

اثرات محافظتی DNA واکسن کد کننده ژن گلیکوپروتئین D-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بر میزان نهفتگی ویروس در گانگلیون تریژمینال

Protective Effects of DNA Vaccine Encoding Glycoprotein D-1 of Herpes Simplex Virus Type 1 on Latency Rate in Trigeminal Ganglia

Amir Ghaemi¹, Hoorieh Soleimanjahi²

امیر قائمی^۱، حوریه سلیمانجاهی^۲

1. Department of Biotechnology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

2. Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

۲. گروه ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: انسفالیت هرپس سیمپلکس یک بیماری نادر اما بسیار جدی می باشد که توسط ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ (HSV-1) ایجاد می گردد. بدنبال عفونت اولیه با ویروس HSV-1، نهفتگی ویروس در گانگلیون تریژمینال ایجاد می گردد. بنابراین پیشگیری از عفونت اولیه ویروس و همینطور تثبیت نهفتگی از اساسی ترین ویژگی های توسعه واکسن برای عفونت فوق محسوب می گردد. **مواد و روش ها:** در این مطالعه بر آن شدیم تا کارایی DNA واکسن بیان کننده ژن گلیکوپروتئین D-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در برابر چالش کشنده چشمی با HSV-1 (TCID₅₀ 5 × 10⁵) ویروس وحشی را در جهت مقابله با نهفتگی ویروس و نسبت مرگ و میر در مقایسه با گروههای کنترل مورد بررسی قرار دهیم. **یافته ها:** نتایج مطالعه نشان دهنده اثرات محافظتی واکسن DNA کد کننده ژن D-1 ویروس بر روی میزان نهفتگی و نسبت مرگ و میر موشهای واکسینه می باشد. **نتیجه گیری:** در مجموع این مطالعه نشان داد که ایمن سازی با واکسن DNA بیان کننده گلیکوپروتئین D-1 ویروس یک روش نوید بخش به منظور القای ایمنی محافظتی و در برابر چالش چشمی با ویروس کشنده می باشد.

اطلاعات مقاله

دریافت: ۲۷ آبان ۱۳۹۱

پذیرش: ۳۰ آذر ۱۳۹۱

کلیدواژه:

هرپس سیمپلکس
ویروس تیپ ۱،
DNA واکسن،
گانگلیون تری ژمینال.

ABSTRACT

Article info:

Received: 17 Nov. 2012

Accepted: 20 Dec. 2012

Key words:

Herpes Simplex Virus
Type-1,
DNA Vaccine,
Trigeminal Ganglion.

Introduction Herpes simplex encephalitis (HSE) is a rare but very serious disorder caused by herpes simplex type 1 virus (HSV-1). Following primary HSV-1 infection, viral latency develops in the trigeminal ganglia (TG). Therefore, prevention from primary HSV-1 infection and subsequent latency establishment is an important feature for vaccine development. **Materials & Methods** We evaluate efficacy of DNA vaccine encoding Glycoprotein D-1 (gD-1) gene of HSV-1 against lethal ocular challenge of TCID₅₀ 5 × 10⁵ plaque-forming units (pfu) per eye of wild HSV-1 versus negative control groups. **Results** The data demonstrated protective effects of DNA vaccine encoding Herpes simplex virus Glycoprotein D gene on latency rate in TG and mortality rate. **Conclusion** These results indicated that immunization with g D-1 DNA vaccine is a promising approach for eliciting a protective immunity against a HSV-1 lethal ocular challenge.

* Corresponding Author:

Amir Ghaemi

E-mail: ghaem_amir@yahoo.com

• نویسنده مسئول:

امیر قائمی

آدرس الکترونیکی: ghaem_amir@yahoo.com

مقدمه

ایران تهیه شدند. یک گروه از موش‌های خریداری شده با پلاسمید حاوی ژن گلیکوپروتئین gD ویروس تلفیح شدند که به هر موش ۹۰ میکروگرم از این پلاسمید بصورت داخل عضلانی تزریق شد. به گروه دوم از موش‌ها 5×10^5 TCID₅₀ استاندارد KOS بعنوان کنترل مثبت بصورت داخل صفاقی تزریق شد.

دو گروه نیز بعنوان کنترل منفی در این مطالعه در نظر گرفته شدند. یک گروه ۱۰۰ میکرولیتر PBS و گروه دوم ۹۰ میکروگرم pCDNA3 فاقد ژن دریافت کردند. تزریق‌های دوم به فاصله ۲۱ روز انجام شد. همه گروه‌های تزریق شده بیست و یک روز بعد از تزریق دوم، در هر دو چشم با 2 MLD_{50} (50% Mouse lethal Dose) از ویروس وحشی چالش شدند. ویروس مذکور از نمونه‌های بالینی، جداسازی شده و بر روی لاین سلولی Vero در مقیاس بالا تکثیر و خالص سازی شدند. (تصویر شماره ۱). ۲۸ روز پس از چالش با ویروس وحشی، گانگلیون تری ژمینال موشها جدا و استخراج DNA ویروسی از آنها صورت گرفت. میزان نهفتگی توسط روش PCR و با پرایمرهای اختصاصی برای ژن تایمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک با طول ۳۹۸ جفت باز و بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند (تصویر ۲).

توالی پرایمرهای ژن مذکور به این ترتیب می باشد:

TKF: 5' CTTAACAGCG TCAACAGCGT 3'

TKR: 5' TTGTGTGGTGTAGATGTTCCG 3'

موشهای مورد چالش قرار گرفته توسط ویروس وحشی تا ۲۸ روز از نظر میزان مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

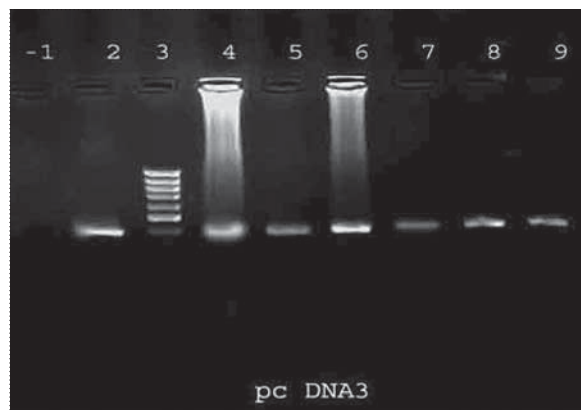
نتایج بررسی مرگ و میر نشان‌دهنده قابلیت واکنش حاوی ژن گلیکوپروتئین D ویروس و همینطور سویه استاندارد ویروس در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی برای محافظت از مرگ و میر ویروس می‌باشد. نتایج این بخش نشان‌دهنده کارایی مناسب واکنش ژنتیکی برای القای محافظت و بقای موش‌های مورد چالش در قیاس با گروه‌های کنترل می‌باشد، هر چند که گروه کنترل مثبت نشان‌دهنده بقای کامل موش‌های گروه بود. همچنین نتایج تکثیر تایمیدین کیناز با طول ۳۹۸ جفت باز با روش PCR بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده از گانگلیون‌های تری ژمینال نشان‌دهنده کارایی نسبی DNA واکنش مورد استفاده برای محافظت از نهفتگی در گانگلیون‌های تری ژمینال موش‌های مورد چالش می‌باشد. هر چند ویروس استاندارد بهترین محافظت در مقابل ایجاد نهفتگی را اعمال نمود ($p = 0.05$, KHi 2، جدول ۱). نتایج آزمون بقا و بررسی نهفتگی بر این مسئله دلالت دارند که واکنش ژنتیکی با القای ایمنی مناسب سد مناسبی در راه ورود و تکثیر ویروس ایجاد می نماید.

ویروس هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۱ عامل طیف وسیعی از بیماریها شامل عفونت ژنتال، عفونت‌های ناحیه صورت و دهان و عفونت‌های سیستم اعصاب مرکزی بحساب می آید. این ویروس نه تنها توانایی تولید عفونت اولیه را دارا می‌باشد بلکه قادر است در گانگلیون‌های عصبی نهفته شده و تحت شرایط خاصی دوباره فعال شود و ایجاد عفونت کند. مطالعات انجام شده نشان داده که یکبار آلودگی هم گاهی سبب عفونت نهفته و راجعه ویروس می‌شود. شدت و طول دوره بیشتر عفونت‌های علامت دار اولیه می‌تواند بوسیله شروع سریع درمان‌های ضد ویروسی کاهش یابد. مطالعات کلینیکی منتشر شده این مسئله را نشان داده‌اند که درمان‌های ضدویروسی بر روی نهفتگی و عفونت‌های راجعه بعدی بی‌تاثیر می‌باشند (۱).

هر چند گزارش‌هایی در مورد نهفتگی ویروس هرپس در اعضای مختلف وجود دارد ولی متداول ترین محل برای نهفتگی، گانگلیون‌های عصبی می باشد. عفونت قسمتهای مختلف سر و صورت منجر به نهفتگی در گانگلیون تری ژمینال می شود. ژنوم ویروس از سایر گانگلیونها نظیر گانگلیون دورسال و گانگلیون عقده ای عصب دهم جمجمه ای هم در انسان و هم در حیوان جدا شده است، اما میزان آن در مقایسه با گانگلیون تری ژمینال کمتر می باشد (۲). اهداف طراحی واکنش هرپس در مقایسه با واکنش سایر عوامل بیماریزا متفاوت می‌باشد زیرا نگرانی‌ها فقط محدود به پیشگیری از عفونت اولیه نمی‌باشد، بلکه پیش گیری از عفونت نهفته و کنترل عفونت‌های راجعه نیز حائز اهمیت می‌باشد (۳، ۴). DNA واکنش بعنوان یکی از روشهای موثر برای القای ایمنی در مطالعات مختلف معرفی شده است. در بین ژنهای کاندید ویروس هرپس، ژن گلیکوپروتئین D ویروس دارای بالاترین درجه القای ایمنی در مقایسه با سایر ژنها معرفی شده است (۵، ۶). در این مقاله، ما اقدام به مطالعه میزان نهفتگی بدنبال تزریق واکنش ژنتیکی و سپس چالش با ویروس وحشی در مدل موشی BALB/c کردیم.

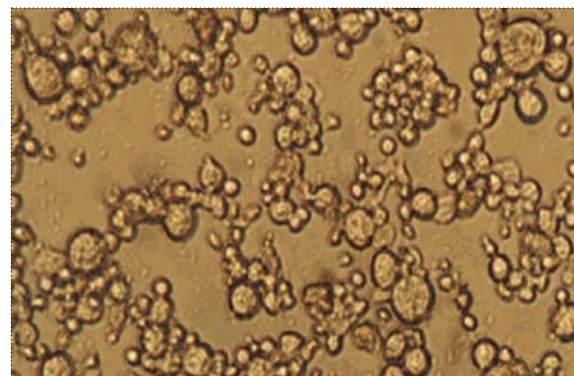
مواد و روش‌ها

در فاز نخست، پلاسمید pCDNA3.1 (Invitrogen) بیان‌کننده حاوی ژن گلیکوپروتئین gD-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ تحت پروموتور سیتومگالو ویروس تهیه گردید و با روش‌های هضم انزیمی، صحت ژن مورد نظر مورد تایید قرار گرفت. برای تهیه واکنش، پلاسمید حاوی ژن گلیکوپروتئین gD ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در ابتدا در میزبان باکتریایی E.coli DH5α مستعد شده (Competent) منتقل شدند. سپس هر یک از این پلاسمیدها در مقیاس زیاد توسط کیت‌های استخراج پلاسمید تهیه و تخلیص گردید. در فاز حیوانی مطالعه، موش‌های BALB/c حساس ۶-۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور



شماره ۲

تصویر ۲. نتایج حاصل از PCR بر روی نمونه های گانگلیون در موش های گروه pCDNA3: لاین شماره ۱ کنترل منفی و لاین ۳ DNA استاندارد ویروس و بقیه نمونه های گانگلیونی هستند که حاوی ژن TK بودند، همه موش های گروه pCDNA3 نتایج مثبت را نشان می دهند.



شماره ۱

تصویر ۱. نتیجه حاصل از تکثیر HSV-1 در سلولهای Vero

جدول ۱. نتایج PCR بر روی نمونه های استخراج شده از گانگلیون تری ژمینال و میزان مرگ و میر موشهای واکنش داده شده.

گروه	تعداد موش ها	میزان بقا بعد از ۲۸ روز	مثبت PCR موارد
pCDNA3 - gD-1	۱۰	۹	۵
HSV-1 KOS	۱۰	۱۰	۰
pCDNA3	۱۰	۳	۱۰
PBS	۱۰	۱	۱۰

شماره ۱

ژنتیکی و ویروس استاندارد در قیاس با کنترل های منفی مورد تایید قرار می دهد. با این وجود، بدلیل خطرات ناشی از استفاده ویروسهای زنده امکان بکارگیری چنین واکنشهایی بسیار محدود می باشد. بنابراین بنظر می رسد که ژن گلیکوپروتئین D ویروس که اصلی ترین گلیکوپروتئین ویروس بحساب می آید، کاندیدای مناسبی برای توسعه واکنشهایی باشد که در نهایت باعث کاهش نهفتگی ویروس می گردند. پس می توان انتظار داشت بکارگیری سیستم های واکنش موثرتر ضمن القای ایمنی مناسب تر و کارآتر در پیشگیری از نهفتگی ویروس هرپس می تواند نقش مهمی ایفا نماید.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده نقش محافظت کنندگی ژن گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در پیشگیری از نهفتگی ویروس در گانگلیون تری ژمینال می باشد. در مطالعات قبل، محققین قابلیت القای ایمنی این واکنش را مورد بررسی و تایید قرار داده بودند. بنابراین بنظر می رسد که بدلیل نقش القاکنندگی واکنش ژنتیکی حاوی ژن گلیکوپروتئین D ویروس در تحریک ایمنی، پاسخهای لازم در پیشگیری از نهفتگی ویروس حائز اهمیت باشند (۷-۹). از سویی دیگر مقایسه نتایج مرگ و میر در گروه های مختلف، اثرات معنی دار واکنش

منابع

1. Roizman B, Sears AE. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annul Rev Microbiol.* 1987; 41: 543-571.
2. Feldman LT, Ellison CC, Voytek L, Krause PY, Margolis TP. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 978-983.
3. Lin WR, Jennings R, Smith TL, Wozniak MA, Itzhaki RF. Vaccination prevents latent HSV-1 infection of mouse brain. *Neurobiol of Aging.* 2001; 2: 699-703.
4. Ramakrishan R, Fink DJ, Jiang G, Desai P, Glorioso JC, Levine M. Competitive quantitative PCR analysis of herpes simplex virus type 1 DNA and latency associated transcript RNA in latently infected cells of the rat brain. *J Virol.* 1994; 68: 1864-1873
5. Strasser JE, Arnold RL, Pachuk C, Higgins TJ, Bernstein DI. Herpes simplex virus DNA vaccine efficacy: effect of glycoprotein D plasmid constructs. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1304-1310.
6. Stanbery LR, Cunningham AL, Mindel A, Scott LL, Spruance SL, Aok FY. Prospect for control of herpes simplex virus diseases through immunization. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 549-599.
7. Manickan E, Rouse RJD, Yu Z, Wire WS, Rouse BT. Genetic immunization against herpes simplex virus: protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1995; 155: 259-265.
8. Frye TD, Chiou HC, Hull BE, Bigley NJ. The efficacy of a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein D in decreasing ocular disease severity following corneal HSV-1 challenge. *Arch Virol.* 2002; 147: 1747-1759.
9. Baghian A, Chouljeko VN, Dauvergne O, Newman MJ, Baghian S, Kousoulask G. Protective immunity against lethal HSV-1 challenges in mice by nucleic acid- Based immunization with herpes simplex virus-1 genes specifying glycoproteins gB and gD. *J Med Microbiol.* 2002; 51: 350-357.