دارای رتبه علمی-پژوهشی
ازکمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

ارزیابی ایمونولوژیک DNA واکسن بیان کننده ژن M2 ویروس آنفلوانزا در مدل موشی آنفلوانزا

مینا شفیع فر
کارشناس ارشد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

علیجان تبرایی
دانشیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

آزاده سجادیان
کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران

فاطمه فتوحی
استادیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات آنفلوانزا، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

امیر قائمی
استادیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان

نویسنده مسئول: امیر قائمی

پست الکترونیک: ghaem_amir@yahoo.com

تلفن : ۰۱۷۱-۴۴۲۱۶۵۱

آدرس: مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان

دریافت: ۹۲/۱۲/۲۵
ویرایش پایانی: ۹۳/۵/۱۹
پذیرش: ۹۳/۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *با به کارگیری ژن M2 که پروتئین حفاظت شده ویروس آنفلوانزا را بیان می کند می توان واکسن پایدار و ثابتی را تولید کرد که نیاز به تجدید سالیانه را مرتفع سازد.*

روش بررسی: *به سه گروه موش به تفکیک pcDNA3-M2 و گروه های کنترل منفی pcDNA و PBS در سه دوز و به فاصله دو هفته تزریق شد. دو هفته پس از آخرین تزریق، میزان ایمنی سلولی با به کار گیری روش تکثیر لنفوسیتی MTT و سنجش اینترفرون گاما و انترلوکین ۴ صورت گرفت. سپس باقیمانده حیوانات با ویروس PR8 چالش گردیدند.*

یافته ها: *میزان تولید IFNγ و IL4 در گروه pcDNA-M2 در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری بیشتر می باشد (P<۰.۰۰۰۱) همچنین نتایج تکثیر لنفوسیتی نشان می دهد. که شاخص تحریکی در موش های گروه واکسن در مقایسه با گروه های کنترل، به صورت معنی داری بیشتر است (P<۰.۰۵). نتایج چالش موش های واکسینه شده با ویروس PR8 نشان داد که تقریباً ۵۰ درصد از موش های دریافت کننده واکسن تلف شدند که نسبت به گروه های کنترل که حدود ۱۰۰ درصد مرگ و میر داشتند سطح محافظتی خوبی را ایجاد می کند.*

نتیجه گیری: *واکسن pc DNA3-M2 را می توان به عنوان واکسنی نوید بخش و حفاظت شده برای مقابله با عفونت های آنفلوانزا در نظر گرفت.*

واژه های کلیدی: *ویروس آنفلوانزا، واکسن ژنی، پروتئین M2*

آدرس مقاله
شفیع فر م، تبرایی ع، سجادیان آ، فتوحی ف، قائمی ا"ارزیابی ایمونولوژیکDNA واکسن بیان کننده ژنM2 ویروس آنفلوانزا در مدل موشی آنفلوانزا" مجله علوم آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۹-۱۶

مقدمه

ویروس آنفلوانزا یک عامل بیماری زای جهانی و مهم در پرندگان، پستانداران و انسان است. واکسن های ویروسی آنفلوانزا که به صورت تجاری برای انسان، اسب و خوک استفاده می شوند واکسن های ویروس کامل غیر فعال شده و یا زیر واحدی هستند(۱). واکسن های غیر فعال عموماً از ویروسی که در تخم مرغ تکثیر یافته، تهیه می شوند. با وجود این که این واکسن ها بروز بیماری و شدت علائم بالینی را کاهش می دهند اما نمی توانند حفاظت کاملی در مقابل عفونت ویروس ایجاد کنند.Ulmer و همکاران در سال ۱۹۹۳ برای اولین بار کارایی یک DNA واکسن در مدل موشی آنفولانزا را نشان دادند(۲). این روش به عنوان انقلاب سوم در واکسن شناسی شناخته شده است. Johnson و همکاران در سال ۲۰۰۰، ژن کامل HA ویروس A/Sichuan/2/87/H3N2 را در پلاسمید pI.17 کلون کردند و به موش های BALB/c تزریق کردند که پاسخ T cell ها را به همراه داشت (۳). برای اولین بار Ulmer و همکاران نشان دادند که DNA واکسن ژنی NP قابلیت القای ایمنی متقاطع بر علیه سویه های آنفلوانزای A را داراست. در سال ۲۰۰۶ نتایج حاصل از مرحله اول کارآزمایی بالینی واکسن ژنی آنفلوانزا بر اساس بیان ژن HA منتشر گردید که نشان از بی خطر و کارآمد بودن این واکسن در انسان ها داشت (۳-۵). درسال ۲۰۰۶ نتایج حاصل از مرحله اول کارآزمایی بالینی واکسن ژنی آنفلوانزا بر اساس بیان ژن HA منتشر گردید که نشان از بی خطر و کارآمد بودن این واکسن در انسان ها داشت(۶).John Guo J و همکاران در سال ۲۰۱۰، وکتور pStar–M2/HA را که حاوی دو ژن HA وM2 ویروس آنفولانزا A/H5N1 بود را به سلول های 293T cell ترانسفکت کردند و به کمک روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (IFA) بیان پروتئین های مورد نظر را به اثبات رساندند (۶). Esghaei و همکاران در سال ۲۰۱۱، ژن M2 ویروس آنفولانزای(H1N1) A/New Caledonia/20/99 را در وکتور بیانی pcDNA3.1 کلون کردند و میزان بیان آن را در سه رده سلولی MDCK, Hela و COS-7 بررسی کردند(۷). واکسن های ژنی نسل نوینی از واکسن ها هستند که در قیاس با واکتسن های نتسل قبل دارای مزایایی می باشند که از آن جمله می توان به توانایی تحریک هر دو سیستم ایمنی سلولار وهمورال، پایداری ساختارهای DNA و عدم نیاز به زنجیره سرد برای نگهداری اشاره کرد. همچنین استفاده از این نوع واکسن ها از ایجاد واکنش های آلرژیک در قیاس با واکسن هایی که در تخم مرغ تولید می شوند، جلوگیری می کند (۸). یکی از واکسن های جایگزین که می تواند به برخی از این مشکلات غلبه کند واکسن های اسیدنوکلئیکی است که آنتی ژن های حفاظت شده ویروس را کد دهی می کند (۹،۱۰). ژن M_2 ویروس آنفلوانزا بیان کننده پروتئین اینتگرال غشایی M2 با کارایی مشابه کانال پروتونی تنظیم PH می باشد که در بین تمامی ساب تایپ های ویروس آنفلوانزا مشترک و محافظت شده است. به همین دلیل این ژن می تواند کاندیدای مناسبی برای طراحی یک واکسن دائمی بر اساس پروتئینM_2 باشد(۱۱). مطالعات نشان داده است که پروتئین M_2 توانایی ایجاد پاسخ ایمنی حفاظتی نسبی بر ضد سویه های مختلف ویروس آنفولانزای نوع A را دارا می باشد. از این رو، در سال های اخیر تلاش جهت افزایش کارایی ایمنی توسط پروتئین M_2 افزایش یافته است(۱۲). در این مطالعه قابلیت تحریک DNA واکسن بیان کننده ژن M2 آنفلوانزا در مدل موش آنفلوانزا مورد بررسی و سنجش قرار گرفت.

روش بررسی

تکثیر ویروس و تعیین تیتر کشنده:

در این مطالعه از ویروس آنفلوانزای A/ PR/8 /34 سازگار شده با موش جهت چالش موش های واکسینه استفاده گردید. سلول های MDCK در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، پنی سیلین ۱۰۰U/ml و استرپتومایسین µl/ml ۱۰۰ کشت داده شدند. پس از رشد سلول ها، ویروس به آن تلقیح گردید و پس از ۴۸ ساعت جمع آوری و خالص گردید. به منظور ارزیابی کارایی واکسن در چالش با ویروس وحشی لازم بود مشخص شود که چه مقداری از ویروس برای حیوان کشنده است (MLD50). بنابراین ۱۸ موش ۸ هفته ای در ۳ گروه ۶ تایی تقسیم بندی شدند و به هر کدام ۲۰ میکرولیترکتامین و ۵ میکرولیتر زایلازین به صورت صفاقی

تزریق گردید تا موش ها نیمه هوشیار شوند. سپس به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر ویروس (۵۰ میکرولیتردر هر حفره بینی) با رقت های 10^{-1} تا 10^{-6} تلقیح شدند. سپس به مدت ۱۴ روز در زیر هود کلاس ۲ زیستی نگهداری شده و هر روز وزن شده و از نظر مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند. تیتر کشنده ویروس با استفاده از فرمول کربر محاسبه شد.

تولید و استخراج پلاسمید:

پلاسمید بیانی کد کننده پروتئین هدف pcDNA3-M2 که قبلا در آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران ساخته و تایید شده بود در اختیار اینجانب قرار گرفت. پلاسمید pcDNA3 کد کننده M2 و همچنین پلاسمید فاقد ژن در باکتری E.coli Top10 F′ تکثیرداده شد و استخراج آنها در مقیاس انبوه با بکار گیری کیت کیاژن انجام گرفت.

واکسیناسیون موش های Balb/C: موش های ماده ۶-۸ هفته ای تهیه شده از انستیتو پاستور به شرح ذیل در۳ گروه هفت تایی تقسیم بندی گردید.

گروه ۱: موش هایی که برای دریافتpcDNA– M2 در نظر گرفته شدند.

گروه ۲: موش هایی که برای دریافت pcDNA خالی در نظر گرفته شدند.

گروه۳: موش هایی که برای دریافتPBS در نظر گرفته شدند.

تزریق اول در زمان صفر و دو تزریق یادآور به فاصله دو هفته از یکدیگر انجام شد. در هر تزریق ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمید های تخلیص شده برحسب گروه های مورد آزمایش به صورت درون عضلانی استفاده گردید. چالش موش ها با ویروس آنفلوانزای A/ PR/8 /34 سازگار شده با موش دو هفته پس از آخرین تزریق انجام شد. دو هفته پس از آخرین تزریق، از هر یک از حیوانات دریافت کننده واکسن، خونگیری شد و سرم آنها جدا گردید. خونگیری از سینوس اربیتال موش ها و با استفاده از لوله موئینه انجام شد.اندازه گیری میزان آنتی بادی های ضد M2 موجود در سرم موش به روش الایزا (شرکت griner) انجام گرفت.

کشت سلول های طحال: برداشت طحال موش و جداسازی و کشت لنفوسیت های مطابق مراحل زیر انجام شد. ابتدا سه موش از هر گروه انتخاب شده، سپس حیوان با اتر بیهوش و در محیط سترون طحال حیوان بیرون آورده شد. توسط سرنگ ۵ میلی لیتری، محیط RPMI از شرکت گیبکو بدون سرم را به درون طحال تزریق کرده و در اثر فشار ایجاد شده در بافت، سلول های آن خارج و داخل پتری دیش نگهداری شد. سلول ها در داخل لوله فالکون جمع آوری و در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. سپس محیط رویی حذف و باقیمانده رسوب تعلیق شد. با به کار گیری بافر لیز گلبول های قرمز را حذف، سپس لوله ها سانتریفوژ شده و با حذف مایع رویی، شستشو با PBS حاوی ۲ درصد سرم تکرار شد. رسوب سلولی در ۵ میلی لیتر RPMI کامل حاوی ۱۰ درصد سرم تعلیق گردید. سلول ها شمارش و در صد بقا سلولی تعیین شد. با به کار گیری بافر لیز گلبول های قرمز حذف و رسوب سلولی در ۵ میلی لیتر RPMI کامل حاوی ۱۰ درصد سرم تعلیق گردید.

آزمایش MTT و تعیین شاخص تحریکی: برای هر موش۶ چاهک از میکرو پلیت ۹۶ خانه در نظر گرفته و تعداد $10^5 \times 3$ سلول در هر چاهک ریخته شد. به ۲ چاهک (کنترل مثبت)۵ میکرولیتر کانکاوالین(۱ میلی گرم در میکرولیتر) و به ۲ چاهک دیگر (کنترل منفی) ۵ میکرولیتر محیط کشت سلول اضافه شد. به ۲ چاهک آزمایش نیز ۲۵ /۰ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین M ریخته شد. حجم نهایی چاهک ها با محیط کشت کامل به ۲۰۰ میکرو لیتر رسانده شد.

پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند.

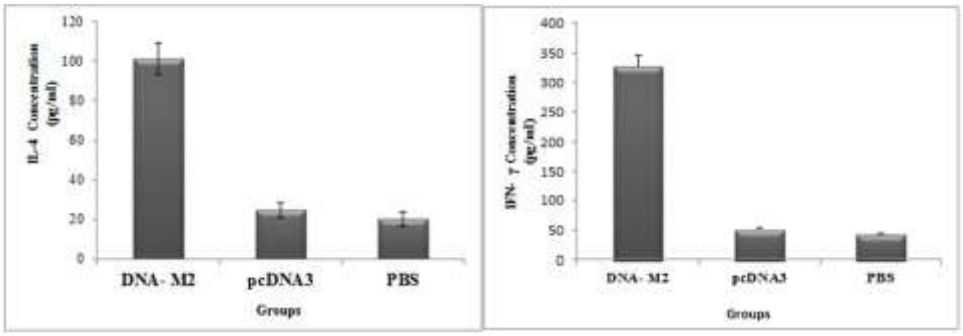
مقدار ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT(R&D Systems, Minneapolis, USA) آماده به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. تشکیل بلورهای فورمازون بنفش رنگ با میکروسکوپ بررسی شد. سپس محلول رویی سلول ها به آرامی جمع آوری، میزان ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه گردید تا کریستال ها در آن حل شود. جذب نوری پلیت ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد و عدد شاخص تحریکی با استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

$$SI = \frac{\text{OD of stimulated cultures}}{\text{OD of un-stimulated cultures}}$$

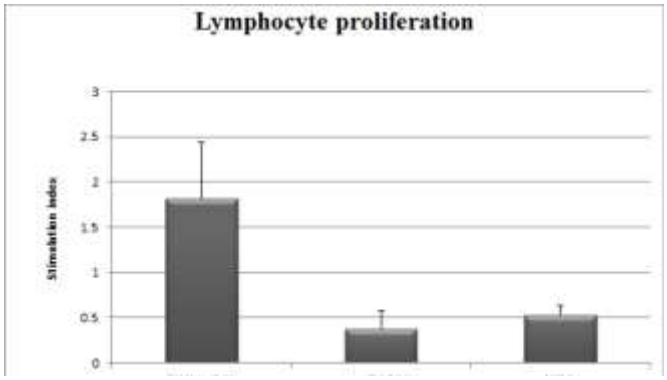
سنجش میزان سیتوکین های IFNγ و IL4: جهت بررسی میزان تولید IFNγ و IL4، سلول‌های طحال موش‌های گروه‌های مختلف واکسینه شده کشت و با محرک اختصاصی تحریک شدند. هفتاد و دو ساعت پس از تحریک، مایع رویی جمع آوری و آزمایش الایزا مطابق با روش کار شرکت eBioscience انجام گردید.

یافته ها

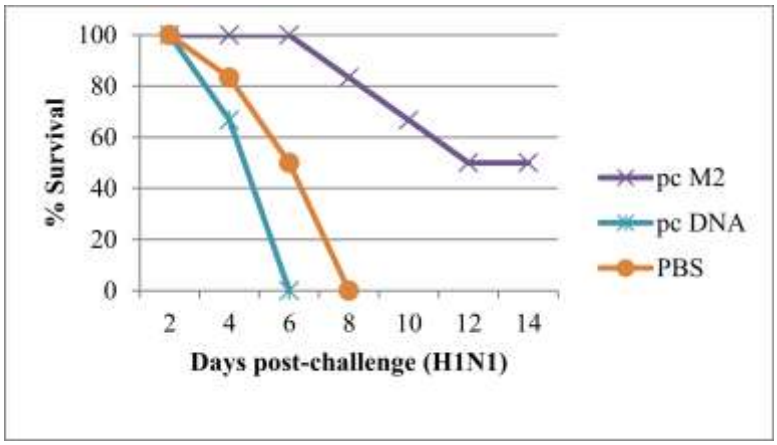
میزان تولید آنتی بادی IgG در گروه دریافت کننده pcDNA-M2 نسبت به گروه های کنترل منفی افزایش چشمگیری دارد. در حالی که در گروه های کنترل منفیpcDNA و PBS میزان تولیدآنتی بادی IgG مقدار بسیارکمی را نشان می دهد. و اختلاف معنی داری بین گروه pcDNA-M2 و گروه های کنترل منفی وجود دارد. میزان تولید Total IgG در گروه های موشی تحت آزمایش، گروه دریافت کننده DNA واکسن بیان کننده ژن M2، گروه کنترل وکتور واکسن گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین(PBS) در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی به طور معنی داری افزایش داشته است(P<۰/۰۰۰۱). در حالی که در گروه های کنترل منفی pcDNA و PBS، میزان تولید اینترفرون گاما مقدار بسیار کمی را نشان داده و نتایج معنی داری بین گروه pcDNA-M2 و گروه های کنترل وجود دارد که نتایج تایید کننده قابلیت واکسن ژنی M2 می باشد. گروه دریافت کننده DNA واکسن بیان کننده ژن M2 ، گروه کنترل وکتور واکسن، گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین (PBS) در مقیاس با گروه های کنترل دریافت کننده وکتور بیانی فاقد ژن وPBS اختلاف معنی داری را نشان داد(P<۰/۰۵). همچنین با بررسی این نتایج مشخص شد که گروه pcDNA-M2 در مقایسه با گروه های کنترل منفی pcDNA و PBS، القاء اینترلوکین۴ را در سطح نسبتاً بیشتری ایجاد می کند.



شکل ۱- نتایج آزمایش الیزا برای سنجش غلظت سیتوکینIFN-γ (الف) و سیتوکین IL-4 (ب). طحال موش های واکسینه شده یک هفته بعد از آخرین تزریق خارج و سلول های اسپیلونوسیت آنها با آنتی ژن اختصاصی تحریک شد و سپس میزان سیتوکین های آزاد شده در مایع رویی با روش الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر گروه سه موش در نظر گرفته شد و آزمایش ها سه مرتبه تکرار شد. DNA-M2: گروه دریافت کننده DNA واکسن بیان کننده ژن M2،pcDNA3: گروه کنترل وکتور واکسن، PBS: گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین(PBS) کنترل منفی



شکل ۲- مقایسه میزان اندیکس تحریکی محاسبه شده برای گروه‌های مختلف واکسینه شده. DNA-M2: گروه دریافت کننده DNA واکسن بیان کننده ژن M2، pcDNA3: گروه کنترل وکتور واکسن, PBS: گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین(PBS) کنترل منفی



شکل ۳- میزان بقا در موش های واکسینه شده بعد از چالش با ویروس PR8

گروه دریافت کننده DNA واکسن بیان کننده ژن M2، گروه کنترل وکتور واکسن، گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین(PBS) که موش هایی که pcDNA-M2 دریافت کرده بودند، دارای بالاترین شاخص تحریکی می باشند و در مقایسه با سایر گروه های کنترل، شاخص تحریکی در این گروه ها افزایش معنی داری (P<۰/۰۵) را نشان داد. نتایج چالش موش های واکسینه شده با ویروس PR8 نشان داد که تقریباً ۳۳ درصد از موش های دریافت کننده واکسنpcDNA –M2 تلف شدند که نسبت به گروه های کنترل منفی pcDNA وPBS، که حدود ۱۰۰درصد مرگ و میر داشتند سطح حفاظتی نسبتاً بهتری را ایجاد می کند.

بحث

به علت توانایی جهش زایی و فراوانی نوترتیبی ژنتیکی در ویروس های آنفلوانزا که موجب تغییرات آنتی ژنیک در آنها می شود، این ویروس ها در برابر اقدامات پیشگیری کننده مقاومت نشان می دهند. به منظور پیشگیری از بروز آنفلوانزای فصلی واکسن های مختلفی تا به حال مورد استفاده قرار گرفته است(۱۴،۱۳،۵). اولین بار Ulmer و همکاران نشان دادند که DNA واکسن ژنی NP قابلیت القای ایمنی متقاطع بر علیه سویه های آنفلوانزای A را داراست (۱۷). درسال ۲۰۰۶ نتایج حاصل از مرحله اول کارآزمایی بالینی واکسن ژنی آنفلوانزا بر اساس بیان ژن HA منتشر گردید که نشان از بی خطر و کارآمد بودن این واکسن در انسان ها داشت(۱۸،۵).

به کار می روند و بی خطر هستند. اما به دلیل ایجاد پاسخ ضعیف در جمعیت های در معرض خطر و نیز نیاز به تغییرات هر ساله در آن، محققان به دنبال واکسنی هستند که فرمولاسیون ثابتی داشته باشد و ایمنی متقاطع قابل قبولی در برابر زیر واحدهای مختلف ویروس ایجاد کند تا بتوان جهت پیشگیری از اپیدمی های آنفلوانزا و حتی پاندمی های احتمالی بهره جست. در این زمینه نواحی حفاظت شده ویروس آنفلوانزا نظیر M2 از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۴). مطالعات نشان داده است که راه اندازی پاسخ های ایمنی بر علیه این پروتئین ویروسی می تواند به حفاظت نسبی میزبان در برابر انواع ویروس های آنفلوانزا منجر شود. در سال ۱۹۹۵ Slepushkin و همکاران نشان دادند که پروتئین M2 بیان شده در سلول های حشرات می تواند موش ها را در برابر چالش با زیر واحد های مختلف ویروس محافظت نماید(۱۷،۱۶). همچنین Okuda و همکاران با تجویز طول کامل ژن M2 وM1 در قالب واکسن DNA توانستند آنتی بادی های اختصاصی و همچنین پاسخ های سلولی را در موش های واکسینه شده نشان دهند(۱۳). اولین بار Ulmer و همکاران نشان دادند که DNA واکسن ژنی NP قابلیت القای ایمنی متقاطع بر علیه سویه های آنفلوانزای A را داراست (۱۷). درسال ۲۰۰۶ نتایج حاصل از مرحله اول کارآزمایی بالینی واکسن ژنی آنفلوانزا بر اساس بیان ژن HA منتشر گردید که نشان از بی خطر و کارآمد بودن این واکسن در انسان ها

داشت(۱۴،۵). تولید ناقل بیانی M2 آنفلوانزا به عنوان واکسن ژنی به دهه پیش بر می گردد. Tompkins و همکاران در سال ۲۰۰۷ در یک استراتژی پرایم بوست (واکسن ژنی M2 به عنوان پرایم و آدنوویروس بیان کننده ژن M2) توالی های به شدت محافظت شده ژن M2 در ایمنی بر علیه سویه های پرندگان و انسانی را بررسی کردند (۱۹). نتایج بررسی آنها دلالت بر ایجاد ایمنی هومورال و سلولی دارد که این نتایج منطبق با نتایج مطالعه حاضر می باشد. مطالعات گوناگونی نشان داده اند که پاسخ CTL نقش بسیار مهمی در پاکسازی ویروس آنفلوانزا ایفا می کند. LO و همکاران با مقایسه واکسن (Cold adapted) با واکسن ژنی بوست شده با آدنوویروس، ثابت کردند که واکسن ژنی ایمنی بهتری را در برابر ویروس پاتوژن ایجاد می کند. از این رو در این پژوهش، ساختار پلاسمیدی که به عنوان یکی از ابزارهای نوین در القای ایمنی بر ضد عوامل بیماری زا به شمار می رود به عنوان واکسن ژنی بر ضد ویروس آنفلوانزا به کار گرفته شد(۲۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که واکسن DNA-M2 تکثیر یافته در سیستم پروکاریوتی، القاء ایمنی سلولی بالایی را در حیوانات تزریق شده در مقایسه با گروه های کنترل منفی ایجاد می کند. به کار گیری PCDNA-M2 باعث القاء پاسخ سیستم ایمنی سلولی بر علیه آنتی ژن M2 ویروس آنفلوانزا می شود که پس از تزریق به حیوان می تواند باعث حفاظت و بهبود سریع تر از بیماری شود. نتایج حاصل از چالش نشان می دهد که مرگ و میر ۳۳ درصدی موش های گروه دریافت کننده pcDNA در چالش با ویروس PR8 و کاهش مرگ نسبت به گروه های کنترل منفی دریافت کننده PBS وpcDNA-3 دلیلی بر کارایی ایمنی سلولی در مقابل ویروس آنفلوانزا بوده و می تواند در حفاظت و پیشگیری حیوان در مقابل ویروس آنفلوانزا کارا باشد. هرچند تزریق pcDNA -M2 به عنوان واکسن، القاء ایمنی هومورال را در حد نسبی پایینی ایجاد می کند که می تواند در حفاظت حیوان در مقابل ویروس آنفلوانزا کمک کننده باشد.

نتیجه گیری

به کار گیری PCDNA – M2 سیستم ایمنی سلولی را بر علیه آنتی ژن M2 القاء کرده که می تواند سطح محافظتی واکسن و بهبود حیوان را در مقابل ویروس آنفلوانزا به میزان زیادی افزایش دهد.

تشکر وقدردانی

این مقاله استخراج شده از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد می باشد که با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان (شماره قرارداد: ۳۵/۵۸۷/پ/گ، تاریخ ۱۳۹۲/۳/۲۷) و انستیتو پاستور ایران (طرح مصوب با شماره ۶۱۱) انجام گرفت. بدین وسیله از همه همکاران گرامی آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزای انستیتو پاستور سپاسگزاری می کنیم.

References

1. Flint JS, Racaniello VR, Krug R. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. 5th ed. 1999; 1655,16591.

2. Varghese J, Laver W, Colman P. *Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 A resolution.* Nature. 1983; 303: 35-40.

3. Palese P, García-Sastre A. *Influenza vaccines: present and future.* Journal of Clinical Investigation. 2002; 110(1): 9-13.

4. Davenport Fm, Rott R, Schaefer W. *Physical and biological properties of influenza virus components obtained after ether treatment.* J Exp Med. 1960; 112: 765-82.

5. Dowdle W, Schild G. *Laboratory propagation of human influenza viruses, experimental host range, and isolation from clinical material*. New York, NY: Academic Press Inc. 1975; 243–268.

6. Haensler J, Verdelet C, Sanchez V, Girerd-Chambaz Y, Bonnin A, Trannoy E, et al. *Intradermal DNA immunization by using jet-injectors in mice and monkeys.* Vaccine. 1999; 17(7-8): 628-38.

7. Flahault A, Zylberman P. *Influenza pandemics: past, present and future challenges*. Public Health Reviews. 2010; 32(1): 319-340.

8. Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, Renshaw M, et al. *DNA Vaccine Expressing Conserved Influenza Virus Proteins Protective against H5N1 Challenge Infection in Mice.* Emerging Infectious Diseases. 2002; 8(8): 796-801.

9. Liu W, Peng Z, Liu Z, Lu Y, Ding J, Chen Y-H. *High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity*. Vaccine. 2004; 23(3): 366-71.

10. Holsinger LJ, Shaughnessy MA, Micko A, Pinto LH, Lamb RA. *Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein.* Journal of virology. 1995; 69(2): 1219-25.

11. Zebedee SL, Lamb RA. *Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions.* Journal of virology. 1988; 62(8): 2762-72.

12. Zebedee SL, Lamb RA. *Growth restriction of influenza A virus by M2 protein antibody is genetically linked to the M1 protein.* Proceedings of the National Academy of Sciences. 1989; 86(3): 1061-5.

13. Quiñones-Parra S, Loh L, Brown LE, Kedzierska K, Valkenburg SA. *Universal immunity to influenza must outwit immune Evasion.* Front Microbiol. 2014; 5: 285.

14. Subbarao K, Chen H, Swayne D, Mingay L, Fodor E, Brownlee G, et al. *Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics*. Virology. 2003; 305(1): 192-200.

15. Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim MC, Kwon YM. *New vaccines against influenza virus*. Clin Exp Vaccine Res. 2014; 3(1): 12-28.

16. Slepushkin VA, Katz JM, Black RA, Gamble WC, Rota PA, Cox NJ. *Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein*. 1995; 13(15): 1399-402.

17. Schotsaert M, De Filette M, Fiers W, Saelens X. *Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments*. Expert Rev Vaccines. 2009; 8(4): 499-508.

18. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA. *Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines.* 1994; 12(16): 1541-1544.

19. Tompkins SM, Zhao ZS, Lo CY, Misplon JA, Liu T, Ye Z, et al. *Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1*. Emerg Infect Dis. 2007; 13(3): 426-35.

20. Epstein SL, Kong W-p, Misplon JA, Lo C-Y, Tumpey TM, Xu L, et al. *Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein.* Vaccine. 2005; 23(46): 5404-10.

Immunologic Evaluation of DNA Vaccine Encoding Influenza Virus M2 Gene in Type A-Influenza Mice Model

Shaffifar, M. (MSc)
MSc of Medical Virology, Infectious Diseases Research Center, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Tabarraei, A. (PhD)
Associate Professor of Medical Virology, Infectious Diseases Research Center, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Sajadian, A. (MSc)
MSc of Medical Microbiology, Shefa Neuroscience Research Centre, Tehran, Iran
Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Fotouhi, F. (PhD)
Assistant Professor of Medical Virology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Ghaemi, A. (PhD)
Assistant Professor of Medical Virology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Ghaemi, A.

Email: ghaem_amir@yahoo.com

Received: 19 Oct 2013
Revised: 10 May 2014
Accepted: 14 May 2014

Abstract

Background and Objective: The M2 gene expressing the conserved protein in influenza virus can be used to make a single-dose vaccine with permanent immunity.
Material and Methods: The mice were allocated to one case group immunized with pcDNA3-M2 and two control groups with pcDNA and PBS, in three dozes with interval of two weeks. Two weeks after the last injection, Cellular immunity was analyzed by MTT lymphocyte proliferation, interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin 4 (IL-4) ratio assays. The remaining animals were challenged with PR8 virus.
Results: The production rate of IFN8 and IL4 in pcDNA - M2 group was higher than that of control groups ($P > 0.0001$). Given the results of lymphocyte proliferation, Stimulation index (SI) in vaccinated mice was significantly higher than that of control groups ($P<0.05$). In comparison with mortality rate of 100% in control groups , the animals Challenged with PR8 vaccine had a 50% fatal rate implying a high protection level for this vaccine.
Conclusion: The pcDNA3-M2 Vaccine can be considered as a promising vaccine against influenza infections.
Keywords: Influenza Virus, Gene Vaccine, M2 Protein

This paper should be cited as: Shaffifar, M, Tabarraei, A, Sajadian, A, Fotouhi, F, Ghaemi, A. [Immunologic Evaluation of DNA Vaccine Encoding Influenza Virus M2 Gene in Type A- Influenza Mice Model]. mljgoums. 2015; 9(1):9-16 [Article in Persian]