Original Article

Evaluation of Bax Encoding Plasmid For Increasing Efficacy of DNA Vaccine Plasmid Encoding gB of Herpes Simplex Virus Type 1

M. Parsania, Ph.D.[1], Z. Mohammad Hassan, Ph.D.[2]*, T. Bamdad, Ph.D.[1], M. Kheirandish, Ph.D.[3], M. Nabi Sarbolouki, Ph.D.[4], M. Hassan Pouriayevali, M.Sc.[1], R. Dorostkar Sari, M.Sc.[1], M. Mahdavi, M.Sc.[2], A. Jamali, M.Sc.[1]

1. Virology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University
2. Immunology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University
3. Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center
4. Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran

** Corresponding Address: P.O.Box: 14115-111, Immunology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran*
Email: hasan_zm@modares.ac.ir,

Abstract

Received: 15/Dec/2007, Accepted: 10/Mar/2008

Objective: Evaluation of Bax encoding plasmid for increasing efficacy of DNA vaccine plasmid encoding gB of Herpes Simplex Virus type 1.

Materials and Methods: We compared three different dosages of Bax encoding plasmid (pcbax) including 10, 25 and 50 µg of plasmid DNA. They were co-injected ineradermally with glycoprotein B (gB) of herpes simplex virus (HSV)-1 encoded plasmid (pcgB) in C57BL/6 mice to elicit immune responses to protect against lethal HSV-1 challenge. Immune responses to the antigen were assessed by lymphocyte proliferative responses and cytokine (INF-γ and IL-4) release assays.

Results: The study demonstrates that the mice immunized with 25 µg pcbax together with pcgB have more efficient protection than the mice immunized with 10 and 50 µg of pcbax and pcgB. Analysing of cell-mediated responses show that the mice immunized with 25µg pcbax and pcgB induce stronger lymphocyte proliferative responses and higher levels of INF-γ and IL-4 compared to the mice are received 10 and 50 µg of pcbax and pcgB.

Conclusion: The data show that co-immunization with 25 µg of pcbax and pcgB increase immune responses compared to 10 and 50 µg of pcbax and pcgB. This can be considered a promising approach for development an efficient DNA vaccine against HSV-1 or other pathogens.

Keywords: Bax Protein, DNA Vaccine, gB Protein of Herpes Simplex Virus-1

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 93-100

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی تاثیر همراهی پلاسمید کد کننده Bax در افزایش کارایی DNA واکسن پلاسمید gB ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک

مسعود پارسانیا .Ph.D[1]، زهیر محمد حسن .Ph.D[2*]، طراوت بامداد .Ph.D[1]، مریم خیراندیش .Ph.D[3]، محمد نبی سربلوکی .Ph.D[4]، محمد حسن پوریای ولی .M.Sc[1]، روح الله درستکار ساری .M.Sc[1]، مهدی مهدوی .M.Sc[1]، عباس جمالی .M.Sc[1]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ویروس شناسی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
۳. مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴. دانشگاه تهران، انستیتو بیوشیمی و بیوفیزیک

آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: hasan_zm@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۹/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۲

* **هدف:** بررسی تاثیر همراهی پلاسمید کدکننده Bax در افزایش کارآیی DNA واکسن پلاسمید gB ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک

* **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ۳ دوز از پلاسمید کدکننده Bax (pcbax) شامل مقادیر ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم به همراه پلاسمید کدکننده ژن گلیکوپروتیین B (pcgB) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) به طریق داخل جلدی و به طور همزمان به موش‌های C57BL/6 تزریق شد تا افزایش پاسخ‌های ایمنی و حفاظت حیوانات فوق درمواجهه با ویروس کشنده HSV-1 بررسی شود. پاسخ‌های ایمنی نسبت به آنتی‌ژن فوق با روش‌های پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی و اندازه‌گیری سایتوکاین‌های INF-γ و IL-4 ترشح شده بررسی شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد موش‌هایی که ۲۵ میکروگرم pcbax را به همراه pcgB دریافت کرده بودند حفاظت موثرتری نسبت به موش‌هایی که ۵۰ میکروگرم pcbax را با pcgB دریافت کردند، نشان دادند. آنالیز پاسخ‌های ایمنی سلولی نیز نشان داد موش‌هایی که با ۲۵ میکروگرم pcbax و pcgB ایمونیزه شدند پاسخ‌های پرولیفراسیون لنفوسیتی قوی‌تری و نیز سطوح اینترفرون گاما (INF-γ) و اینترلوکین۴ (IL-4) بیشتری نسبت به موش‌هایی که ۱۰ و ۵۰ میکروگرم pcbax و pcgB دریافت کرده بودند، نشان می‌دهند.

* **نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهد ایمن‌زایی هم‌زمان pcgB و ۲۵ میکروگرم pcbax منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی نسبت به حالتی است که از ۱۰ و ۵۰ میکروگرم pcbax و pcgB استفاده شود. نتایج فوق می‌تواند امیدی در جهت دست‌یابی به روشی موثر در ارتقا بخشیدن به واکسن DNA علیه HSV-1 و یا سایر پاتوژن‌ها باشد.

کلیدواژگان: پروتئین Bax، واکسن DNA، پروتئین gB هرپس سیمپلکس نوع یک

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۱۰۰-۹۳

مقدمه

ایمنی‌زایی با واکسن‌های DNA، نوعی استراتژی در زمینه واکسن‌ها است که منجر به راه اندازی پاسخ‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن کدشده توسط پلاسمید، در سلول‌های بدن میزبان شده و نهایتا با القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی هومورال و سلولار می‌تواند منجر به محافظت میزبان علیه پاتوژن مربوطه گردد (۳-۱). تاکنون راهکارهای مختلفی جهت افزایش خاصیت ایمونوژنسیتی واکسن‌های DNA از جمله استفاده از ادجوانت‌های معمولی (۴، ۵) بهینه‌سازی بیان آنتی‌ژن و استفاده از سایتوکاین‌های مختلف و یا مولکول‌های محرک سیستم ایمنی به همراه واکسن، ارائه شده است (۸-۶).

مطالعات گوناگون در زمینه القای اثر آپوپتوزیس در سلول های ترانس فکت شده به همراه واکسن‌های DNA به افزایش عرضه آنتی‌ژن و القای پاسخ‌های اختصاصی ناشی از لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (Cytotoxic T lymphocytes: CTLs) منجر شده‌اند (۹، ۱۰).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند مرگ آپوپتوتیک سلول می‌تواند توسط مکانیسم‌های مختلفی صورت گیرد. نوع محصولات یا فاکتورهای آزاد شده از سلول آپوپتوز شده در چگونگی حذف سلول فوق توسط سیستم ایمنی موثر است. به عنوان مثال در سطح سلول‌های در حال مرگ مارکرهای CD36، CD14، CD91 ظاهر می‌شود. مارکرهای فوق توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen Presenting Cells: APCs) شناسایی و بدین طریق سلول‌های آپوپتوز شده، فاگوسیت و حذف می‌شوند. در صورتی که سلول آپوپتوز شده، محتوی آنتی‌ژن باشد، بعد از تخریب و هضم سلول‌های آپوپتوتیک فوق توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، سلول‌های فوق به ارگان‌های لنفاوی مهاجرت و آنتی‌ژن‌های فوق را به لنفوسیت‌های T CD8+ و T CD4+ عرضه می‌کنند و بدین ترتیب واکنش‌های سیستم ایمنی بر علیه آنتی‌ژن فوق راه اندازی می‌شود. مطالعات مختلفی در زمینه افزایش خاصیت ایمونوژنسیتی آنتی‌ژن و در زمینه به‌کارگیری القای آپوپتوز با واکسن‌های DNA وجود دارد (۱۱، ۱۲).

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) در تمام نقاط دنیا شایع است. بسیاری از عفونت‌های ناشی از این ویروس

Archive of SID
www.SID.ir

بدون علامت‌اند و قابل تشخیص نیستند. این ویروس می‌تواند اشکال بالینی مختلفی در انسان ایجاد کند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به تب‌خال، عفونت‌های مخاطی، هرپس نوزادان و آنسفالیت اشاره کرد.

به رغم تلاش‌های زیادی که در زمینه ساخت واکسن به جهت پیش‌گیری از عفونت با ویروس فوق صورت گرفته است، اما متاسفانه هنوز واکسن موثری وجود ندارد (۱۳، ۱۴). در بین پروتئین‌های ویروس، ۲ گلیکوپروتئین D و B (gB, gD) ویروس از مهمترین پروتئین‌هایی هستند که در زمینه تحقیقات واکسن علیه ویروس فوق مورد توجه قرار دارند. گزارش‌های متعددی حاکی از القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی هومورال و سلولار به دنبال ایمنی‌زایی با پلاسمیدهای بیان کننده پروتئین‌های فوق، وجود دارد (۱۴، ۱۵).

دندروزوم‌ها (Dendrosome) ترکیبات نانوپارتیکل جدیدی هستند که به عنوان ترابر ژن مطرح‌اند و در مطالعات از آنها برای انتقال پلاسمید به سلول‌های هدف استفاده شده است و نتایج به دست آمده از تحقیقات فوق نشان دهنده افزایش در بازدهی عمل ترانس فکشن و انتقال پلاسمید به سلول‌های هدف است (۱۶، ۱۷).

طی تحقیقاتی، در زمینه واکسن‌های DNA از پلاسمید کدکننده Bax به عنوان یک فاکتور پروآپوپتوتیک استفاده شده است و نشان داده شده که افزایش خاصیت ایمونوژنسیتی واکسن های فوق بستگی به مقدار پلاسمید کدکننده Bax دارد و پلاسمید فوق در دوز مشخص می‌تواند اثر ادجوانتی خود را اعمال کند (۱۱، ۱۸، ۱۹).

در تحقیق حاضر ۳ دوز از پلاسمید کدکننده Bax (۱۰، ۲۵، ۵۰ میکروگرم) به همراه پلاسمید کدکننده gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، در همراهی با دندروزوم به جهت افزایش پاسخ‌های ایمنی در موش‌های C57BL/6 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

سلول و ویروس‌ها

از سلول Vero جهت تکثیر ویروس‌ها استفاده شد. سلول‌های فوق در محیط (Dulbecco's Minimal Eagle Medium: DMEM) (GIBCO) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاو (GIBCO) کشت داده شدند.

از ویروس وحشی HSV-1، جدا شده از زخم تبخال یک بیمار، به منظور مواجهه (Challenge) حیوانات ایمونیزه شده استفاده شد. این ویروس توسط آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی HSV-1 تایید شده بود (۲۰). از HSV-1 سویه KOS که یک سویه غیربیماری‌زای ویروس است جهت ایمونیزه کردن موش‌های گروه کنترل مثبت استفاده شد. ویروس‌های فوق بعد از تکثیردر سلول‌های Vero تعیین تیتر و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

موش‌ها

موش‌های C57BL/6 نر با سن ۶ تا ۷ هفته از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و کارهای انجام شده بر روی حیوانات فوق مطابق با قوانین توصیه شده کار با حیوانات آزمایشگاهی بود.

پلاسمیدها

پلاسمید کدکننده gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (pcDNA3-gB) طی کار قبلی، توسط همکاران طرح تهیه شده بود (۲۱). پلاسمید کدکننده Bax (pcDNA3-Bax) به صورت اهدایی از جانب دکتر لیتنر (Wolfgarg W.Leitner) در اختیار قرار گرفت.

دندروزوم

دندروزوم (Den 123) که طی کار قبلی توسط همکاران طرح تهیه شده بود (۱۷)، در غلظت 10^{-4} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS تهیه و بعد از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۲۲ میکرون تا موقع استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی مخلوط پلاسمید و دندروزوم و ایمن‌زایی

۵۰ میکروگرم از پلاسمیدها قبل از تزریق به نسبت ۱:۱۵۰ پلاسمید به دندروزوم با هم مخلوط و ۱۵ دقیقه بعد از مخلوط سازی در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در PBS استریل به صورت داخل پوستی (Intradermal) در چهار ناحیه از پشت حیوان تزریق شد. ۱۰ تا ۱۳ موش در هر گروه مورد تزریق قرار گرفتند. گروه‌های مورد آزمایش به قرار زیر بودند:

گروه pgB: حیوانات این گروه ۵۰ میکروگرم pcDNA3-gB به همراه Den123 دریافت کردند.

گروه pgB-Bax10: حیوانات این گروه ۵۰ میکروگرم pcDNA3-gB و ۱۰ میکروگرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pgB-Bax25: حیوانات این گروه ۵۰ میکروگرم pcDNA3-gB و ۲۵ میکروگرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pgB-Bax50: حیوانات این گروه ۵۰ میکروگرم pcDNA3-gB و ۵۰ میکروگرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pBax: حیوانات این گروه ۵۰ میکرو گرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pcDNA3: حیوانات این گروه ۵۰ میکرو گرم پلاسمید pcDNA3 را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه Den: حیوانات این گروه مخلوط دندروزوم در PBS را به تنهایی دریافت کردند.

گروه PBS: حیوانات این گروه PBS تنها را دریافت کردند.

گروه KOS: حیوانات این گروه HSV-1 سویه KOS را با تیتر 1×10^{6} pfu (plaque Forming Unit) دریافت کردند.

تزریقات در سه مرحله و به فواصل دو هفته از یکدیگر به عمل آمد.

پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی

دو هفته بعد از آخرین تزریق به عمل آمده، به دنبال نخاعی کردن حیوانات مورد مطالعه، طحال آنها خارج شد و بعد از استخراج سلول‌های طحالی، سوسپانسیون سلولی فوق به منظور حذف گلبول‌های قرمز با بافر لیزکننده $Tris\text{-}NH_4Cl$ ۰/۷۵ درصد (pH:7.4) مجاور شد و پس از شست‌وشو با بافر (Phosphate-Buffered Saline: PBS) تعداد 2×10^{5} سلول در میلی‌لیتر (PBS) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای در محیط RPMI (SIGMA) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاو منتقل شد.

سپس به سلول‌های سه چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی moi 3 (Multiplicity of Infection) ویروس HSV-1 سویه

Archive of SID

www.SID.ir

KOS که با حرارت غیرفعال شده بود، اضافه شد. به سلول‌های سه چاهک که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بودند، مقدار ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر Phytohemagglutinin-A (PHA) (SIGMA) اضافه شد. آزمایش پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش 3- (4, 5-dimethylthiazal-2-yl)-2, 5d: phenyl-tetrazolium bromide (MTT)
طبق روش توضیح داده شده توسط زیاو و همکارانش (۲۲) انجام شد. شاخص تحریک (Stimulation Index: SI)، از تقسیم کردن OD قرائت شده از چاهک‌های حاوی سلول‌های تحریک شده با ویروس، بر OD قرائت شده از چاهک‌های حاوی سلول‌های بدون تحریک آنتی‌ژنیک به دست می‌آید.

ارزیابی سایتوکاین‌ها

بعد از استخراج سلول‌های طحالی از طحال حیوانات مورد مطالعه، به ترتیبی که در تست پرولیفراسیون لنفوسیتی توضیح داده شد، تعداد ۵ میلیون سلول طحالی، در حجم نهایی یک میلی‌لیتر محیط RPMI حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاو، تحریک شده با HSV-1 moi3 سویه KOS غیرفعال شده، به طور جداگانه در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت، مایع رویی کشت‌های سلولی جمع‌آوری و با استفاده از کیت الایزا آماده (R&D. Minneapolis, MN, USA) سایتوکاین‌های (Interferon-γ: INF-γ) و (Interleukin-4: IL-4) اندازه‌گیری شدند. با تعیین نسبت میانگین مقادیر INF-γ به IL-4 به طور جداگانه برای هر گروه، وضعیت جهت پاسخ ایمنی سلولی به سمت Th1 یا Th2 مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی مقاومت حیوانات در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1

دو هفته بعد از آخرین مرحله ایمنی‌زایی، به منظور ارزیابی مقاومت حیوانات ایمن شده، در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1، مقدار ۱×۱۰^{۶} سویه وحشی HSV-1 (حداقل دوزی از ویروس که ۱۰۰درصد درحیوانات غیرایمن خاصیت کشندگی دارد) به طریق داخل صفاقی به حیوانات گروه‌های مختلف تزریق شد و تا دو هفته بعد از تزریق، میزان مرگ و میر و بقای حیوانات فوق مورد بررسی قرار گرفت.

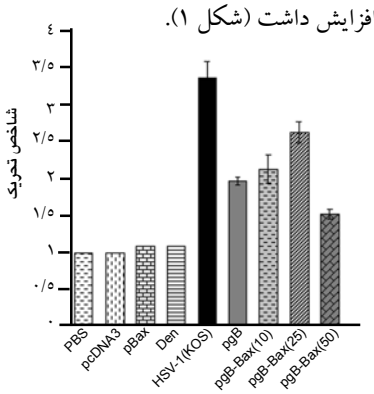
آنالیز آماری

آنالیز آماری ارزیابی پرولیفراسیون لنفوسیتی و سنجش سایتوکاین‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA Oneway) و با استفاده از تست Tukey انجام شد و ارزیابی مقاومت حیوانات در مواجهه با ویروس با آزمون Meier-Kaplan و با استفاده از تست log rank انجام گرفت. در تمام موارد، معنی‌دار بودن تست‌ها با ارزش (p<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی

به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی، پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی دو هفته بعد از آخرین مرحله ایمن‌زایی و به دنبال تحریک آنتی ژنیک در تمام حیوانات مورد مطالعه به انجام رسید. نتایج SI مربوط به تمام گروه‌هایی که پلاسمید pcDNA3-gB دریافت کرده بودند (pgB , pgB-Bax50 , pgB-Bax25 , pgB-Bax10) در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی (Den , pcDNA3 , pBax) به طور معنی‌داری افزایش داشت (شکل ۱).



شکل ۱: میانگین شاخص تحریک (SI) در آزمایش پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش MTT مربوط به گروه‌های مختلف مورد مطالعه

اگر چه پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی گروه pgB-Bax25 و pgB-Bax10 نسبت به گروه pgB افزایش نشان می‌دهد اما این اختلاف معنی‌دار نیست. برعکس پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی گروه pcDNA3-Bax50 به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax25 و pgB کمتر است.

بالاترین سطح پرولیفراسیون لنفوسیتی مربوط به سلول‌های طحالی موش‌های ایمونیزه شده با HSV-1 سویه KOS بود (p<۰/۰۰۱).

جدول ۱: میانگین مقادیر INF-γ و IL-4 آزاد شده در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی موش‌های مورد مطالعه در تمام گروه‌ها، به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک و میانگین نسبت INF-γ/IL-4

نام گروه	تعداد	میانگین INF -γ ±SD	میانگین IL-4±SD	میانگین INF -γ/IL-4
PBS	۵	۹/٦٦ ±۲ /۲	۱۳/۵۸ ± ۰/۹۹	۰/۷۱
pcDNA3	۵	۹/٦۳ ±۱ /۹٦	۱۲/۸ ± ۲/۳۸	۰/۷۵
pBax	۵	۱۱/۰۷ ±۲	۱۵/۳۸ ± ۲/۱	۰/۷۱
Den	۵	۹/٦۸ ±۱ /۷۸	۱۲/۱ ± ۳/۳٦	۰/۸
HSV-1(KOS)	۵	۹۱۷/٦۷ ±۵۱ /۷۷	۱۱۸/۳۸ ± ۱۰/۹٦	۷/۷۵
pgB	۵	۱۰٦/٤ ±۹ /۸٦	٤۵/۸٤ ± ٦/۰۷	۲/۳۲
pgB-Bax10	۵	۱۱۸/۸ ±۷ /۸۵	۵۵/٦ ± ۵/٦۸	۲/۱۳
pgB-Bax25	۵	۱۳۰±۷ /۹	۱۱٤/٤ ± ۸/۰۱	۱/۱۳
pgB-Bax50	۵	۷۰/٤ ±۷ /۳	٤۸/۳ ± ۵/٤۷	۱/٤۵

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی سایتوکاین‌ها

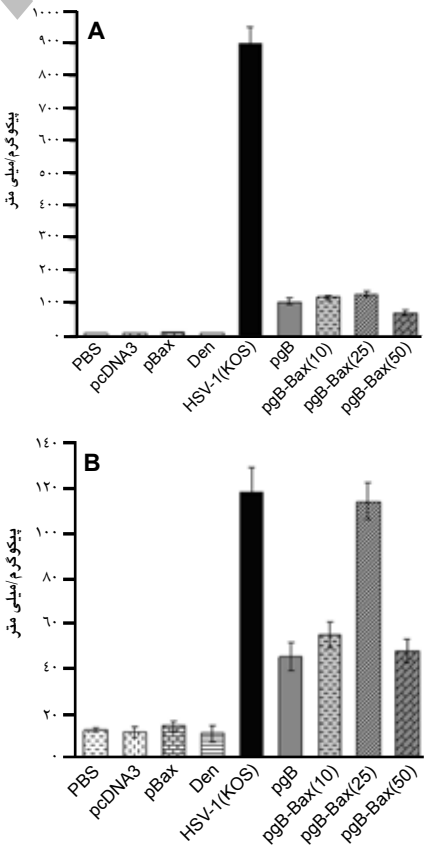
به منظور مشخص کردن جهت پاسخ ایمنی سلولی به سمت Th1 یا Th2 اندازه‌گیری INF-γ و IL-4 در مایع رویی حاصل از کشت سلول‌های طحالی حیوانات، بعد از تحریک آنتی‌ژنیک، به صورت، *In vitro* به عمل آمد.

سنجش سایتوکاین‌ها دو هفته بعد از آخرین مرحله ایمن‌زایی و به دنبال تحریک *In vitro* سلول‌های طحالی حیوانات مورد مطالعه، با ویروس غیرفعال شده HSV-1 سویه KOS به عمل آمد.

همان‌طور که در شکل ۲ و نتایج مندرج در جدول ۱ مشخص شده است تمام گروه‌های موشی که با پلاسمید حاوی gB مورد تزریق قرار گرفته بودند (pgB-Bax10، pgB-Bax25، pgB-Bax50) به طور معنی‌داری منجر به افزایش تولید INF-γ نسبت به گروه‌های کنترل منفی (Den, pcDNA3, Bax) شدند. مقدار INF-γ در موش‌های گروه pgB-Bax50 به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax25 و pgB بود و مقدار INF-γ مربوط به گروه pgB-Bax10 در مقایسه با گروه‌های pgB-Bax25 و pgB معنی‌دار نیست.

هیچ اختلاف معنی‌داری در سطح INF-γ بین حیوانات مربوط به گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax25 و pgB وجود نداشت. بالاترین سطح INF-γ مربوط به گروهی بود که HSV-1 سویه KOS را دریافت کرده بودند.

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است بالاترین سطح IL-4 مربوط به کشت سلول‌های طحالی حیوانات گروه pgB-Bax25 و مقدار آن در مقایسه با نتایج تمام گروه‌ها به طور معنی‌داری بالاتر است (p<۰/۰۰۱).



شکل۲: A) میانگین مقادیر INF-γ، B) میانگین مقادیر IL-4 آزاد شده در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی موش‌های مورد مطالعه در تمام گروه‌ها ،به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک

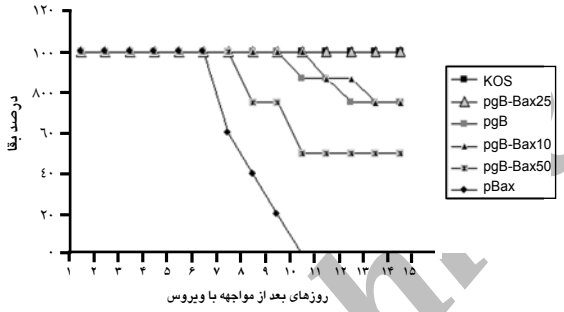
هیچ اختلاف معنی‌دار در سطح IL-4 بین حیوانات گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax50 و pgB وجود نداشت. مقدار IL-4 اندازه‌گیری شده مربوط به گروهی که HSV-1 سویه KOS را دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax50 و pgB افزایش نشان می‌دهد (به ترتیب p=۰/۰۰۱، p<۰/۰۰۱).

همان‌طور که در نتایج جدول ۱ مشخص شده است بالاترین نسبت بین میانگین مقادیر INF-γ به IL-4 مربوط به گروهی است که HSV-1 سویه KOS را دریافت کرده بودند و پایین‌ترین مقادیر نسبت فوق، مربوط به گروه‌های کنترل منفی است. در بین گروه‌هایی که پلاسمید gB را دریافت کرده بودند، بالاترین نسبت فوق مربوط به گروه pgB بود. از بین ۳ گروهی که پلاسمید کدکننده Bax را به همراه پلاسمید کدکننده gB دریافت کرده بودند، پاسخ ایمنی سلولی در گروه pgB-Bax25 به طور معنی‌داری نسبت به گروه pgB از Th1 به سمت Th2 تمایل نشان می‌دهد.

مقاومت حیوانات در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1

مقاومت تمام موش‌های مربوط به گروه‌های مختلف در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1، دو هفته بعد از آخرین ایمنی‌زایی و با تزریق ۱×۱۰^{۶} pfu ویروس وحشی HSV-1 به طریق داخل صفاقی طی ۱۴ روز، مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان بقای موش‌های حیوانات گروه‌های مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: نتایج بقای حیوانات ایمن شده بعد از مواجهه با ویروس وحشی هرپس سیمپلکس تیپ یک

موش‌های گروه‌های pgB-Bax25 و KOS در مواجهه با ویروس فوق ۱۰۰درصد زنده ماندند و درصد بقای حیوانات گروه‌های pgB-Bax10 و pgB مقدار ۸۰درصد بود. تمام موش های گروه‌های کنترل منفی مثل pcDNA3، PBS (که نتایج آنها نشان داده نشده است) همانند گروه pBax در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 کشته شدند.

مقاومت موش‌های گروه‌های pgB-Bax50 و pgB-Bax10 نسبت به موش‌های گروه pgB-Bax25 در مواجهه با ویروس فوق به طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد (p=۰/۰۲۵).

بحث

Bax یک فاکتور پروآپوپتوتیک و متعلق به خانواده Bcl-2 است. ترانس فکشن سلول‌ها با پلاسمید کدکننده Bax منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده، از طریق مسیر میتوکندریایی در سلول‌های فوق می‌شود (۱۸، ۱۹).

به طورکلی یکی از معایب واکسن‌های DNA امکان

Archive of SID
www.SID.ir

تـومـورزایـی آن بـه دنـبـال ملحق شـدن پلاسمید کدکننده آنتی‌ژن در کنار ژن‌های مربوط به پروتوانکوژن‌ها، در ژنوم سلول میزبان است (۲۵-۲۳). احتمال این مورد در حالتی که واکسن DNA به همراه پلاسمید کدکننده Bax استفاده شود، کمتر است، زیرا سلول‌های ترانس فکت شده با واکسن DNA چند روز بعد از بیان پروتئین Bax، از بین می‌روند (۲۲، ۲۵).

استفاده از پلاسمید کدکننده Bax به همراه واکسن‌های DNA می‌تواند منجر به افزایش خاصیت ایمونوژنسیتی واکسن‌های فوق گردد. طی تحقیقات مختلف تاثیر مرگ آپوپتوتیک سلول‌های ترانس فکت شده با واکسن‌های DNA کار شده و افزایش در القای پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده ناشی از اثر آن نیز نشان داده شده است (۱۱، ۱۲).

کینسی و هـمـکـارانـش در تحقیقی بـه طـور هـم‌زمـان، پلاسمید کدکننده پروتئین gp120 ویـروس عامل ایدز (Human Immunodeficiency Virus: HIV) و پلاسمید کدکننده Bax را به طـور تـوام و به طریق داخـل پوستی به موش‌های C57BL/6 تزریق کردند و افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال را نشان دادنـد. در تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که تزریق هم‌زمان پلاسمید کدکننده Bax و پلاسمید کدکننده gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک به روش تزریق داخل پوستی می‌تواند منجر به القای ایمنی حفاظت کننده موثر در موش C57BL/6 گردد. نتایج ما نشان می‌دهد سطح IL-4 تولید شده توسط سلول‌های طحالی حیوانات گروه pgB-Bax25 به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک بالاتر از گروه pgB است. اساریو و همکارانش نیز در مطالعه دیگری نشان دادند که IL-4 نقش مهمی در افزایش ایمنی حفاظت کننده علیه HSV-1 و مقاومت در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 دارد (۲۶).

در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که سلول‌های طحالی موش‌های گـروه pgB-Bax25 به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک افزایش معنی‌داری در تولید IL-4 نسبت به گروه pgB که DNA واکسن تنها را دریافت کرده بود، داشتند و از طرفی حیوانات فوق (pgB-Bax25) در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 مقاومت بیشتری نسبت به حیوانات گروه pgB نشان دادند.همانطوری که در بخش نتایج نیز اشاره شد، پاسخ ایمنی سلولی در گروه pgB-Bax25 نیز در مقایسه با گروه pgB به سمت Th2 تمایل دارد، یافته‌های فوق با یافته‌های نیمال و همکارانش که از لیگاند Fasبرای القای آپوپتوزیس در سلول‌های ترانس فکت شده با واکسنDNA استفاده کرده بودند، مطابقت دارد (۲۷).

علی‌رغم شواهد متعددی که طی پژوهش‌های مختلف به عمل آمده و نشان دهنده ارتباط معنی‌دار بین القای آپوپتوزیس و افـزایـش خاصیت ایمونوژنسیتی واکسـن DNA است (۲۳، ۲۷) بعضی از گـزارش‌ها حاکی از آن است که فعالیت ادجوانتی آپوپتوزیس می‌بایست بعد از اینکه آنتی‌ژن واکسن DNA در داخل سلول به میزان مناسب بیان شد، اعمال گردد. بدین ترتیب آنتی‌ژن بیان شده در حد مناسب در سلول ترانس فکت شده تجمع می‌یابد و سپس سلول فوق دچار آپوپتوزیس می‌شود و با فاگوسیت شدن سلول آپوپتوتیک فوق توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن و ارائه آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های CD_8^+ T و CD_4^+ منجر به راه‌اندازی پاسخ‌های سیستم ایمنی هومورال و سلولار قوی نسبت به آنتی‌ژن می‌گردد (۱۱، ۱۲).

به‌کارگیری پلاسمید کدکننده Bax در جهت افزایش پاسخ‌هـای سیستم ایمنی در واکسن‌هـای DNA تنها وقتی امکان‌پذیر است که دوز مناسبی از پلاسمید فوق استفاده شود (۱۱). در این مطالعه ما سه دوز ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم از پلاسمید کدکننده Bax را به طور هم‌زمان با ۵۰ میکروگرم پلاسمید کدکننده gB بـرای القای پاسخ‌های ایمنی حفاظت کننده به موش‌های مورد مطالعه، تزریق کردیم.

نتایج، نشان دهنده کاهش پاسخ ایمنی سلولی و حفاظت در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 در گروه‌های pgB-Bax10 و pgB-Bax50 نسبت به گروه pgB-Bax25 است. بر اساس مطالبی که اشاره شد این موضوع می تواند به علت آپوپتوز به میزان کمتر در گروه pgB-Bax10 و آپوپتوز به میزان بیشتر در گروه pgB-Bax50 باشد. در حالتی که ۲۵ میکروگرم پلاسمید کد کننده Bax به همراه واکسن DNA فوق استفاده شد، بیان آنتی‌ژن به میزان مناسب، قبل از تشکیل اجسام آپوپتوتیک صورت گرفته و نهایتا منجر به افزایش خاصیت ایمونوژنسیتی واکسن DNA شد.

در گـزارش‌هـای اخیر ساساکی و همکارانش نیز ثابت کرده‌اند که سلول‌های آپوپتوتیک محتوی آنتی‌ژن هماگلوتینین و نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا که با استفاده از ژن‌های موتانت کاسپاز دچار آپوپتوزیس شده بودند، پاسخ ایمنی قوی‌تری را نسبت به حالتی که از ژن‌های جهش نیافته استفاده شده، القاء می کنند (۲۳). آنها همچنین مشخص کردند که فعالیت ادجوانتی آپوپتوزیس باید به میزان محدود و مشخصی صورت گیرد. به طوری که کاسپازهایی که به طور نسبی غیرفعال بودند (کد شده توسط کاسپازهای موتانت) به پلاسمید کدکننده آنتی‌ژن فرصت مناسبی داده تا قبل از اینکه سلول وارد آپوپتوزیس شود، بیان مناسب آنتی‌ژن در آن صورت پذیرد (۲۸).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نیز همانند دیگر مطالعات مشخص شد وقتی از پلاسمید کدکننده Bax در همراهی با واکسن DNA استفاده می‌شود می‌بایست دوز مناسب پلاسمید فوق بهینه شود و از آنجایی‌که از سه دوز پلاسمید فوق استفاده شد لذا توصیه می‌شود که دوزهای دیگری از پلاسمید کدکننده ژن Bax در همراهی با پلاسمید کدکننده gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مورد ارزیابی قرار گیرد تا دوز مناسب برای افزایش بهینه پاسخ‌های ایمنی سلولار و هومورال اختصاصی علیه آنتی‌ژن فوق به دست آید.

تقدیر و تشکر

هزینه مطالعه حاضر از محل بودجه‌های تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است. مولفان این تحقیق از جناب دکتر لیتنر (Leitner.W Wolfgang) به جهت اهدای پلاسمید کدکننده Bax نهایت تشکر را دارند.

References

1. Lemieux P. Technological advances to increase immunogenicity of DNA vaccines. Expert Rev Vaccines 2002; 1: 85-93
2. Donnelly, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. Annu Rev Immunol 1997; 15: 617-648
3. Giese M. DNA-antiviral vaccine: new development and approaches a review. Virus Genes 1998; 17: 211-232

Archive of SID
www.SID.ir

4. Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Freidman A, Donelly JJ, McClements WL, et al. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum phosphate adjuvants. Vaccine 1999; 18: 18-28
5. Wang S, Liu X, Fisher K Smith JG, Chen F Tobery TW, et al. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminum phosphate. Vaccine 2000; 18: 1227-1235
6. Kim JJ, Trivedi NN, Nottingham LK, Morrison L, Tsai A, Hu Y, et al. Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. Eur J immunol 1998; 28: 1089-1103
7. Bower JF, Sanders KL, Ross TM. C3d enhances immune responses using low doses of DNA expressing the HIV-1 envelope from codon-optimized gene sequences. Curr HIV Res 2005; 3: 191-198
8. Nimal S, McCormick AL, Thomas MS, Heath AW.An interferon gamma gp120 fusion delivered as a DNA vaccine induces enhanced priming. Vaccine 2005; 23: 3984-3990
9. Rover P, Vallinoto C, Bondanza A, Corsti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnioli P, et al. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. J Immunol 1998; 161: 4467-4471
10. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature 1998; 392: 86-89
11. Bergmann-Leitner ES, Leitner WW Danger, death and DNA vaccines. Microbes Infect 2004; 6: 319-327
12. Leitner WW, Restifo NP. DNA vaccines and apoptosis: to kill or not to kill? J Clin Invest 2003; 112: 22-24
13. Bernstein DI, Stanberry LR. Herpes simplex virus vaccines. Vaccine 1999; 17: 1681-1689
14. Koelle DM, Corey L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. J Clin Microbiol 2003; 16: 96-113
15. Flo J, Beatriz Perez A, Tisminetzky S, Baralle F. Superiority of intramuscular route and full length glycoprotein D for DNA vaccination against herpes simplex 2. Enhancement of protection by the co-delivery of the GM-CSF gene. Vaccine 2000; 18: 3242-3253
16. Balenga NA, Zahedifard F, Weiss R, Sarbolouki MN, Thalhamer J, Rafati S. Protective efficiency of dendrosomes as novel nano-sized adjuvants for DNA vaccination against birch pollen allergy. J Biotechnol 2006; 124: 602-614
17. Sarbolouki MN, Sadeghizadeh M, Yaghoobi MM, Karami A, Lohrasbi T. Dendrosomes: A novel family of vehicles for transfection and therapy. J Chem Tech Biotech 2000; 75: 919-922
18. Kinsey BM, Marcelli M, Song L, Bhogal BS, Ittmann M, Orson FM. Enhancement of both cellular and humoral responses to genetic immunization by co-administration of an antigen-expressing plasmid and a plasmid encoding the pro-apoptotic protein Bax. J Gene Med 2004; 6: 445-454
19. Li X, Marani M, Mannucci R, Kinsey B, Andriani F, Nicoletti I, et al. Overexpression of BCL-X(L) underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. Cancer Res 2001; 61: 1699-1706
20. Soleimanjahi H, Roostaee MH, Rasaee MJ, Mahboodi F, Bamdad T. Immunogenecity and efficacy of baculovirus-derived glycoprotein D of herpes simples virus type-1 in mice. Arch Razi Ins 2003; 55: 19-28
21. Bamdad T, Roostaee MH, Sadeghizadeh M, Mahboudi F, Kazemnejad A, Soleimanjahi H. Immunogenicity and protective effect of a DNA construct encoding certain neutralizing epitopes of herpes simplex virus type-1 glycoprotein B.Folia Biol (Praha) 2005; 51: 109-113
22. Xiao S, Chen H, Fang L, Liu C, Zhang H, Jiang Y, et al. Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. Vaccine 2004; 22: 345-351
23. Sasaki S, Amara RR, Oran AE, Smith JM, Robinson HL. Apoptosis-mediated enhancement of DNA-raised immune responses by mutant caspases. Nat Biotechnol 2001; 19: 543-547
24. Robinson HL, Pertmer TM. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. Adv Virus Res 2000; 55: 1-74
25. Li X, Marani M, Yu J, Nan B, Roth JA, Kagawa S, et al. Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer. Cancer Res 2001; 61: 186-191
26. Osorio Y, Ghiasi H. Comparison of adjuvant efficacy of herpes simplex virus type 1 recombinant viruses expressing TH1 and TH2 cytokine genes.J Virol 2003; 77: 5774-5783
27. Nimal S, Thomas MS, Heath AW. Fusion of

Archive of SID

www.SID.ir

Robinson HL. Regulation of DNA-raised immune responses by cotransfected interferon regulatory factors. J Virol 2002;76: 6652-6659

antigen to Fas-ligand in a DNA vaccine enhances immunogenicity. Vaccine 2007; 25: 2306-2315
28. Sasaki S, Amara RR, Yeow WS, Pitha PM,

Archive of SID

www.SID.ir