القای ایمنی هترولوگ علیه سویه‌های رایج آنفلوانزا با استفاده از واکسن ژنی بر پایه قطعه HA2

سینا سلیمانی[1*]
شهلا شاهسوندی[1]
امید مددگار[2]

۱- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی.
تلفن: ۳۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶
E-mail: s.soleimani@rvsri.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۷ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۸/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: واکسن‌های اسید نوکلئیک به‌عنوان نسل سوم واکسن‌ها برای کنترل آنفلوانزا به دلیل افزایش سویه‌های نوپدید و بازپدید ویروس و انتقال مستقیم ویروس‌های پرندگان به انسان مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. مزیت مهم این واکسن‌ها، القای هر دو نوع سیستم ایمنی سلولی و هومورال و کنترل سویه‌های در گردش می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف استفاده از قطعه محافظت شده HA2 هماگلوتینین آنفلوانزا جهت طراحی یک واکسن ژنی جامع و ارزیابی ایمنی متقاطع آن علیه ویروس‌های رایج انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توسعه‌ای- کاربردی از آذر ۱۳۹۳ تا تیر ۱۳۹۴ در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شد. توالی HA2 در وکتور pcDNA3.1 بیان شده و به گروه‌های موش Bulb/c تیمار و کنترل با استراتژی Prime/Boost تزریق شد. ایمنی هومورال محافظت کننده متقاطع با بررسی عیار آنتی‌بادی در فواصل زمانی معین با روش Virus neutralization (VN) با دو سروتیپ مختلف ویروس آنفلوانزا (H1N1 و H9N2)، ایمنی سلولی با آزمایش Proliferation assay و بی‌ضرری واکسن با بازرسی‌های روزانه واکنش‌های موضعی و عمومی و همچنین آزمایش هیستوپاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: عیار آنتی‌بادی و ایمنی سلولی در گروه‌های تیمار برای هر دو سروتیپ به‌طور معناداری از گروه کنترل بالاتر بوده و در گروه تیمار با دو بار تزریق یادآور دارای بالاترین عیار بود ($P<0/01$). در موش‌های تحت آزمایش هیچگونه واکنش موضعی، اثرات پاتولوژیک بافتی، واکنش‌های عمومی و یا مرگ و میر مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: واکسن ژنی بر پایه قطعه HA2 سبب افزایش عیار آنتی‌بادی علیه آنفلوانزا و همچنین تحریک ایمنی سلولی بدون ایجاد عوارض جانبی می‌شود.

کلمات کلیدی: آنفلوانزا، DNA واکسن، HA2، ایمنی متقاطع.

مقدمه

بیماری آنفلوانزا به‌عنوان یک بیماری عفونی با قدمت چند هزار ساله به‌دلیل ایجاد بیماری در انسان، پرندگان و بسیاری از حیوانات، دارای اهمیت بهداشتی و اقتصادی چشمگیری می‌باشد. آلودگی با ویروس آنفلوانزا سبب بروز هر دو دسته پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال می‌شود. پاسخ‌های ایمنی هومورال با آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده توسط پلاسماسل‌های ترشح‌کننده آنتی‌بادی، ایجاد می‌شود. این فرایند توسط CD4+T کمکی حمایت می‌شود. پاسخ‌های ایمنی سلولی پس از شناسایی آنتی‌ژن‌های ویروسی عرضه شده با مولکول‌های Major histocompatibility complex (MHC) کلاس‌های I و II توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen-presenting cells, APC) که به فعال‌سازی، ازدیاد و تمایز سلول‌های اختصاصی آنتی‌ژن CD8+T یا CD4+ منجر می‌شود، آغاز خواهد

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

شد.[۱و۲] تمام تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا A در پرندگان آبزی و مهاجر وجود داشته و به انسان نیز منتقل می‌شوند. مطالعات نشان داده‌اند چنانچه در میزبان حیوانی تغییری در اسیدهای آمینه مسوول شناسایی و تنظیم اختصاصی بودن اتصال ویروس به گیرنده از α2,6 به α2,3 در پروتیین هماگلوتینین (HA) ایجاد شود یا با حضوراسید گلوتامیک درجایگاه ۹۲ پروتیین NS1 سبب فرار ویروس از پاسخ‌های ضد ویروسی سیتوکینی میزبان شود و یا در جایگاه‌های ٦٢٧ و ۷۰۱ پروتیین PB2 جهش رخ دهد، آنگاه ویروس ویژگی جدیدی برای اتصال به گیرنده کسب می‌کند که موجب تنوع در ویروس، تطبیق با میزبان جدید و انتشار آلودگی در آن می‌شود.[۳] بنابراین انتشار سریع سویه‌های نوپدید و بازپدید ویروس آنفلوانزا و ثبت مدارکی مبنی بر انتقال برخی از سویه‌ها از گونه‌های پرندگان به انسان و سایر پستانداران سبب شد تا توجه جهانی به سمت ارتقا و بهینه‌سازی روش‌های کنترل و پیشگیری از آنفلوآنزا معطوف شود. با توجه به اینکه پدیدار شدن واریته‌های آنتی‌ژنی جدید از این ویروس‌ها، به‌کارگیری واکسن‌های غیرفعال تجاری را با محدودیت‌هایی مواجه کرده است،[٤] یکی از راه‌کارهای ارایه شده برای کنترل سویه‌های در گردش موجود، استفاده از واکسن‌های اسید نوکلئیک به عنوان نسل سوم واکسن‌ها است که ایمنی محافظت کننده متقاطع ایجاد کنند.

اساس کار این واکسن‌ها فرایند طبیعی ترجمه ژن به پروتیین در سلول‌های موجودات زنده برای تولید پروتیین ایمونوژن در بدن و القای هر دو سیستم ایمنی سلولی و هومورال است.[٥]

نتایج مطالعات برای کنترل بیماری آنفلوانزا نشان می‌دهند استفاده از اپی‌توپ‌های حفاظت شده HA، آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه ویروس ایجاد کرده و ایمنی مناسبی علیه بیماری القا می‌کند.[٦] با توجه به رخداد جهش‌های نقطه‌ای گسترده در زیر واحد HA1 و همچنین عدم وجود این تغییرات آنتی‌ژنیکی در زیر واحد HA2،[۷] استفاده از زیر واحد HA2 که دارای جایگاه‌های آنتی‌ژنی متعدد حفظ شده می‌باشد برای طراحی یک واکسن ژنی با ایمنی متقاطع برای سویه‌های مهم در گردش آنفلوانزا مورد توجه می‌باشد. از این‌روی هدف از انجام این مطالعه استفاده از قطعه HA2 ویروس آنفلوانزا برای ساخت یک واکسن ژنی مناسب و ارزیابی ایمنی‌زایی و بی‌ضرری آن با تزریق با استراتژی‌های مختلف به موش‌های Bulb/c برای کنترل سویه‌های در گردش آنفلونزا بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توسعه‌ای- کاربردی بود که از آذر ۱۳۹۳ تا تیر ۱۳۹٤ در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام شد. جامعه مورد مطالعه موش‌های آزمایشگاهی نژاد Bulb/c تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بود. متغیرهای مورد مطالعه میزان عیار آنتی‌بادی آنفلوانزا به روش Virus neutralisation (VN) و ضریب تزاید لنفوسیت‌ها بود.

توالی‌های اسید آمینه‌ای HA2 ویروس آنفلوانزا H9N2 از زمان شناسایی آن در سال ۱۹۹۷ تا ۲۰۱٤ از پایگاه داده GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) استخراج شده و هم‌ردیفی آن‌ها با ClustalW software (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) انجام شد. با استفاده از BioEdit بخش محافظت شده HA2 تعیین شد.

با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner v 3.01 (Hastings Software, Hudson, NY; http://www.generunner.com) پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن HA2 ویروس آنفلوانزا H9N2 به طول ۵۷۱bp طراحی شد (HA2F: 5′-GGATCCCATGGCTGCAGATAGGGATA-3′، HA2R: 5′-CCATGGTTATATACAAATGTTGCACCT-3′). با بررسی جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدودگر در توالی ژن و جایگاه‌های موجود در MCS وکتور بیانی pcDNA3.1 (Invitrogen, USA, Catalog no: V790-20)، جایگاه برش آنزیم NcoI در ابتدای آغازگرهای رفت و آنزیم BamHI در انتهای هر دو آغازگر برگشت قرار داده شد. برای استخراج RNA از کیت Ribospin™ (GeneAll, Korean) استفاده شد.

ژن مورد مطالعه با استفاده از کیت Next generation of premix (Intron, Korea) طی واکنش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) یک مرحله‌ای با ۱ µl پرایمر Forward، ۲ µl پرایمر Reverse، RNA 1 µl استخراج شده و ١٦ µl آب مقطر فاقد DNase تکثیر شدند. محصول PCR همراه با مارکر وزن مولکولی DNA روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

در این پژوهش برای تهیه سلول‌های پذیرا از باکتری E.coli سویه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

DH5α (Top10) استفاده شد. محصولات PCR ژن HA2 به مقدار ۱۰۰ µl تهیه شده و DNA با استفاده از کیت PCR product extraction (GeneAll, Korean) خالص شد. برای محاسبه غلظت DNA به دست آمده از دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و نیز خواندن جذب با اسپکتروفتومتر استفاده شد. ژن‌ها در وکتور pcDNA3.1 به روش شوک حرارتی کلون شدند. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت EndoFree®Plasmid Mega Kit (Qiagen, Germany) انجام شد. سپس با استفاده از آنزیم‌های محدودگر NcoI و BamHI و بررسی قطعه تولید شده در نتیجه واکنش هضم، درستی ژن کلون شده ارزیابی شد. برای تایید کامل کلون، سه کلون تک از کلون‌های تهیه شده تعیین توالی شدند.

تعداد ۴۰ سر موش ماده Balb/c (Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran) با سن شش هفته و میانگین وزنی ۲۰ g در چهار گروه (هر گروه شامل ۱۰ سر موش) شامل یک گروه کنترل و سه گروه تیمار قرار گرفتند. برای سازگاری با محیط، موش‌ها پس از تحویل به مدت ۷۲ ساعت در محیط جدید قرار گرفتند. سپس برای اطمینان از عدم وجود آنتی‌بادی علیه ویروس آنفلوانزا در روز ۳ (سه روز پیش از شروع نخستین تزریق) به‌طور تصادفی از موش‌ها خون‌گیری شده و عیار آنتی‌بادی در نمونه‌های سرم با آزمایش‌های ممانعت ازآگلوتیناسیون (HI) مورد ارزیابی قرار گرفت. در روز صفر (نخستین تزریق)، تزریق واکسن با راهبرد DNA/Prime-DNA/Boost در محل عضله چهار سر ران به میزان ۰/۱ ml انجام شد. یادآور اول ۱۴ روز پس از تزریق‌های اولیه و یادآور دوم ۱۴ روز پس از یادآور اول تزریق شد (جدول ۱). موارد اخلاقی نگهداری موش‌ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به هنگام خون‌گیری و واکسیناسیون به طور کامل رعایت شد.

برای بررسی میزان القای ایمنی هومورال متقاطع حاصل از تزریق DNA واکسن HA2، عیار آنتی‌بادی در سرم موش‌های تیمار و کنترل با آزمایش Virus neutralization (VN) به شرح ذیل در روزهای ۷، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶ و ۷۰ روز پس از تزریق اول ارزیابی شد. پیش از هر نوبت خون‌گیری موش‌ها توزین می‌شدند.

برای سازگاری سویه‌های مورد استفاده در چالنج، پس از آماده سازی فلاسک‌های کشت سلول Vero و MDCK ۵۰۰ میکرولیتر از سویه‌های H9N2 و H1N1 در معرض ۵ µl تریپسین ۰/۱۰٪ (به نسبت ۱۰ µl/ml) به مدت ۳۰ دقیقه برای تیمار ویروس قرار گرفت. سپس ترکیب‌های فوق به صورت جداگانه به همراه محیط DMEM به فلاسک‌های کشت سلول حاوی ۲/۵ µl/ml تریپسین بارور شدند. پس از پیدایش آثار آسیب سلولی Cytopathic effect (CPE) در فلاسک‌های کشت سلول، برای تایید سازگاری ویروس در کشت سلول، سه پاساژ متوالی از ویروس در سلول‌های مورد نظر همراه با بررسی CPE انجام شد.

بر اساس عیار محاسبه شده از ویروس و استفاده از ویروس با تیتر 100 CCID50 per 0.025 ml آزمایش VN پس از غیرفعال‌سازی حرارتی سرم‌های مورد مطالعه و تهیه سلول MDCK با رقت ۱×۱۰۵ سلول در هر میلی‌لیتر انجام شد. کنترل سرم، کنترل‌های ویروس به صورت ویروس ۱، ۱۰ و ۱۰۰ (100 CCID50 per 0.025 ml) و کنترل سلول در نظر گرفته شد. عیار خنثی‌کنندگی سرم بر اساس بالاترین رقتی از سرم که از اثرات ویروس آنفلوانزا در مونولایر سلولی جلوگیری نماید و با استفاده از فرمول محاسبه Reed & Munch به صورت PD50 محاسبه شد.[۸-۱۰]

۶۰ روز پس از تزریق DNA واکسن HA2، برای ارزیابی ایمنی سلولی القا شده در موش‌ها از آزمون MTT استفاده شد. سوسپانسیونی تک سلولی در محیط RPMI 1640 از لنفوسیت‌های طحال موش‌های مورد مطالعه به تعداد ۱۰۶ cells/ml تهیه شد. برای هر گروه ۱۰۰ µl میتوژن فیتوهماگلوتینین A (PHA) به عنوان کنترل مثبت با غلظت ۵ µg/ml در غلظت نهایی به شش گوده میکروپلیت اضافه شد. در دوازده گوده مربوط به هر گروه، ۱۰۰ µl DNA واکسن HA2 ریخته شد. برای هر گروه از لنفوسیت‌ها، شش گوده به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

پس از اضافه کردن MTT و انکوباسیون، مایع رویی گوده تخلیه و کریستال‌های فورمازان تشکیل شده با اضافه کردن ۱۵۰ µl دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به هر گوده حل شدند. سپس میزان جذب هر گوده در طول موج ۶۳۰ nm تعیین شده و میانگین به همراه انحراف‌معیار برای سه بار آزمایش محاسبه شد. ضریب تحریک (SI) به صورت نسبت میانگین OD گوده‌های حاوی سلول‌های تحریک شده با واکسن ژنی به متوسط OD گوده‌های حاوی سلول با محیط (کنترل منفی) محاسبه شد.[۱۱]

برای بررسی آثار آسیب بافتی احتمالی ناشی از تزریق واکسن

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

DNA، ضمن بازرسی روزانه موش‌ها از نظر وجود واکنش‌های موضعی در محل تزریق، واکنش‌های عمومی و کاهش وزن احتمالی، نمونه‌های طحال و ریه از موش‌های گروه‌های مختلف تیمار و کنترل در روز سوم پس از تزریق و در پایان آزمایش گرفته شده و مقاطع بافتی با هماتوکسیلین و ائوزین برای آزمایش هیستوپاتولوژی رنگ‌آمیزی شدند.

نتایج بر اساس میانگین و انحراف از معیار با استفاده از SPSS statistical software, version 22 (IBM, Armonk, NY, USA) و آزمون آماری One way ANOVA مورد بررسی و پردازش آماری قرار گرفته و با در نظر گرفتن ضریب اطمینان ۹۵٪، P<۰/۰۵ معنادار در نظرگرفته شد.

یافته‌ها

محصول Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) حاصل از تکثیر ژن HA2 با جفت پرایمرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و باندی به طول ۵۷۱bp حاصل شد (شکل ۱).

با کلون‌سازی ژن‌های HA2 در وکتور pcDNA3.1، روی پلیت‌های مربوط به ژن تعداد زیادی کلنی‌های سفید رنگ رشد کرده بود که می‌توانند حاوی پلاسمیدهای نوترکیب یعنی دارای قطعه HA2 ویروس آنفلوانزا باشند (شکل ۱).

با توجه به اینکه برای ارزیابی حفاظت متقاطع آزمایش VN با ویروس‌های H1N1 و H9N2 به صورت جداگانه انجام شد، نتایج این آزمایش برای سروتیپ H9N2 در نمودار ۱ و نتایج حاصل از سروتیپ H1N1 در نمودار ۲ آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود عیار به دست آمده در گروه‌های تیمار برای هر دو سروتیپ به‌طور معناداری از گروه کنترل بالاتر بود و در گروه‌های تیمار برای هر دو سروتیپ گروه C با دو بار تزریق یادآور دارای بالاترین عیار در این آزمایش بود. همچنین سازگاری هر دو ویروس به کشت سلول MDCK به خوبی طی سه پاساژ متوالی انجام گرفت و ویروس‌ها بر روی این کشت سلول اثرات آسیب سلولی مشخصی به صورت گرد شدن سلول‌ها و کنده شدن سلول‌ها از مونولایر سلولی داشتند.

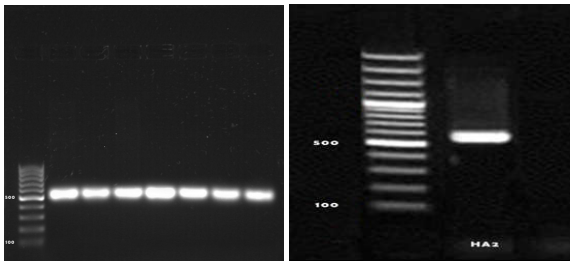
نتایج به‌دست آمده از آزمایش MTT برای ارزیابی ایمنی سلولی به صورت میانگین ضریب تحریک (SI) ناشی از تاثیر میتوژن (فیتوهماگلوتینین) و آنتی‌ژن (HA2) بر لنفوسیت‌های خون محیطی جدا شده از موش‌های مورد مطالعه در گروه‌های مختلف با انحراف معیار مربوط در نمودار ۳ آمده است. نتایج نشان داد که ایمنی سلولی نیز در گروه‌های تیمار به‌طور معناداری از گروه کنترل بالاتر بود.

در بازرسی روزانه موش‌های تحت آزمایش هیچگونه واکنش موضعی مانند تورم، قرمزی، التهاب و جراحت در محل تزریق و یا واکنش‌های عمومی و یا مرگ و میر مشاهده نشد. میانگین وزن موش‌ها در تمامی گروه‌های کنترل و تیمار تفاوتی نداشت و در بازه زمانی آزمایش از میانگین ۲۰ g به میانگین ۳۲/۸ g رسید. در آزمایش بافت‌شناختی نیز در نمونه‌های ریه و طحال موش‌ها، هیچگونه واکنش التهابی ناخواسته، پرخونی و یا تغییر شکل سلولی در اثر تزریقات مشاهده نشد.

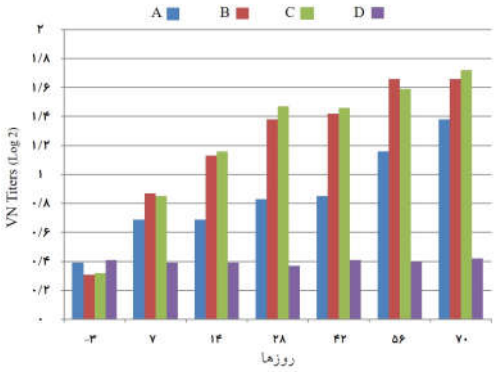
جدول ۱:گروه‌بندی موش‌ها و راهبرد تزریق DNA واکسن HA2

ردیف	گروه	عنوان	استراتژی تزریق		
			تزریق اولیه	تزریق یادآور اول	تزریق یادآور دوم
۱	گروه A	تیمار	+	–	–
۲	گروه B	تیمار	+	+	–
۳	گروه C	تیمار	+	+	+
٤	گروه D	کنترل	سرم فیزیولوژی	–	–

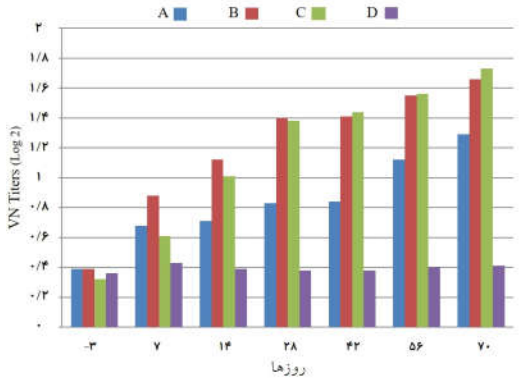
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]



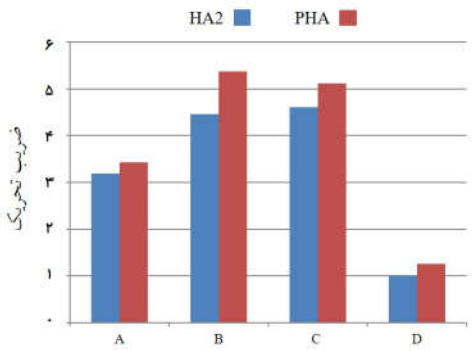
شکل ۱: تکثیر ژن HA2 ویروس آنفلوانزا H9N2 به‌طول ۵۷۱bp به‌همراه مارکر وزن مولکولی (DNA100bp) (چپ) و تایید قطعات کلون شده HA2 با PCR در چند کلون مورد مطالعه به‌همراه مارکر وزن مولکولی (DNA100bp) (راست).



نمودار ۱: مقایسه تیتر آنتی‌بادی علیه آنفلوانزا در گروه‌های تحت آزمایش با روش VN با استفاده از ویروس H9N2. بر اساس آزمون آماری ANOVA، P<۰/۰۵ معنادار در نظرگرفته شده (* P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱، *** P<۰/۰۰۱) و نتایج به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار گزارش شد.



نمودار ۲: مقایسه تیتر آنتی‌بادی علیه آنفلوانزا در گروه‌های مختلف با آزمایش VN با استفاده از ویروس H1N1. بر اساس آزمون آماری ANOVA، P<۰/۰۵ معنادار در نظرگرفته شده (* P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱، *** P<۰/۰۰۱) و نتایج به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار گزارش شد.



نمودار ۳: مقایسه ضریب تحریک گروه‌های مختلف با آزمایش تزاید لنفوسیت‌ها تحت تاثیر آنتی‌ژن و یا میتوژن

بحث

تکنولوژی ساخت DNA واکسن با استفاده از پلاسمید برهنه حاوی ژن‌های ویروس آنفلوانزا و به ویژه قابلیت وجود چندین ژن بسیار محافظت شده بین تحت تیپ‌های آن شامل NP، M1 و M2، برای ایجاد حفاظت علیه این ویروس‌ها در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفت.[۱۲] مطالعات نشان می‌دهند که آنتی‌بادی علیه پروتیین‌های NP و M1 خنثی‌کننده نیستند و در نتیجه حفاظت ایجاد نمی‌کنند. پروتیین سطحی M2 نیز حفاظت محدودی در موش ایجاد می‌کند.[۱۳] Park و همکاران حفاظت کاملی علیه آنفلوانزای پرندگان سویه H5N2 با استفاده از DNA واکسن بیان کننده پروتئین فیوژن HA و M2e به‌دست آوردند.[۱۴] در مطالعه Swayne و همکاران نشان داده شد که ایمنی هومورال و سلولار ایجاد شده توسط DNA واکسن‌ها با واکسن‌های زنده برابری می‌کند.[۱۵] بروز جهش‌های نقطه‌ای مکرر در زیر واحد HA1 گلیکوپروتیین سطحی HA ویروس آنفلوانزا و احتمال پدیدار شدن واریته‌های آنتی‌ژنی جدید که میزبان علیه آن‌ها ایمنی ندارد، سبب رویکرد به سمت طراحی واکسن‌های

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

ژنی با استفاده از زیر واحد HA2 با هدف جایگزینی آن با واکسن‌های رایج شده است.[۱۶و۱۷] در این پژوهش برای ساخت DNA واکسن علیه آنفلوانزا از وکتور pcDNA3 استفاده شد که دارای یک پروموتور یوکاریوتی و توالی‌های CPG غیر متیله برای بیان درست ژن مورد نظر درون سلول هدف میزبان است. با توجه به اینکه روش تلقیح واکسن DNA یک فاکتور حیاتی در تعیین نتیجه وکسیناسیون می باشد و تزریق داخل عضلانی ترجیحا سبب القای ایمنی از نوع Th1 می‌شود،[۱۸] از این روش برای بارورسازی DNA واکسن طراحی شده و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی استفاده شده است. تزریق یک نوبت این واکسن سبب القا ایمنی هومورال اختصاصی و افزایش عیار آنتی‌بادی و همچنین ایمنی سلولی علیه ویروس آنفلوانزا در گروه‌های موش تحت آزمایش شد. شدت و سرعت پاسخ ایمنی اختصاصی با تعداد دفعات مواجه شدن با آنتی‌ژن و فعال شدن سلول‌های خاطره مرتبط است. برای تولید و ذخیره‌سازی تعداد مناسب سلول‌های خاطره، باید آنتی‌ژن مورد نظر در فواصل زمانی مختلف به بدن وارد شود تا سامانه ایمنی به میزان کافی نسبت به آن حساس شود. بنابراین در این مطالعه نیز نوبت های یادآور ایمن سازی با واکسن طراحی شده با استراتژی Prime/Boost انجام شد.

نتایج نشان می‌دهند که در گروه‌هایی که تزریق DNA واکسن طراحی شده انجام شد، عیار آنتی بادی محافظت کننده و القای ایمنی هومورال که در آزمایش VN مورد ارزیابی قرار گرفت (با توجه به اینکه در آنفلوانزا تیتر آنتی‌بادی محافظت کننده (نوترالیزان) می‌تواند از عملکرد مستقیم HA ممانعت به‌عمل آورد،[۱۰و۱۹] از آزمایش VN جهت سنجش عیار آنتی‌بادی محافظت کننده استفاده شد)، به مراتب از گروه کنترل منفی بالاتر بود (P<۰/۰۱).

به دلیل اهمیت القای ایمنی سلولی در آنفلوانزا که یکی از اهداف مهم این مطالعه بود، به موازات سنجش عیار آنتی‌بادی، برای سنجش ایمنی سلولی از آزمایش MTT استفاده شد چرا که در این آزمایش در صورتی که حیوان آزمایشگاهی با یک آنتی‌ژن و یا آلرژن حساس شده باشد، می‌توان از آن آنتی‌ژن و یا آلرژن به عنوان محرک برای سنجش تکثیر لنفوسیت‌ها استفاده نمود. نتایج حاصل از این آزمایش نیز نشان می‌دهند که DNA واکسن تلقیح شده علاوه بر افزایش تیتر آنتی‌بادی، سبب افزایش ایمنی سلولی در موش‌های تزریق شده شد، به‌طوری‌که میزان ضریب تحریک (SI) به دست آمده در این آزمایش در گروه‌های تیمار به‌طور معناداری از گروه کنترل بالاتر بود (P<۰/۰۱). پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها به میتوژن‌هایی مانند فیتوهماگلوتینین که در این مطالعه در آزمایش سنجش ایمنی سلولی استفاده شده است، قوی‌تر از پاسخ به آنتی‌ژن و یا آلرژن است زیرا پاسخ لنفوسیت‌ها به میتوژن اختصاصی نیست. به بیان دیگر میتوژن‌ها جمعیت وسیعی از لنفوسیت‌ها را تحریک می‌کنند. در مقابل تحریک آنتی‌ژنی بسیار اختصاصی بوده و فقط لنفوسیت‌هایی تحریک می‌شوند که آن آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند.[۲۰] بنابراین مطابق انتظار با وجود این‌که تحریک ناشی از میتوژن بیش‌تر از تحریک ناشی از واکسن پیشنهادی می‌باشد، ضریب تکثیر مناسب ایجاد شده نشان می‌دهد که واکسن طراحی شده قادر به تحریک لنفوسیت‌های T می‌باشد. این امر موید توانایی ایمن‌سازی ژنتیکی در القای ایمنی سلولی است.

در بررسی مقایسه‌ای گروه‌های تحت مطالعه، گروه C (با یک تزریق اولیه و دو تزریق یادآور) دارای بیشترین عیار آنتی‌بادی در آزمایش سرولوژی و همچنین بیشترین القای ایمنی سلولی در مقایسه با سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۱). این دستاورد نشان می‌دهد که تزریق یادآور سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی در میزبان خواهد شد. نتایج گویای آن است که پس از گروه C، به‌ترتیب، گروه B، با یک تزریق یادآور و گروه A بدون تزریق یادآور قرار می‌گیرند. البته گفتنی است تفاوت بین این دو گروه در مقایسه با گروه C کمتر است. همچنین در طول دوره مطالعه، یکنواختی در میزان ایمنی در گروه‌های ایمن شده وجود داشت.

از دیگر یافته‌های این مطالعه استفاده همزمان از دو سروتیپ ویروس آنفلوانزا یعنی H9N2 و H1N1 که از تحت تیپ‌های رایج پرندگان و انسان هستند، برای نشان دادن حفاظت متقاطع علیه ویروس‌های در گردش است. مقایسه داده‌های حاصل از به‌کارگیری این دو تحت تیپ در آزمایش VN حاکی از این است که تفاوت معناداری بین نتایج به دست آمده وجود ندارد (P>۰/۰۵).

مقایسه نتایج حاصل از این دو روش با محاسبه Z-score به صورت کاملا همسان افزایش عیار آنتی‌بادی را نشان می‌دهد. اندازه کاپا بین این دو آزمایش برابر با ۰/۹۳ محاسبه شد و از آن‌جایی که اندازه بیش از ۰/۸ نشان‌دهنده تطابق بالا بین دو ویروس است، می‌توان نتیجه گرفت که بین نتایج حاصل از دو ویروس در ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال در موش‌های دریافت کننده DNA واکسن

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

HA2 هم‌خوانی بالایی وجود دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از سازه پیشنهادی می‌تواند حداقل علیه این دو تحت تیپ شایع حفاظت متقاطع ایجاد نماید. بدیهی است این حفاظت پیامد استفاده از قطعه حفاظت شده HA2 در طراحی DNA واکسن علیه عفونت‌های آنفلوانزا می‌باشد و با توجه به حفاظت شدگی قطعه HA2 در تحت تیپ‌های آنفلوانزا، در سایر تحت تیپ‌های این ویروس نیز ایجاد خواهد شد. همچنین پس از دو بار تزریق یادآور، ۸۴٪ موش‌های تیمار شده گروه C از میانگین عیار آنتی‌بادی ۱/۶< برخوردار بودند که تفاوت چشمگیری (P<۰/۰۱) با موش‌های همین گروه پیش از تزریق یادآور دوم داشتند. در بررسی بی‌ضرری این واکسن در بازرسی‌های روزانه و همچنین آزمایش هیستوپاتولوژی هیچگونه واکنش التهابی و ناخواسته حاصل از تزریق DNA واکسن مورد مطالعه در موش‌های تحت آزمایش مشاهده نشد که این نتایج بیانگر این هستند که هیچ یک از ترکیبات DNA واکسن HA2 اثرات نامطلوبی نداشتند.

بنابراین نتایج به دست آمده از این مطالعه حاصل القای پاسخ‌های ایمنی متقاطع هومورال و سلولی توسط DNA واکسن بر پایه قطعه HA2 علیه ویروس آنفلوانزا بیانگر این نکته هستند که این توالی اسید نوکلئیکی قابلیت افزایش پاسخ‌های ایمنی متقاطع به صورت هومورال و سلولی را علیه ویروس‌های آنفلوانزا دارد. همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که با استفاده از DNA واکسن طراحی شده در این پژوهش در حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه هیچگونه اثرات جانبی مشاهده نشد که نشان دهنده بی‌ضرری واکسن مذکور می‌باشد.

بر اساس مطالعه انجام شده و نتایج حاصل از آن، برای انجام مطالعات بیشتر در این زمینه و همچنین ارایه راهکارهایی برای افزایش کارایی سیستم‌های جدید کنترل و پیشگیری ویروس آنفلوانزا، طراحی واکسن بر مبنای اپی‌توپ‌های موجود در نواحی محافظت شده در توالی HA2 و یک پروتیین داخلی مانند NP و یا M2 به صورت پروتیین کایمر می‌تواند هدف مطالعه بعدی باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره Ph.D. ویروس‌شناسی تحت عنوان "طراحی و ارزیابی DNA واکسن بر پایه HA2 علیه بیماری آنفلوانزا به همراه بررسی و معرفی ژن Mx به عنوان یاور زیستی برای تقویت پاسخ‌های ایمنی" به شماره ثبت ۶۰۸ در دانشگاه تهران می‌باشد که با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شده است.

References

1. Testa JS, Shetty V, Hafner J, Nickens Z, Kamal S, Sinnathamby G. MHC class I-presented T cell epitopes identified by immunoproteomics analysis are targets for a cross reactive influenza-specific T cell response. *PloS one* 2012;7(11):e48484.
2. Soleimani S, Shahsavandi SH, Madadgar O, Mahravani H, Lotfi M. Mx bio adjuvant for enhancing immune responses against influenza virus. *Tehran Univ Med J* 2015;73(3):192-201.
3. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China. *N Engl J Med* 2014;370(6):520-32.
4. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol* 2004;59(1):1-15.
5. van de Sandt CE, Kreijtz JH, Rimmelzwaan GF. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses* 2012;4(9):1438-76
6. Khanna M, Sharma S, Kumar B, Rajput R. Protective immunity based on the conserved hemagglutinin stalk domain and its prospects for universal influenza vaccine development. *Bio Med Res Int* 2014; Article ID 546274.
7. Levy DE, Marié IJ, Durbin JE. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol* 2011;1(6):476-86.
8. Hossain MJ, Perez S, Guo Z, Chen LM, Donis RO. Establishment and characterization of a Madin-Darby canine kidney reporter cell line for influenza A virus assays. *J Clin Microbiol* 2010;48(7):2515-23.
9. Gauger PC, Vincent AL. Serum virus neutralization assay for detection and quantitation of serum-neutralizing antibodies to influenza A virus in swine. *Methods Mol Biol* 2014;1161:313-24.
10. Kitikoon P, Vincent AL. Microneutralization assay for swine influenza virus in swine serum. *Methods Mol Biol* 2014;1161:325-35.
11. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly and Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-2013.
12. Hessel A, Savidis-Dacho H, Coulibaly S, Portsmouth D, Kreil TR, Crowe BA, et al. MVA vectors expressing conserved influenza proteins protect mice against lethal challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 viruses. *PLoS One* 2014;9(2):e88340.
13. Bragstad K, Vinner L, Hansen MS, Nielsen J, Fomsgaard A. A polyvalent influenza A DNA vaccine induces heterologous immunity and protects pigs against pandemic A(H1N1)pdm09 virus infection. *Vaccine* 2013;31(18):2281-8.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

14. Park KS, Seo YB, Lee JY, Im SJ, Seo SH, Song MS, et al. Complete protection against a H5N2 avian influenza virus by a DNA vaccine expressing a fusion protein of H1N1 HA and M2e. *Vaccine* 2011;29(33):5481-7.
15. Swayne DE, Kapczynski D. Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immunol Rev* 2008;225:314-31.
16. Cong YL, Pu J, Liu QF, Wang S, Zhang GZ, Zhang XL, et al. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China. *J Gen Virol* 2007;88(Pt 7):2035-41.
17. Fan X, Hashem AM, Chen Z, Li C, Doyle T, Zhang Y, et al. Targeting the HA2 subunit of influenza A virus hemagglutinin via CD40L provides universal protection against diverse subtypes. *Mucosal Immunol* 2015;8(1):211-20.
18. Mastelic B, Garçon N, Del Giudice G, Golding H, Gruber M, Neels P, et al. Predictive markers of safety and immunogenicity of adjuvanted vaccines. *Biologicals* 2013;41(6):458-68.
19. Stephenson I, Das RG, Wood JM, Katz JM. Comparison of neutralising antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study. *Vaccine* 2007;25(20):4056-63.
20. Gadalla MR, El-Deeb AH, Emara MM, Hussein HA. Insect cell surface expression of hemagglutinin (HA) of Egyptian H5N1 avian influenza virus under transcriptional control of whispovirus immediate early-1 promoter. *J Microbiol Biotechnol* 2014;24(12):1719-27.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2016; Vol. 74, No. 8: 545-553 Original Article

Induction of heterologous immunity against current influenza serotypes by HA2 sub unit DNA vaccine

Sina Soleimani Ph.D.[1*]
Shahla Shahsavandi Ph.D.[1]
Omid Madadgar Ph.D.[2]

1- Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
Tel: +98- 26- 34570038
E-mail: s.soleimani@rvsri.ac.ir

Abstract

Received: 06 Jun. 2016 Revised: 08 Nov. 2016 Accepted: 19 Nov. 2016 Available online: 20 Nov. 2016

Background: Problems of live and inactivated influenza vaccines such as, increasing emerge and re-emerge viruses with high human mortality, current epidemics of influenza and direct transmission of avian viruses to human, affect the vaccination program. DNA vaccines as third generation of vaccines is specially considered for control of influenza in human and poultry. The main advantage of these vaccines is humoral and cellular immune responses and broad spectrum of using these vaccines for control of circulating strains of influenza. In this study the conserved fragment of HA2 to form of DNA vaccine was designed to induce immunity against influenza viruses and its heterologous protective immunity against these viruses was evaluated.

Methods: The experimental study was performed in Razi Vaccine and Serum Research Institute from December 2014 to July 2015 in Iran. The HA2 was cloned into pcDNA3.1 to assess the HA2 DNA vaccine and mice were immunized with the generated constructs in a DNA prime-DNA boost regimen in 4 groups. The humoral immune responses were analyzed at defined intervals by VN tests. The safety of the vaccine was evaluated by daily inspection and histopathological examination. For evaluation of cellular immunity, proliferation assay was used.

Results: The antibody titre and cellular immunity of immunized mice was significantly higher than control group for two serotypes and the highest responses was in the group with two-time boosting ($P<0.01$). There were no any local, general and histopathology reactions in immunized mice.

Conclusion: The HA2 DNA vaccine significantly enhanced circulatory antibody responses and cellular immunity against influenza current serotypes. This study showed the highest immune responses were in the group that immunized with HA2 in prime and two boosts. Besides that, this construct did not have any local and general reaction and any side effects in treated mice. So, this construct was introduced as candidate for control of influenza virus serotypes.

Keywords: DNA vaccines, HA2 protein, heterologous immunity, Influenza.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]