

معرفی و ارزیابی یاور زیستی Mx برای تقویت پاسخ‌های ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا

چکیده

سینا سلیمانی^۱ و

شهلا شاهسوندی^۲

امید مددگار^{۱*}

همایون مهروانی^۲

محسن لطفی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۸ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰

زمینه و هدف: بررسی توان تحریک و القا سامانه ایمنی توسط یاورهای زیستی، پایه پژوهش‌های نوین در زمینه پیش‌گیری و کنترل بیماری‌های عفونی است. در این پژوهش اثر توالی رمزگذار پروتئین سلولی Myxovirus resistance (Mx)، به‌عنوان یاور زیستی بر القا پاسخ ایمنی هومورال علیه ویروس آنفلوانزا بررسی شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی از خرداد تا آذر ۱۳۹۳ و بر روی موش‌های Balb/c انجام شد. پس از هم‌ردیفی توالی‌های Mx سه موتیف با بیش‌ترین همسانی بین گونه‌های انسان، موش و پرند انتخاب شده و توانایی القای پاسخ‌های ایمنی آنها علیه ویروس آنفلوانزا در مطالعه *in silico* ارزیابی شد. بر اساس داده‌های ایمونوفورماتیکی توالی Mx1 در وکتور pcDNA3.1 قرار داده شده و به‌عنوان یاور با آنتی‌ژن غیرفعال آنفلوانزا به گروه‌های موش تزریق شد. آزمایش‌های سرولوژی برای ارزیابی ایمنی‌زایی روی نمونه‌های سرم و آزمایش هیستوپاتولوژی برای ارزیابی بی‌ضرری واکسن و یاور انجام شد.

یافته‌ها: میانگین وزن موش‌ها در گروه‌های کنترل و تیمار تفاوتی نداشت ($P=0/05$) و در بازه زمانی آزمایش از ۲۱ g به ۳۷ g رسید. اختلاف افزایش عیار آنتی‌بادی علیه ویروس در موش‌های ایمن شده با واکسن دارای یاور Mx1 به‌ویژه با یادآور دوم در مقایسه با گروهی که فقط واکسن را دریافت کرده بودند، معنادار بود ($P=0/01$). بیش از ۷۸٪ موش‌های دریافت‌کننده یادآور دوم از میانگین عیار آنتی‌بادی بیش از شش (Log_2) برخوردار بودند که در مقایسه با موش‌های دریافت‌کننده یک نوبت یادآور بیش‌تر بود ($P=0/001$).

نتیجه‌گیری: داده‌ها بیانگر این هستند که Mx1 به‌عنوان یاور زیستی توان افزایش عیار آنتی‌بادی علیه ویروس و القای خاطره ایمنی قوی در ایمن‌سازی علیه آنفلوانزا بدون ایجاد اثرات جانبی را دارد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزا، واکسن غیرفعال، یاور زیستی، پروتئین Mx، ایمن‌سازی.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر محمد قریب
تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۷۰۰۰
E-mail: omadadgar@ut.ac.ir

مقدمه

ممکن است سبب بروز بیماری در پرندگان خانگی و یا بروز جهان‌گیری آنفلوانزا در جمعیت انسانی شوند.^۱ پیش‌گیری از بیماری آنفلوانزا در هر یک از جمعیت‌های انسانی و پرندگان با مصرف واکسن‌های غیرفعال تجاری امکان‌پذیر است اگرچه پدیدار شدن واریته‌های آنتی‌ژنی جدید این ویروس‌ها کاربرد این نوع واکسن را با محدودیت‌هایی مواجه کرده است.^۲ در دو دهه گذشته، تحت تیپ‌های H5، H7 و H9 سد محدودیت میزبان را شکسته و

آنفلوانزا، بیماری عفونی است که توسط ویروس‌های دارای RNA از خانواده ارتومیکسوسوویریده (Orthomyxoviridae) ایجاد شده، جنس‌های مختلف پرندگان و پستانداران را مبتلا می‌کند. پرندگان آبی و حشی میزبان‌های طبیعی برای تحت تیپ‌های متعدد ویروس آنفلوانزا A هستند. گاه ویروس‌ها به گونه‌های دیگر منتقل شده و

سبب توقف فعالیت نسخه برداری از کمپلکس‌های ریبونوکلوپروتئینی ویروسی (vRNP) و ورود ژنوم ویروس به هسته سلول میزبان می‌شود.^{۱۵-۱۳} مکانیسم دقیق و چگونگی فعالیت ضد ویروسی پروتئین‌های Mx هنوز مورد بحث است زیرا این پروتئین‌ها در گونه‌هایی که به ویروس آنفلوانزا مقاوم نیستند، بیان می‌شوند و برخی از آنها مانند MxB انسان، Mx3 رت و Mx اردک فاقد خاصیت ضد ویروسی هستند.^{۱۶}

به نظر می‌رسد جانمایی سلولی این پروتئین‌ها در هسته یا سیتوپلاسم تعیین‌کننده خواص ضد ویروسی آنها باشد. صرف نظر از توانایی احتمالی ضد ویروسی این پروتئین، یافته‌های حاصل از همسانی توالی Mx گونه‌های مختلف مهره‌داران نشان‌دهنده وجود مناطق بسیار حفظ شده در دامنه القا ایترتروپون این پروتئین است که در تنظیم سامانه ایمنی نقش دارند.^{۱۲} با توجه به خصوصیات و عملکرد پروتئین Mx، ایده استفاده از توالی رمزگذار آن به‌عنوان یاور زیستی برای نخستین بار در این پژوهش شکل گرفت.

این مطالعه با هدف بررسی اثر Mx بر ایجاد پاسخ‌های ایمنی القا شده علیه ویروس آنفلوانزا انجام شد. این یاور زیستی با وارد کردن ناحیه رمزدهنده ژن در یک وکتور بیانی ساخته شده و پیامد تزریق توام با واکسن غیرفعال آنفلوانزا در موش‌های Balb/c بررسی شد.

روش بررسی

این پژوهش از سه مرحله مطالعه در فضای مجازی (in silico)، در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)، و بر روی حیوان (in vivo) تشکیل شده و از خرداد تا آذر ۱۳۹۳ در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شده است. در اولین مرحله، توالی‌های با طول کامل پروتئین Mx گونه‌های انسان با شماره رهگیری P20591 و F8W8T1، موش آزمایشگاهی (E9Q0J3 و P09922) و ۲۴ توالی مربوط به پرند (Gallus gallus) از پایگاه داده Uniprot استخراج شد. پس از هم ردیفی، سه موتیف حفظ شده در دامنه القا ایترتروپون این پروتئین با توالی‌های Mx2: ¹⁰³VPDLT-، Mx1: ¹³SGKSSVLEALSGVALPR³⁰ و Mx3: ¹⁵²NVDIATTEALSMAQEVD¹⁶⁹ و LIDLPGITRVAV¹²⁰ تعیین شدند. توالی پروتئین هم‌گلوتینین (HA) ویروس آنفلوانزا (A/Chicken/Iran SS7/2011) با شماره رهگیری JX456181 از پایگاه

عفونت‌های انسانی گاه همراه با تلفات زیاد را سبب شده‌اند.^۳ به دلیل ماهیت تغییرپذیر ویروس‌های آنفلوانزا، افزایش سویه‌های نوپدید و بازپدید و به‌ویژه انتقال مستقیم این ویروس‌ها از پرندگان به انسان، در دهه‌های اخیر پژوهش‌های فراوانی در زمینه ارایه واکسن جامع و توانمند برای کنترل و پیشگیری از این بیماری انجام شده است. بخش گسترده و مهمی از این پژوهش‌ها به معرفی یاور (اجوان) و بررسی اثر آن در افزایش پاسخ ایمنی اختصاصی علیه آنتی‌ژن ویروس اختصاص دارد.^{۴،۵}

یاور که از کلمه لاتین Adjuvar به معنی "کمک" یا "به‌منظور افزایش" گرفته شده است، برای تحریک سامانه ایمنی، تسریع در برانگیخته شدن و افزایش و دوام پاسخ ایمنی موثر علیه عامل بیماری‌زا استفاده می‌شود.^{۶،۷} یاورها بر اساس ماهیت و ساختارشان به انواع ترکیبات آلی، لیپوزوم، ساپونین، کمپلکس‌های محرک ایمنی، ترکیبات موجود در پیکره باکتری‌ها و ترکیبات تجزیه‌پذیر زیستی تقسیم‌بندی می‌شوند.^۸ این ترکیبات به‌طور ذاتی قابلیت آنتی‌ژنی ندارند اما منبع مناسبی برای رهاسازی تدریجی آنتی‌ژن هستند و به چندین روش شامل تاثیرگذاری بر سامانه ایمنی با القای ترشح سایتوکین‌ها و پیامد آن افزایش تحریک سلول‌های Th1 یا Th2 و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک، ارایه شکل فضایی صحیح آنتی‌ژن به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) برای اتصال مناسب آنتی‌ژن به این سلول‌ها و القا لنفوسیت با ساز و کارهای مختلف و در نهایت تحریک سلول‌های B و افزایش تولید آنتی‌بادی اثر خود را اعمال می‌کنند.^{۹،۸} سمیت و ایجاد اثرات جانبی در میزبان هدف مهمترین مشکل برای ارایه یک ماده به‌عنوان یاور در ایمن‌سازی علیه یک عامل بیماری‌زا است.^{۱۰}

پروتئین‌های Mx، GTPase های نشانگر القای ایترتروپون هستند که در طیف وسیعی از سلول‌ها مانند ماکروفاژ و سلول‌های کبدی بیان شده و در تنظیم سامانه ایمنی در سلول نقش دارند. پیامد عفونت ویروسی، بیان پروتئین Mx در تعدادی از سلول‌ها برانگیخته می‌شود.^{۱۱} این پروتئین سلولی یکی از بهترین عواملی است که نقش آن در دفاع ویروسی مورد مطالعه قرار گرفته و برای ویروس‌های خانواده ارتومیکسوویریده به‌طور کامل اختصاصی عمل می‌کند.^{۱۲} این عملکرد اختصاصی نتیجه تشکیل شبکه چندرشته‌ای Mx و تقابل مستقیم بین انتهای کربنه پروتئین و نوکلئوپروتئین ویروس است که

و پس از محاسبه دز آنتی ژن مورد نیاز (Dose finding) به نسبت یک به هفت با Mx1 پیش از تزریق مخلوط شد. برای انجام مرحله سوم و ارزیابی اثر Mx1، تعداد ۵۰ سر موش ماده Balb/c (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج) با سن هفت هفته و میانگین وزنی ۲۱ g در سه گروه کنترل (هر گروه ۱۰ سر) و یک گروه تیمار (۲۰ سر) دسته بندی شدند.

در گام اول پس از سازگاری موش ها با محیط حیوان خانه، برای اطمینان از عدم وجود آنتی بادی علیه ویروس آنفلوانزا، سه روز پیش از شروع تزریق به طور تصادفی از موش ها خون گیری شده و عیار آنتی بادی در نمونه های سرم با آزمایش های ممانعت از آگلوتیناسیون (HI) و الایزا بررسی شد. گروه های مورد آزمایش عبارت بودند از گروه کنترل A: بدون دریافت واکسن آنفلوانزا و یاور Mx1، گروه کنترل B: فقط دریافت یاور، گروه کنترل C: فقط دریافت واکسن و گروه تیمار D: دریافت توام واکسن و یاور.

در روز صفر (نخستین تزریق) بر اساس گروه بندی ها، تزریق در محل عضله چهار سر ران به میزان ۰/۱ ml انجام شد. در روز ۱۴ یادآور اول به موش های گروه تیمار تزریق شد. در روز ۲۸ موش های گروه D پس از خون گیری به طور تصادفی به دو گروه مساوی D1 و D2 تقسیم شدند و به گروه D2 یادآور دوم تزریق شد. عیار آنتی بادی در نمونه های سرم گرفته شده در فواصل دو هفته ای تا پایان دوره آزمایش بررسی شد. پیش از هر نوبت خون گیری موش ها توزین می شدند. موارد اخلاقی نگه داری موش ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به هنگام خون گیری و واکسیناسیون به طور کامل رعایت شد.

برای تعیین وجود آنتی بادی علیه ویروس آنفلوانزا در نمونه های سرم و نیز ارزیابی اثر یاور بر افزایش پاسخ ایمنی، آزمایش های HI و الایزا انجام شد. برای انجام آزمایش HI، در هر گوده میکروپلیت ۲۵ µl در گوده های ستون ۱۲ آن ۵۰ µl PBS ریخته شد. ۲۵ µl از نمونه های سرم در اولین گوده هر ردیف (A تا G) ریخته شد. ستون ۱۲ به عنوان کنترل گلوبول قرمز و ردیف H به عنوان کنترل ویروس در نظر گرفته شد. رقت های دو برابر از هر سرم در هر گوده تهیه شد. ۲۵ µl از آنتی ژن اختصاصی ویروس دارای چهار واحد HA در گوده های ستون یک تا ۱۱ ریخته شد. پس از مخلوط کردن، میکروپلیت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. ۲۵ µl گلوبول قرمز ۱٪ (نسبت

داده GenBank استخراج شد سپس هر یک از موتیف های Mx به طور جداگانه با رابط (EAAAK) به این توالی متصل شده و سازه های Mx/HA طراحی شدند. پروتیین HA الفاکنده قوی سامانه ایمنی است و سطح بالایی از حفاظت در برابر آنفلوانزا ایجاد می کند. اپی توپ های خطی سلول های B با استفاده از نرم افزار Immune Epitope Database (IEDB) پیش گویی شده و جایگاه های آنتی ژنی توالی ها با الگوریتم Tongaonkar و Kolaskar بر اساس خصوصیات فیزیک و شیمیایی تعیین شدند. اپی توپ های سلول های T بر اساس اتصال به کمپلکس سازگار نسجی (Major histocompatibility complex, MHC) کلاس I و برش پروتئازی انتهای کربنه با SYFPEITH پیش گویی شدند. برای اطلاع از تاخوردگی درست پپتیدهای Mx/HA طراحی شده، N- گلیکوزیله شدن توالی اسیدهای آمینه (X) هر اسید آمینه ای به جز پرولین) و O-(beta)-GlcNAc با استفاده از ExpASy ارزیابی شدند.

در مرحله دوم، توالی های نوکلئوتیدی Mx گونه های مختلف جانوران از پایگاه داده GenBank استخراج شده و پس از هم ردیفی، جفت آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن به گونه ای طراحی شدند تا دارای موتیف Mx1 باشند. بر اساس داده های ایمونوفورماتیکی حاصل از مطالعه *in silico*، این موتیف بهترین نتیجه را در تحریک و القا سامانه ایمنی علیه ایمونوژن HA ویروس آنفلوانزا داشت. با بررسی جایگاه برش آنزیم های محدود اثر در وکتور pcDNA3.1(+ (Invitrogen, USA)، آنزیم های *EcoRI* و *NcoI* (Takara, Japan) به ترتیب در ۵ آغازگرهای رفت و برگشت قرار داده شدند. توالی های نوکلئوتیدی R: CCAATGGGATTGCGGTGATTGGCGA و F: GGGCAGCGGGTCACAATGGAATTC برای تکثیر قطعه Mx1 به طول ۱۰۲ bp طراحی شده و توسط شرکت Macrogen (South Korea) ساخته شدند. RNA بافت ریه و طحال چند موش آزمایشگاهی پس از یکنواخت شدن با استفاده از High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Germany) استخراج شد. پس از تکثیر ژن Mx1 با آزمایش Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)، قطعه مورد نظر در وکتور کلون شد.

برای تهیه واکسن غیرفعال، ویروس آنفلوانزا به تخم مرغ های جنین دار ۹-۱۰ روزه تزریق شده و مایع آمینوآلانتوییک در شرایط استریل برداشت شد. آنتی ژن به دست آمده با فرمالین به نسبت یک در ۱۰۰۰ غیرفعال شده

با استفاده از روش‌های الایزا و HI در جدول ۳ آمده است. نتایج این آزمایش‌ها نشان می‌دهد در موش‌های تیمار شده با آنتی‌ژن غیرفعال آنفلوانزا و یاور Mx1، یکنواختی در عیار آنتی‌بادی در طول دوره آزمایش وجود داشت و افزایش عیار آنتی‌بادی در طول دوره آزمایش نسبت به گروه C که فقط آنتی‌ژن غیرفعال دریافت کرده بودند معنادار بود (P=۰/۰۱). پس از دو بار تزریق یادآور، بیش از ۷۸٪ موش‌های

حجمی) به همه گوده‌ها اضافه شد. پس از مخلوط کردن و قرار دادن میکروپلیت به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه، رسوب و توده‌ای شدن گلبول‌های قرمز بررسی شد. عکس رقت آخرین گوده مشاهده شده در HI، به عنوان عیار آنتی‌بادی در نظر گرفته شد.^{۱۷} آزمایش الایزا با استفاده از کیت ProFLOk[®] Avian Influenza Virus Antibody Test (Synbiotics, USA) بر اساس دستورکار شرکت سازنده انجام شد.

برای بررسی آثار احتمالی آسیب بافتی ناشی از Mx1 و ارزیابی بی‌ضرری آن، علاوه بر توزین موش‌ها بازرسی روزانه بافت محل تزریق از نظر واکنش‌های موضعی مانند قرمزی و تورم انجام می‌شد. در روز هفتم پس از تزریق، نمونه‌های ریه و طحال از گروه‌های A، B و D برای بررسی هیستوپاتولوژی گرفته شد و مقاطع بافتی با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. پردازش آماری با استفاده از SPSS software, version 11 (SPSS, One-way ANOVA و با Inc., Chicago, IL, USA) صورت گرفت. بیشینه خطای مورد پذیرش برابر با ۰/۰۵ و ضریب اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در سازه‌های Mx2/HA و Mx3/HA تعداد مشابه اپی‌توپ خطی سلول B و اپی‌توپ سلول T با بیش‌ترین امتیاز در موقعیت‌های یکسان تعیین شدند. سازه Mx1/HA دارای یک اپی‌توپ خطی سلول B بیش‌تر در موقعیت چهار (جدول ۱) و یک اپی‌توپ سلول T بیش‌تر در موقعیت پنج بود (جدول ۲) که هر دو با توالی Mx1 (SVLEALSGV) مرتبط هستند. بر اساس مقیاس‌های آنتی‌ژن‌سیته Kolaskar و Tangaonkar میانگین احتمال آنتی‌ژنی برای Mx1 برابر با ۱/۲۴۱ (شکل ۱) و برای Mx2 و Mx3 برابر با ۰/۸۶۴ در مقیاسه با توالی HA (۰/۸۵۷) برآورد شد.

در این الگوریتم امتیاز بیش از یک بیانگر توان آنتی‌ژنی یک مولکول است، بنابراین سازه Mx1/HA بیش از دو سازه دیگر امکان افزایش پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه HA ویروس را دارد. اصلاحات پس از ترجمه در هر سه سازه مشابه بود و تعداد دو جایگاه N-گلیکوزیده در موقعیت اسیدهای آمینه ۱۳۹ و ۱۴۸ و دو جایگاه O-(beta)-GlcNAc در موقعیت اسیدهای آمینه ۲۴ و ۱۰۱ تعیین شدند. میانگین عیار آنتی‌بادی نمونه‌های سرم موش‌های کنترل و تیمار

جدول ۱: پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی سلول B در سازه Mx1/HA

جایگاه آغاز	جایگاه پایان	توالی اسید آمینه
۴	۱۸	SSVLEALSGVALPRE
۲۷	۳۷	PLMAILLVVT
۴۱	۴۷	DKICIGH
۶۲	۷۵	TNVPTHAKELLHT
۷۹	۸۵	EMLCATN
۸۸	۹۵	RPLILDTC
۱۱۲	۱۰۲	YGNPSCDLLG
۱۱۷	۱۲۳	SYIVERS
۱۲۶	۱۳۳	VNGTCYPG
۱۴۱	۱۵۹	LRTLFSSSSYQRIQIFPD
۱۷۰	۱۷۶	SKSCSDS
۱۸۹	۱۹۶	GLYPIQDA
۲۰۵	۲۱۶	DILFVWGIHHP
۲۴۴	۲۵۶	KPLIGRPLVNGL
۲۶۲	۲۷۰	YYWSILKPG
۲۸۲	۲۹۲	IAPWYGHVLSG
۳۰۶	۳۱۵	GNCWQCQPE
۳۲۱	۳۵۷	STLPFHNISKFAFGICPKYIGVKSLLKLAIGLRNVPK
۳۶۲	۳۶۹	LFGAIAGP
۳۷۵	۳۸۱	PGLVAGW
۴۰۲	۴۱۵	QKAVDKITSKVNNTI
۴۲۳	۴۲۸	YEIHDH
۴۴۵	۴۶۳	IQDVWAYNAELLVLE
۴۷۸	۴۸۵	LYNKVKRA
۴۹۷	۵۰۷	CFELYHKCDDQ
۵۳۳	۵۳۹	IEGVKLE
۵۴۴	۵۶۹	YKILTIYSTVASSLVLAIGFAAFLFW

توالی اسید آمینه اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B با استفاده از برنامه نرم‌افزاری IEDB پیش‌گویی شدند. جایگاه‌های آغاز و پایان هر موتیف مشخص شده است.

جدول ۲: پیش‌گویی اپی‌توپ‌های سلول T با امتیاز بالا در سازه‌های Mx/HA

جایگاه	Mx3	جایگاه	Mx2	جایگاه	Mx1
۳۴۶	KLAIGLRNV	۳۴۶	KLAIGLRNV	۳۴۶	KLAIGLRNV
۴۶۰	VLENQKTL	۴۶۰	VLENQKTL	۴۶۰	VLENQKTL
۲۶۵	SVLEALSGV	۲۶۵	SVLEALSGV	۵	SVLEALSGV
۲۸۱	LIAPWYGHV	۲۸۱	LIAPWYGHV	۲۶۵	SVLEALSGV
۳۳۹	YIGVKSLLK	۳۳۹	YIGVKSLLK	۲۸۱	LIAPWYGHV
۳۶۹	FIEGGWPGI	۳۶۹	FIEGGWPGI	۳۳۹	YIGVKSLLK
۴۰۷	KITSKVNTI	۴۰۷	KITSKVNTI	۳۶۹	FIEGGWPGI
۴۴۳	KIDDQIQDV	۴۴۳	KIDDQIQDV	۴۰۷	KITSKVNTI
۴۶۷	TLDEHDANV	۴۶۷	TLDEHDANV	۴۴۳	KIDDQIQDV
				۴۶۷	TLDEHDANV

توالی ۹ اسید آمینه اپی‌توپ‌های سلول‌های T با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SYFPEITH پیش‌گویی شدند.

جدول ۳: میانگین عیار آنتی‌بادی علیه آنفلوانزا در نمونه‌های سرم موش‌های کنترل و تیمار شده با آنتی‌ژن غیرفعال آنفلوانزا و یاور Mx1

گروه	سه روز پیش از نخستین تزریق	روزهای پس از تزریق					HI±SD	ELISA±SD
		۷	۱۴ (یادآور اول)	۲۸ (یادآور دوم)	۴۲	۵۶		
A (بدون تزریق)	۰/۱۹±۰/۷۳	۰/۲۳±۰/۷۱	۰/۱۸±۰/۸۶	۰/۲۱±۰/۷۳	۰/۲۲±۰/۷۷	۰/۲۲±۰/۷۱	HI±SD	
	۸۵/۲۲±۳۱۱	۳۲۱±۸۷/۵۹	۸۵/۱۷±۳۲۹	۷۷/۶۱±۳۲۹	۷۶/۵۷±۳۳۲	۶۹/۸۸±۳۳۵	ELISA±SD	
B (تزریق یاور)	۰/۲۲±۰/۷۲	۰/۲۱±۰/۷۸	۰/۲۷±۰/۸۳	۰/۲۳±۰/۷۹	۰/۲۳±۰/۸۵	۰/۲۶±۰/۹۳	HI±SD	
	۸۷/۶۷±۳۱۵	۳۱۹±۸۵/۱۳	۷۹/۶۱±۳۱۹	۸۴/۶۶±۳۳۳	۸۷/۱۷±۳۳۰	۸۶/۶۳±۳۳۵	ELISA±SD	
C (تزریق واکسن)	۰/۲۱±۰/۸۱	۰/۲۶±۲/۲۳*	۰/۴۲±۴/۲۸**	۰/۴۲±۴/۷۶**	۰/۴۲±۵/۱۲**	۰/۴۲±۵/۲۳**	HI±SD	
	۷۹/۴۳±۳۲۱	۷۶۵±۸۳/۶۱	۱۰۱/۳۴±۲۸۳۴**	۱۱۸/۳۹±۳۶۸۹**	۱۳۴/۳۲±۴۶۵۶**	۱۴۱/۲۶±۴۸۱۷**	ELISA±SD	
D1 (تزریق توام با یک یادآور)	۰/۲۳±۰/۷۸	۰/۲۷±۳/۳۸*	۰/۴۲±۵/۳۵**	۰/۴۲±۶/۲۱***	۰/۴۲±۶/۵۳***	۰/۴۲±۶/۵۳***	HI±SD	
	۷۸/۱۹±۳۱۳	۱۱۱۲±۸۹/۶۷*	۱۴۶/۴۷±۳۵۴۷**	۱۵۱/۵۶±۴۲۳۱**	۱۵۳/۱۶±۵۵۲۸***	۱۷۳/۶۸±۵۹۳۷***	ELISA±SD	
D2 (با دو یادآور)	۰/۱۸±۰/۷۸	۰/۲۵±۳/۱۲*	۰/۴۲±۵/۴۰**	۰/۴۲±۶/۳۳***	۰/۴۲±۶/۷۸***	۰/۴۲±۶/۸۱***	HI±SD	
	۸۱/۲۰±۳۳۴	۱۲۳۴±۹۳/۵۸*	۱۴۳/۵۶±۳۴۹۸**	۱۵۰/۳۹±۴۳۴۶**	۱۵۵/۵۴±۶۱۱۷***	۱۷۹/۴۳±۶۳۳۷***	ELISA±SD	

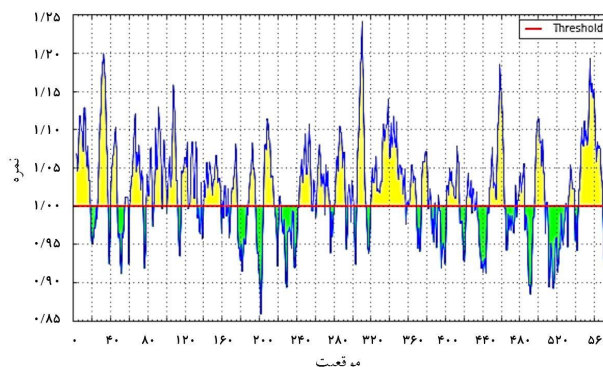
نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شده و P=۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد (* P=۰/۰۵, ** P=۰/۰۱, *** P=۰/۰۰۱).

گسترده‌ای در انسان و پرندگان دارد شامل رشد و تکثیر بذر ویروس آنفلوانزا (در تخم مرغ جنین‌دار و یا کشت سلول) و غیرفعال کردن مایع حاوی ویروس است. اما این نوع واکسن‌ها به‌تنهایی در القای پاسخ‌های ایمنی کارایی مناسبی ندارند و برای فعال‌سازی APC ها و برانگیخته شدن هرچه بیشتر پاسخ هومورال اختصاصی، استفاده از یک یاور مناسب و بدون اثرات جانبی برای تقویت پتانسیل القای ایمنی در کنار عامل ایمونوژن ضروری است.^{۲۱}

پروتئین‌های Mx، GTP آزهای بزرگ نشانگر القای ایترفرون هستند و با توجه به عملکردشان در تنظیم سامانه ایمنی،^{۱۲} در این تحقیق ایده استفاده از پروتئین Mx به‌عنوان یک یاور زیستی فاقد اثرات جانبی برای استفاده در واکسن آنفلوانزا شکل گرفت. در این مطالعه ابتدا توانایی القای پاسخ ایمنی سه موتیف در دامنه القا ایترفرون پروتئین Mx که بیش‌ترین همسانی و حفظ شدگی بین سه گونه انسان، موش و پرند را دارند در شرایط *in silico* مورد ارزیابی قرار گرفت.

آگاهی از توان آنتی‌ژنی و شناسایی اپی‌توپ‌های محافظت شده به درک امکان القا سامانه ایمنی علیه عامل بیماری‌زا کمک می‌کند. گلیکوپروتئین سطحی HA ویروس آنفلوانزا نقش اساسی در شناسایی سلول‌های هدف، اتصال و نفوذ ویروس به سلول و بیماری‌زایی ویروس ایفا می‌کند و دارای بیش‌ترین خصوصیات آنتی‌ژنی بین پروتئین‌های ویروس است. پروتئاز میزبان این مولکول را به زیرواحدهای HA₁ و HA₂ دارای مکان‌های اتصال و اپی‌توپ‌هایی که هدف اولیه آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده هستند، تبدیل کرده و در نتیجه آنتی‌بادی علیه این پروتئین عفونت ویروس را به‌طور کامل حذف خنثی می‌کند.^{۲۲}

با استفاده از Kolaskar و Tongaonkar میانگین آنتی‌ژنی Mx1 متصل شده به HA ویروس بیش‌تر از دو موتیف دیگر و برابر با ۱/۲۴۱ محاسبه شد. در این الگوریتم امتیاز بیش از یک بیانگر توان آنتی‌ژنیک یک مولکول است، بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که سازه Mx1/HA بیش از دو سازه دیگر و نیز نسبت به مولکول HA امکان ایجاد پاسخ ایمنی را دارد. ایجاد هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی نیازمند برهم‌کنش سلول T و آنتی‌ژن پردازش شده است. افزایش تعداد اپی‌توپ‌های خطی سلول B و سلول T در این سازه نسبت به سازه‌های دیگر نیز موید اثر احتمالی Mx1 در تحریک



شکل ۱: پیش‌گویی خاصیت آنتی‌ژنیسته Mx1/HA با استفاده از الگوریتم Kolaskar-Tongaonkar. میانگین بیش از یک (۱/۲۴۱) نشان‌دهنده آنتی‌ژنیک بودن این سازه است. پیک موقعیت ۲۰-۱ مربوط به Mx1 و بقیه پیک‌ها در موقعیت‌های مختلف HA ویروس پراکنده‌اند.

گروه D2 از میانگین عیار آنتی‌بادی بیش از شش (\log_2) برخوردار بودند که با موش‌های گروه D1 که یک نوبت تزریق یادآور را دریافت کرده بودند متفاوت بود ($P=0/001$). میانگین وزن موش‌ها در تمامی گروه‌های کنترل و تیمار تفاوتی نداشت ($P>0/05$) و در بازه زمانی آزمایش از میانگین ۲۱ g به ۳۷ g رسید. هیچ‌گونه واکنش ناخواسته‌ای نیز در طول دوره مطالعه مشاهده نشد. در آزمایش هیستوپاتولوژی نمونه‌های ریه و طحال موش‌های دریافت‌کننده یاور، هیچ‌گونه واکنش التهابی مشخصی در اثر تزریق Mx مشاهده نشد.

بحث

با بروز همه‌گیری‌های اخیر آنفلوانزا، انتقال مستقیم ویروس‌های پرندگان به انسان و افزایش تحت تیپ‌های جدید با رخداد تلفات انسانی بالا مانند H5N1 و H7N9، تلاش‌های فراوانی برای ارایه واکسن‌های توانمند و موثر صورت گرفته است.^{۱۹،۱۸} در ایمن‌سازی جمعیت‌های انسانی و پرندگان علیه آنفلوانزا از واکسن‌های غیرفعال به‌طور گسترده استفاده می‌شود. کارایی این واکسن‌ها علاوه بر کیفیت آنتی‌ژن به میزبان هدف نیز بستگی دارد و وضعیت ایمنی، سلامت و سن میزبان از عوامل مهم تاثیرگذار بر ایمن‌زایی واکسن‌های آنفلوانزا در تمام گونه‌ها هستند.^{۲۰} فرایند تولید این واکسن که مصرف

آنتی ژن غیرفعال آنفلوانزا و یاور Mx1 نشان داد میانگین عیار آنتی بادی علیه ویروس آنفلوانزا در موش‌های ایمن شده با واکسن دارای یاور بیش‌تر از موش‌های کنترل است که واکسن را به‌تنهایی دریافت کرده‌اند. افزایش عیار در گروه تیمار D2Mx1 که دو بار یادآور دریافت کرده بودند بیش از گروه تیمار DIMx1 با یک نوبت تزریق یادآور بود. بدین ترتیب یاور Mx1 سبب القای پاسخ ایمنی هم‌مورال مناسب در برابر ویروس آنفلوانزا به‌ویژه پس از دو بار دریافت یادآور شده است. به‌طور کلی تکرار تزریق یادآور بیش‌تر در جمعیت‌هایی که ایمنی قبلی نسبت به آنفلوانزا ندارند توصیه می‌شود و اثر چندانی بر افزایش عیار آنتی بادی در جمعیت‌های دارای ایمنی محافظت کننده ندارد.^{۲۸}

در سال‌های اخیر محققان بر روی اثر دامنه‌ای از یاورهای مولکولی مانند سایتوکین‌ها و نیز مشتقات باکتری‌ها و بررسی چگونگی افزایش اثربخشی آنها متمرکز شده‌اند. آگاهی از نوع عملکرد یاور این امکان را فراهم می‌کند تا بین یاور و ایمونوژن، هماهنگی برای افزایش چند برابری در کارایی واکسن ایجاد شود.^{۲۹،۳۰} در مطالعه Kobiyama و همکاران نشان داده شد مولکول‌هایی که پاسخ‌های ایمنی ذاتی را از مسیر STING-TBK1 فعال می‌کنند، می‌توانند به‌عنوان یاورهای ژنتیکی برای تقویت ایمنی‌زایی DNA واکسن آنفلوانزا در مدل موش مورد استفاده قرار گیرند.^{۳۱} در همان سال Jalilian و همکاران بیان کردند در تحریک سامانه ایمنی ذاتی علیه ویروس آنفلوانزا، یاورهای ذره‌ای نقش مهمی بر عهده دارند.^{۳۱} توالی پپتیدی سنتتیک IC31® با هدف قرار دادن مسیر انتقال پیام TLR-9 سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی و هم‌مورال در واکسن‌های فصلی آنفلوانزا می‌شود.^{۳۲}

Mizel و همکاران برای افزایش توان ایمنی‌زایی واکسن‌های VLP آنفلوانزا از فلاژلین به‌دست‌آمده از باکتری سالمونلا به‌عنوان یاور استفاده کردند.^{۳۳} به‌تازگی Sadeghi و همکاران نشان دادند هموکینین-۱ سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا می‌شود. این الیگونوکلوئوتید تنظیم‌کننده سامانه ایمنی بوده و با تحریک آنتی بادی در تغییر مسیر ایمنی به‌سمت پاسخ‌های ایترفرونی نوع یک موثر است.^{۳۴}

یافته‌های به‌دست‌آمده از پژوهش‌ها بر روی یاورها نشان می‌دهند که واکنش‌های جانبی در دریافت‌کنندگان واکسن به فراوانی اتفاق می‌افتد و

پاسخ‌های ایمنی علیه عفونت آنفلوانزا است. کمک به تاخوردگی درست پروتیین HA و افزایش ظرفیت اتصال در صورت تشکیل تریمر، مهمترین هدف گلیکوزیله شدن این مولکول در سلول‌های آلوده شده میزبان است. اگرچه این پروتیین در تمام تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا گلیکوزیله می‌شود اما تعداد و موقعیت آن حتی در واریته‌های آنتی ژنی با هم متفاوت است. این جایگاه‌ها بیش‌تر در اطراف ناحیه آنتی ژنی سر کروی مولکول HA₁ قرار دارند. در ویروس‌های H9N2 تعداد هفت جایگاه N-گلیکوزیله در ژن HA مشخص شده که دو تای آنها در زیرواحد HA₂ قرار دارند.^{۳۳} در اصلاحات پس از ترجمه سازه طراحی شده تعداد و موقعیت جایگاه N-گلیکوزیله تفاوتی با ویروس‌های ثبت شده نداشت. داده‌های ایمونوفورماتیکی بیانگر این هستند که موتیف Mx1 می‌تواند در افزایش ایمنی اختصاصی علیه ویروس آنفلوانزا اثر گذاشته و خاطره مناسبی ایجاد کند.

در گام دوم در شرایط آزمایشگاهی این مطالعه، از اثر فعال-کنندگی سامانه ایمنی ذاتی الیگونوکلوئوتیدهای CpG غیرمتیله در توالی DNA وکتور pcDNA3.1(+) برای طراحی یاور زیستی Mx استفاده شد تا اثر فراینده‌ای بر القا ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا داشته باشد. این موتیف توسط TLR9 شناسایی شده و از چند مسیر انتقال پیام داخلی ایمنی ذاتی را تحریک می‌کند. پیام‌های داخل سلولی TLR فقط توسط سلول‌های تخصص یافته دندریتیک پلاسماستیتوید گرفته می‌شوند. این پیام‌ها برای پاسخ CD4 سلول‌های T در آلودگی با ویروس آنفلوانزا مورد نیازند. در پاسخ به این آلودگی، فعال شدن مسیرهای انتقال پیام TLR سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی کلیدی شامل IRF-3، NF-κB و MAPK می‌شود. وجود پروتیین MyD88 برای انتقال پیام TLR ضروری است.^{۳۴} این پروتیین نشانگر تمایز میلیویدی و یک سازگار کننده درون سلولی است که نقش مهمی در تنظیم سامانه ایمنی ذاتی دارد.^{۳۵}

فعال شدن مسیر MyD88 سبب فعال شدن IRF3 و در نهایت فاکتور رونویسی NF-κB می‌شود. این فاکتور از ژن‌های سامانه ایمنی مانند ایترفرون ۷ رونویسی می‌کند که از مهمترین سدهای دفاعی بدن در برابر ویروس‌ها و فعال‌کننده ماکروفاژها در حذف سلول‌های آلوده است و نقش به‌سزایی در تعیین نوع پاسخ ایمنی علیه عوامل بیماری‌زا بر عهده دارد.^{۳۶،۳۷} نتایج آزمایش‌های سرولوژی حاصل از تجویز

نمی‌شود. داده‌های این پژوهش بیانگر این هستند که یاور Mx1 توان تحریک سامانه ایمنی و افزایش پاسخ‌های هومورال علیه ویروس آنفلوانزا را دارد. با این وجود انجام آزمایش‌های تکمیلی برای ارزیابی میزان پایداری، چگونگی امکان ترکیب با آنتی‌ژن و بررسی ساز و کار عملکردی آن ضروری است. ارزیابی امکان تحریک و القا پاسخ‌های ایمنی سلولی علیه ویروس آنفلوانزا توسط این یاور هدف مطالعه بعدی است.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه مقطع دکترای تخصصی ویروس‌شناسی در سال ۱۳۹۳ و کد ۲۸۰۸۸/۶/۱۱ می‌باشد که با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اجرا شده است. بدین‌وسیله از کلیه همکاران محترم که ما را در انجام این مطالعه یاری دادند به‌ویژه بخش حیوانات آزمایشگاهی و نیز از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

- Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 2006;12(6):881-6.
- Cox R, Brokstad K, 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.
- 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):520-29.
- Dai J, Pei D, Wang B, Kuang Y, Ren L, Cao K, et al. Molecular Adjuvant Ag85A Enhances Protection against Influenza A Virus in Mice Following DNA Vaccination. *Viruses* 2012;4(12):3606-24.
- Fagone P, Shedlock D, Bao H, Kawalekar O, Yan J, Gupta D, et al. Molecular adjuvant HMGB1 enhances anti-influenza immunity during DNA vaccination. *Gene Ther* 2011;18(11):1070-7.
- Wang W, Singh M. Selection of adjuvants for enhanced vaccine potency. *World J Vaccine* 2011;1(2):33.
- Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004;82(5):488-96.
- Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 2010;22(3):411-6.
- Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 2009;21(1):23-9.
- Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted. *Vaccine* 2001;19(17-19):2673-80.
- Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Sadeghi K, Mosavi SZ, Mohammadi A. Dose- and time-dependent apoptosis induced by avian H9N2 influenza virus in human cells. *Biomed Res Int* 2013;2013:524165.
- Haller O, Staeheli P, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 2007;89(6-7):812-8.
- Haller O, Staeheli P, Kochs G. Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev Sci Tech* 2009;28(1):219-31.
- Gao S, von der Malsburg A, Dick A, Faelber K, Schröder GF, Haller O, et al. Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. *Immunity* 2011;35(4):514-25.
- Dittmann J, Stertz S, Grimm D, Steel J, Garcia-Sastre A, Haller O, et al. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J Virol* 2008;82(7):3624-31.
- Zimmermann P, Mänz B, Haller O, Schwemmler M, Kochs G. The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses. *J Virol* 2011;85(16):8133-40.
- Katz J, Hancock K, Veguilla V, Zhong W, Lu XH, Sun H, et al. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine morbid. *Mortal. Weekly Rep* 2009;58(19):521-4.
- Mao H, Yen HL, Liu Y, Lau YL, Malik Peiris JS, Tu W. Conservation of T cell epitopes between seasonal influenza viruses and the novel influenza A H7N9 virus. *Virol Sin* 2014;29(3):170-5.
- Feng Y, Mao H, Xu C, Jiang J, Chen Y, Yan J, et al. Origin and characteristics of internal genes affect infectivity of the novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *PLoS One* 2013;8(11):e81136.
- Hilleringmann M, Jobst B, Baudner BC. Influenza cell-culture vaccine production. *Mol Vaccines* 2014;823-37.
- Zhang H, Wang L, Compans RW, Wang B-Z. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses* 2014;6(5):1974-91.
- Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 2014;14(5):315-28.
- Shahsavandi S, Salmanian AH, Ghorashi SA, Masoudi S, Ebrahimi MM. Evolutionary characterization of hemagglutinin gene of H9N2 influenza viruses isolated from Asia. *Res Vet Sci* 2012; 93(1):234-9.
- Shahsavandi S, Ebrahimi MM, editors. Influenza. Tehran: Jehade Daneshgahi; 2012. [Persian]

25. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998;9(1):143-50.
26. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88 and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 2003;170(6):3059-64.
27. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Hume. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75(2):163-89.
28. Holvast A, Van Assen S, De Haan A, Huckriede A, Benne CA, Westra J, et al. Effect of a second, booster, influenza vaccination on antibody responses in quiescent systemic lupus erythematosus: an open, prospective, controlled study. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(10):1294-9.
29. Fox CB, Kramer RM, Barnes L, Dowling QM, Vedvick TS. Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants. *Ther Adv Vaccines* 2013;1(1):7-20.
30. Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C, et al. Innate immune signaling by, and genetic adjuvants for DNA vaccination. *Vaccines* 2013;1(3):278-92.
31. Jalilian B, Christiansen SH, Jensen TV. Properties and prospects of adjuvants in influenza vaccination-messy precipitates or blessed opportunities? *Mol Cell Ther* 2013;1:2.
32. Riedl K, Riedl R, von Gabain A, Nagy E, Lingnau K. The novel adjuvant IC31 strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice. *Vaccine* 2008;26(27-28):3461-8.
33. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 2010;185(10):5677-82.
34. Sadeghi K, Shahsavandi S, Ebrahimi M, Mahravani H, Fazel H. Hemokinin-1 molecular adjuvant: an approach to enhance the efficacy of influenza vaccine. *Arak Univ Med Sci J* 2015;17(11):62-69.

Mx bio adjuvant for enhancing immune responses against influenza virus

Abstract

Received: 12 Jan. 2015 Accepted: 09 Mar. 2015 Available online: 10 May 2015

Sina Soleimani Ph.D. Student^{1,2}
Shahla Shahsavandi Ph.D.²
Omid Maddadgar Ph.D.^{1*}
Homayoon Mahravani Ph.D.²
Mohsen Lotfi Ph.D.²

1- Department of Microbiology,
Faculty of Veterinary Medicine,
Tehran University, Tehran, Iran.
2- Razi Vaccine and Serum
Research Institute, Karaj, Iran.

Background: In the last decade due to emerge and remerge of influenza viruses, quality improvement of vaccines to increase immune responses in target populations have been more necessary. The potential of biologic adjuvant to stimulate and induce immune system is the basis of modern researches in prevention and controlling program of infectious diseases. In this study, the effect of the coding sequence of cellular Myxovirus resistance (Mx) protein as a biological adjuvant for inducing humoral immune response against influenza virus was investigated.

Methods: The experimental study was performed on Balb/c mice in Razi Vaccine and Serum Research Institute from June to November 2014. Three conserved motifs of Mx were selected following sequence alignment between human, mouse and bird species. Potential of the motifs for stimulation immune responses against influenza virus were evaluated using *in silico* analysis. Based on the immune informatics data Mx1 sequence was the best immune inducer and cloned into pcDNA3.1 vector. Then formulated with inactivated H9N2 influenza antigen as adjuvant and injected to mice groups. The sera of vaccinated mice were collected prior to priming and boosting injections and also at defined weeks and analyzed with serological assays. Histopathological examination was done for evaluation of the vaccine and adjuvant safety.

Results: The mean weight of the Balb/c mice in all control and treatment groups was similar and ranged from 21 to 37 gr ($P=0.05$). The difference in increasing antibody titers against influenza virus in immunized mice who received Mx1-adjuvanted vaccine especially in second boosting was significant ($P=0.01$) compared to the vaccine alone group. More than 78% of the immunized mice receiving two-time boosting have the mean antibody titer of >6 (Log_2) which was higher ($P=0.001$) comparing to the mice with one booster injection.

Conclusion: These data revealed that Mx1 as biological adjuvant was able to increase antibody titer and induction memory immune responses against influenza immunization without causing any side effects.

Keywords: bio adjuvant, immunization, inactivated vaccine, influenza, Myxovirus resistance proteins.

* Corresponding author: Dr Mohammad Gharib St., Azadi St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-6117000
E-mail: omadadgar@ut.ac.ir