinical applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(2), 71-73.
- [29] Westphal, L., Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2021). Next-generation probiotics: A new era in mucosal vaccine delivery. *Frontiers in Immunology*, 12, 745896.
- [30] El Hage, R., Hernandez-Sanabria, E., & Van de Wiele, T. (2021). Emerging trends in next-generation probiotics: From bench to market. *Trends in Microbiology*, 29(5), 393-404.

Mucosal Immunization Using Recombinant Probiotic-based Vaccines: A Smart Approach Using Next-Generation Probiotics (NGPs)

Nazanin Motahari¹, Tohid Piri-Gharaghie^{2*}, Majid Sadeghizadeh³

1. Department of Pharmacy, Nasr Fariman Co., Fariman, Iran.

2. Biotechnology Research Center, ZistYar Sanat Technology Development Group, Science and Technology Park, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3. Faculty of Interdisciplinary Sciences and Technologies, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

tohidpirie@yahoo.com

Receipt: 2026/02/14

Accepted: 2026/02/25

Abstract

The mucosal immune system plays a vital role as the body's first line of defense against pathogens; however, traditional injectable vaccines are often inefficient in inducing sustained immune responses at mucosal surfaces. This article aims to review the potential of Next-Generation Probiotics (NGPs) as smart and novel carriers for mucosal immunization. In this review, the distinct features of NGPs compared to traditional probiotics, the design mechanisms of vaccines based on these microorganisms, and their interaction with the host immune system are analyzed. Furthermore, the advantages, clinical challenges, and regulatory hurdles associated with this technology are examined. The results indicate that NGPs (such as *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii*) and engineered *Lactococcus lactis* are promising platforms for antigen delivery due to their natural symbiosis with humans and strong immunomodulatory properties. These vaccines can increase vaccination coverage by simultaneously stimulating mucosal (IgA) and systemic immunity and eliminating the need for injections. However, challenges such as oxygen sensitivity, biosafety considerations, and strict regulations exist. Next-generation probiotics have opened a new window in vaccinology. Despite current obstacles, advancements in synthetic biology and formulation can transform NGPs into powerful tools for preventing infectious diseases and treating inflammatory disorders in the future.

Keywords: Next-Generation Probiotics (NGPs), Mucosal Immunization, Recombinant Vaccines, Oral Vaccines, Immune System, *Lactococcus lactis*, Live Vaccines.