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

سینا سلیمانی[۱و۲]
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 سرم سازی رازی، کرج، ایران.*

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر محمد قریب تلفن: ۶۱۱۱۷۰۰۰-۰۲۱
E-mail: omadadgar@ut.ac.ir

## چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۸ آنلاین: ۱۳۹٤/۰۲/۲۰

***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 پروتیین 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 ۱۳۹۳و بر روی موش‌های Balb/c انجام شد. پس از هم‌ردیفی توالی‌های Mx سه موتیف با بیش‌ترین همسانی بین گونه‌های انسان، موش و پرنده انتخاب شده و توانایی القای پاسخ‌های ایمنی آنها علیه ویروس آنفلوانزا در مطالعه in silico ارزیابی شد. بر اساس داده‌های ایمونوانفورماتیکی 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=۰/۰۵) 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=۰/۰۱). 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=۰/۰۰۱).

***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، پروتیین Mx، ایمن‌سازی.

Archive of SID

## مقدمه

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



www.SID.ir

عفونت‌های انسانی گاه همراه با تلفات زیاد را سبب شده‌اند.[۳] به‌دلیل 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.[۴و۵]

یاور که از کلمه لاتین Adjuvar به‌معنی "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.[۶و۷] 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.[۸و۹] سمیت و ایجاد اثرات جانبی در میزبان هدف مهمترین مشکل برای ارایه یک ماده به‌عنوان یاور در ایمن‌سازی علیه یک عامل بیماری‌زا است.[۱۰]

پروتیین‌های Mx، GTPase های نشانگر القای اینترفرون 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 پروتیین Mx در تعدادی از سلول‌ها برانگیخته می‌شود.[۱۱] این پروتیین 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 پروتیین و نوکلئوپروتیین ویروس است که سبب توقف فعالیت نسخه‌برداری از کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتیینی ویروسی (vRNP) و ورود ژنوم ویروس به هسته سلول میزبان می‌شود.[۱۳-۱۵] مکانیسم دقیق و چگونگی فعالیت ضد ویروسی پروتیین‌های Mx هنوز مورد بحث است زیرا این پروتیین‌ها 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]

به‌نظر می‌رسد جانمایی سلولی این پروتیین‌ها در هسته یا سیتوپلاسم تعیین‌کننده خواص ضد ویروسی آنها باشد. صرف‌نظر از توانایی احتمالی ضد ویروسی این پروتیین، یافته‌های حاصل از همسانی توالی Mx گونه‌های مختلف مهره‌داران نشان‌دهنده وجود مناطق بسیار حفظ شده در دامنه القا اینترفرون این پروتیین است که در تنظیم سامانه ایمنی نقش دارند.[۱۲] با توجه به خصوصیات و عملکرد پروتیین Mx، ایده استفاده از توالی رمزگذار آن به‌عنوان یاور زیستی برای نخستین‌بار 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 پروتیین Mx گونه‌های انسان با شماره رهگیری P20591 و F8W8T1، موش آزمایشگاهی (P09922 و E9Q0J3) و ۲۴ توالی مربوط به پرنده (Gallus gallus) از پایگاه داده Uniprot استخراج شد. پس از هم ردیفی، سه موتیف حفظ شده در دامنه القا اینترفرون این پروتیین با توالی‌های Mx2: $^{103}$VPDLT- ،Mx1: $^{13}$SGKSSVLEALSGVALPR$^{30}$ LIDLPGITRVAV$^{120}$ و Mx3: $^{152}$NVDIATTEALSMAQEVD$^{169}$ تعیین شدند. توالی پروتیین هماگلوتینین (HA) ویروس آنفلوانزا (A/Chicken/Iran SS7/2011) با شماره رهگیری JX456181 از پایگاه



Archive of SID

www.SID.ir

داده GenBank استخراج شد سپس هر یک از موتیف‌های Mx به‌طور جداگانه با رابط (EAAAK) به این توالی متصل شده و سازه‌های Mx/HA طراحی شدند. پروتیین HA القاکننده قوی سامانه ایمنی است و سطح بالایی از حفاظت در برابر آنفلوانزا ایجاد می‌کند. اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B با استفاده از نرم‌افزار Immune Epitope Database (IEDB) پیش‌گویی‌شده و جایگاه‌های آنتی‌ژنی توالی‌ها با الگوریتم Kolaskar و Tongaonkar بر اساس خصوصیات فیزیک و شیمیایی تعیین شدند. اپی‌توپ‌های سلول‌های T براساس اتصال به کمپلکس سازگار نسجی (Major histocompatibilty complex, MHC) کلاس I و برش پروتئازی انتهای کربنه با SYFPEITH پیش‌گویی شدند. برای اطلاع از تاخوردگی درست پپتیدهای Mx/HA طراحی شده، N–گلیکوزیله شدن توالی اسیدهای آمینه NXS/T (X هر اسید آمینه‌ای به‌جز پرولین) و O-(beta)-GlcNAc با استفاده از ExPASy ارزیابی شدند.

در مرحله دوم، توالی‌های نوکلئوتیدی Mx گونه‌های مختلف جانوران از پایگاه داده GenBank استخراج شده و پس از هم‌ردیفی، جفت آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن به گونه‌ای طراحی شدند تا دارای موتیف Mx1 باشند. براساس داده‌های ایمنوانفورماتیکی 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 آنزیم‌های محدود اثر در وکتور pcDNA3.1(+) (Invitrogen, USA)، آنزیم‌های *Nco*I و *Eco*RI (Takara, Japan) به‌ترتیب در ´۵ آغازگرهای رفت و برگشت قرار داده شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی F: CCATGGGATTGCGGTGATTGGCGA و R: GGGCAGCGGGTCACAATGGAATTC برای تکثیر قطعه Mx1 به‌طول 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 موردنظر در وکتور کلون شد.

برای تهیه واکسن غیرفعال، ویروس آنفلوانزا به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۰–۹ روزه تزریق‌شده و مایع آمینوآلانتوییک در شرایط استریل برداشت شد. آنتی‌ژن به‌دست‌آمده با فرمالین به نسبت یک در ۱۰۰۰ غیرفعال شده و پس از محاسبه دز آنتی‌ژن 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 سرم‌سازی 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) دسته‌بندی شدند.

در گام اول پس از سازگاری موش‌ها با محیط حیوان‌خانه، برای اطمینان از عدم وجود آنتی‌بادی علیه ویروس آنفلوانزا، سه روز پیش از شروع تزریق به‌طور تصادفی از موش‌ها خون‌گیری‌شده و عیار آنتی‌بادی در نمونه‌های سرم با آزمایش‌های ممانعت از آگلوتیناسیون (HI) و الایزا بررسی شد. گروه‌های 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 گروه‌بندی‌ها، تزریق در محل عضله چهار سر ران به‌میزان ۰/۱ ml انجام شد. در روز ۱٤ یادآور اول به موش‌های گروه تیمار تزریق شد. در روز ۲۸ موش‌های گروه D پس از خون‌گیری به‌طور تصادفی به دو گروه مساوی D1 و D2 تقسیم شدند و به گروه D2 یادآور دوم تزریق شد. عیار آنتی‌بادی در نمونه‌های سرم گرفته‌شده در فواصل دو هفته‌ای تا پایان دوره آزمایش بررسی شد. پیش از هر نوبت خون‌گیری موش‌ها توزین می‌شدند. موارد اخلاقی نگه‌داری موش‌ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به‌هنگام خون‌گیری و واکسیناسیون به‌طور کامل رعایت شد.

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



Archive of SID
www.SID.ir

حجمی) به همه گودهها اضافه شد. پس از مخلوط کردن و قرار دادن میکروپلیت به‌مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه، رسوب و توده‌ای شدن گلبول‌های قرمز بررسی شد. عکس رقت آخرین گوده مشاهده شده در HI، به‌عنوان 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 ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. پردازش آماری با استفاده از آزمون One-way ANOVA و با SPSS software, version 11 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) صورت گرفت. پیشینه 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 Tangaonkar و Kolaskar میانگین احتمال آنتی‌ژنی برای Mx1 برابر با ۱/۲۴۱ (شکل ۱) و برای Mx2 و Mx3 برابر با ۰/۸۶٤ در مقایسه 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–گلیکوزیله در موقعیت اسیدهای آمینه ۱۳۹ و ۱٤۸ و دو جایگاه O-(beta)-GlcNAc در موقعیت اسیدهای آمینه ۲٤ و ۱۰۱ تعیین شدند.

میانگین عیار آنتی‌بادی نمونه‌های سرم موش‌های کنترل و تیمار 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

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

| توالی اسید آمینه | جایگاه آغاز | جایگاه پایان |
|---|---|---|
| SSVLEALSGVALPRE | ٤ | ۱۸ |
| PLMAILLVVTT | ۲۷ | ۳۷ |
| DKICIGH | ٤۱ | ٤۷ |
| TNVPTHAKELLHT | ٦۲ | ۷۵ |
| EMLCATN | ۷۹ | ۸۵ |
| RPLILDTC | ۸۸ | ۹۵ |
| YGNPSCDLLLG | ۱۱۲ | ۱۰۲ |
| SYIVERS | ۱۱۷ | ۱۲۳ |
| VNGTCYPG | ۱۲٦ | ۱۳۳ |
| LRTLFSSSSSYQRIQIFPD | ۱٤۱ | ۱۵۹ |
| SKSCSDS | ۱۷۰ | ۱۷٦ |
| GLYPIQDA | ۱۸۹ | ۱۹٦ |
| DILFVWGIHHPP | ۲۰۵ | ۲۱٦ |
| KPLIGPRPLVNGL | ۲٤٤ | ۲۵٦ |
| YYWSILKPG | ۲٦۲ | ۲۷۰ |
| IAPWYGHVLSG | ۲۸۲ | ۲۹۲ |
| GNCWQCQPE | ۳۰٦ | ۳۱۵ |
| STLPFHNISKFAFGICPKYIGVKSLKLAIGLRNVPAK | ۳۲۱ | ۳۵۷ |
| LFGAIAGP | ۳٦۲ | ۳٦۹ |
| PGLVAGW | ۳۷۵ | ۳۸۱ |
| QKAVDKITSKVNTI | ٤۰۲ | ٤۱۵ |
| YEIIDH | ٤۲۳ | ٤۲۸ |
| IQDVWAYNAELLVLLE | ٤٤۵ | ٤٦۳ |
| LYNKVKRA | ٤۷۸ | ٤۸۵ |
| CFELYHKCDDQ | ٤۹۷ | ۵۰۷ |
| IEGVKLE | ۵۳۳ | ۵۳۹ |
| YKILTIYSTVASSLVLAIGFAAFLFW | ۵٤٤ | ۵٦۹ |

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

Archive of SID



www.SID.ir

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

| Mx1 | جایگاه | Mx2 | جایگاه | Mx3 | جایگاه |
|---|---|---|---|---|---|
| KLAIGLRNV | ۳٤٦ | KLAIGLRNV | ۳٤٦ | KLAIGLRNV | ۳٤٦ |
| VLLENQKTL | ٤٦۰ | VLLENQKTL | ٤٦۰ | VLLENQKTL | ٤٦۰ |
| SVLEALSGV | ۵ | SVLEALSGV | ۲٦۵ | SVLEALSGV | ۲٦۵ |
| SVLEALSGV | ۲٦۵ | LIAPWYGHV | ۲۸۱ | LIAPWYGHV | ۲۸۱ |
| LIAPWYGHV | ۲۸۱ | YIGVKSLKL | ۳۳۹ | YIGVKSLKL | ۳۳۹ |
| YIGVKSLKL | ۳۳۹ | FIEGGWPGL | ۳٦۹ | FIEGGWPGL | ۳٦۹ |
| FIEGGWPGL | ۳٦۹ | KITSKVNTI | ٤۰۷ | KITSKVNTI | ٤۰۷ |
| KITSKVNTI | ٤۰۷ | KIDDQIQDV | ٤٤۳ | KIDDQIQDV | ٤٤۳ |
| KIDDQIQDV | ٤٤۳ | TLDEHDANV | ٤٦۷ | TLDEHDANV | ٤٦۷ |
| TLDEHDANV | ٤٦۷ | | | | |

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

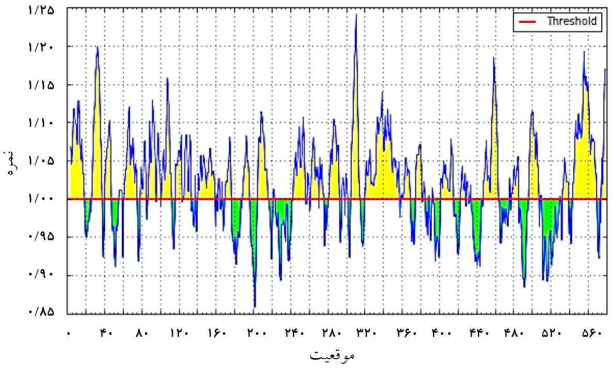
**جدول ۳: میانگین عیار آنتی‌بادی علیه آنفلوانزا در نمونه‌های سرم موش‌های کنترل و تیمار شده با آنتی‌ژن غیرفعال آنفلوانزا و یاور Mx1**

| گروه | | سه روز پیش از | روزهای پس از تزریق | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | نخستین تزریق | ۷ | ۱٤ (یادآور اول) | ۲۸ (یادآور دوم) | ٤۲ | ۵٦ | ۷۰ |
| A (بدون تزریق) | HI±SD | ۰/۱۹±۰/۷۳ | ۰/۲۳±۰/۷۱ | ۰/۱۸±۰/۸٦ | ۰/۲۱±۰/۷۳ | ۰/۲۲±۰/۷۷ | ۰/۲۲±۰/۷۱ | ۰/۲۵±۰/۹۱ |
| | ELISA±SD | ۸۵/۲۲±۳۱۱ | ۳۲۱±۸٦/۵۹ | ۸۵/۱۷±۳۲۹ | ۷۷/٦۱±۳۲۹ | ۷٦/۵۷±۳۳۲ | ٦۹/۸۸±۳۳۵ | ۷۷/٤۳±۳۳۱ |
| B (تزریق یاور) | HI±SD | ۰/۲۲±۰/۷۲ | ۰/۲۱±۰/۷۸ | ۰/۲۷±۰/۸۳ | ۰/۲۳±۰/۷۹ | ۰/۲۳±۰/۸۵ | ۰/۲٦±۰/۹۳ | ۰/۲۲±۱/۰٤ |
| | ELISA±SD | ۸۷/٦۷±۳۱۵ | ۳۱۹±۸۵/۱۳ | ۷۹/٦۱±۳۱۹ | ۸٤/٦٦±۳۳۳ | ۸۷/۱۷±۳۳۰ | ۸٦/٦۳±۳۳۵ | ۷۹/۲٤±۳۳۵ |
| C (تزریق واکسن) | HI±SD | ۰/۲۱±۰/۸۱ | ۰/۲٦±۲/۲۳* | ۰/٤۲±٤/۲۸** | ۰/٤۲±٤/۷٦** | ۰/٤۲±۵/۱۲** | ۰/٤۲±۵/۲۳** | ۰/٤۲±۵/۳۹** |
| | ELISA±SD | ۷۹/٤۳±۳۲۱ | ۷٦۵±۸۳/٦۱ | ۱۰۱/۳٤±۲۸۳٤** | ۱۱۸/۳۹±۳٦۸۹** | ۱۳٤/۳۲±٤٦۵٦** | ۱٤۱/۲٦±٤۸۱۷** | ۱۳۹/۷٦±٤۹۲۹** |
| D1 (تزریق توام با یک یادآور) | HI±SD | ۰/۲۳±۰/۷۸ | ۰/۲۷±۳/۳۸* | ۰/٤۲±۵/۳۵** | ۰/٤۲±٦/۲۱*** | ۰/٤۲±٦/۵۳*** | ۰/٤۲±٦/۵۳*** | ۰/٤۲±٦/٦۱*** |
| | ELISA±SD | ۷۸/۱۹±۳۱۳ | ۱۱۱۲±۸۹/٦۷* | ۱٤٦/٤۷±۳۵٤۷** | ۱۵۱/۵٦±٤۲۳۱** | ۱۵۳/۱٦±۵۵۲۸*** | ۱۷۳/٦۸±۵۹۳۷*** | ۱۷۷/٤۹±٦۰۳۹*** |
| D2 (تزریق توام با دو یادآور) | HI±SD | ۰/۱۸±۰/۷۸ | ۰/۲۵±۳/۱۲* | ۰/٤۲±۵/٤۰** | ۰/٤۲±٦/۳۳*** | ۰/٤۲±٦/۷۸*** | ۰/٤۲±٦/۸۱*** | ۰/٤۲±٦/۹۳*** |
| | ELISA±SD | ۸۱/۲۰±۳۳٤ | ۱۲۳٤±۹۳/۵۸* | ۱٤۳/۵٦±۳٤۹۸** | ۱۵۰/۳۹±٤۳٤٦** | ۱۵۵/۵٤±٦۱۱۷*** | ۱۷۹/٤۳±٦۳۳۷*** | ۱۸۱/۳۳±٦۵۱۷*** |

نتایج به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار گزارش شده و P=۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد (* P=۰/۰۵، ** P=۰/۰۱، *** P=۰/۰۰۱).



Archive of SID
www.SID.ir




**شکل ۱: پیش‌گویی خاصیت آنتی‌ژنیسیته Mx1/HA با استفاده از الگوریتم Kolaskar-Tongaonkar.** میانگین بیش‌از 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=۰/۰۰۱). میانگین وزن موش‌ها در تمامی گروه‌های کنترل و تیمار تفاوتی نداشت (P>۰/۰۵) و در بازه زمانی آزمایش از میانگین g ۲۱ به g ۳۷ 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.[۱۸و۱۹] 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 گسترده‌ای در انسان و پرندگان دارد شامل رشد و تکثیر بذر ویروس آنفلوانزا (در تخم‌مرغ 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]

پروتیین‌های Mx، GTP آزهای بزرگ نشانگر القای اینترفرون هستند و با توجه به عملکردشان در تنظیم سامانه ایمنی،[۱۲] در این تحقیق ایده استفاده از پروتیین 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 اینترفرون پروتیین Mx که بیش‌ترین همسانی و حفظ شدگی بین سه گونه انسان، موش و پرنده 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. گلیکوپروتیین 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 پروتیین‌های ویروس است. پروتئاز میزبان این مولکول را به زیرواحدهای $HA_1$ و $HA_2$ دارای مکان‌های اتصال و اپی‌توپ‌هایی که هدف اولیه آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده هستند، تبدیل کرده و در نتیجه آنتی‌بادی علیه این پروتیین عفونت ویروس را به‌طور کامل حذف و 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


www.SID.ir
Archive of SID

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 آنتی‌ژنی با هم متفاوت است. این جایگاه‌ها بیش‌تر در اطراف ناحیه آنتی‌ژنی سر کروی مولکول $HA_1$ قرار دارند. در ویروس‌های H9N2 تعداد هفت جایگاه N–گلیکوزیله در ژن HA مشخص شده که دو تای آنها در زیرواحد $HA_2$ قرار دارند.[۲۳] در اصلاحات پس از ترجمه سازه طراحی شده تعداد و موقعیت جایگاه N–گلیکوزیله تفاوتی با ویروس‌های ثبت شده نداشت. داده‌های ایمنوانفورماتیکی 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 فعال‌کنندگی سامانه ایمنی ذاتی الیگونوکلئوتیدهای CpG غیرمتیله در توالی DNA وکتور pcDNA3.1(+) برای طراحی یاور زیستی Mx استفاده شد تا اثر فزاینده‌ای 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 پلاسماسیتویید 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.[۲۴] این پروتیین نشانگر تمایز میلوییدی و یک سازگار کننده درون سلولی است که نقش مهمی در تنظیم سامانه ایمنی ذاتی دارد.[۲۵]

فعال شدن مسیر MyD88 سبب فعال شدن IRF3 و در نهایت فاکتور رونویسی NF-κB می‌شود. این فاکتور از ژن‌های سامانه ایمنی مانند اینترفرون γ 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.[۲۶و۲۷] نتایج آزمایش‌های سرولوژی حاصل از تجویز آنتی‌ژن غیرفعال آنفلوانزا و یاور Mx1 نشان داد میانگین عیار آنتی‌بادی علیه ویروس آنفلوانزا در موش‌های ایمن‌شده با واکسن دارای یاور بیش‌تر از موش‌های کنترلی است که واکسن را به‌تنهایی دریافت کرده‌اند. افزایش عیار در گروه تیمار D2Mx1 که دو بار یادآور دریافت کرده بودند بیش از گروه تیمار D1Mx1 با یک نوبت تزریق یادآور بود. بدین‌ترتیب یاور Mx1 سبب القای پاسخ ایمنی هومورال 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 آنتی‌بادی 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.[۶و۲۹] 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.[۳۰] 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 هومورال 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 الیگونوکلئوتید تنظیم‌کننده سامانه ایمنی بوده و با تحریک آنتی‌بادی در تغییر مسیر ایمنی به‌سمت پاسخ‌های اینترفرونی 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



Archive of SID
www.SID.ir

عدم سمیت یک ترکیب و تحمل آن توسط دریافت‌کننده واکسن، مهمترین مساله برای معرفی آن به‌عنوان یاور است.[۱۰]

در این مطالعه یاور Mx1 سبب القا ایمنی هومورال اختصاصی و افزایش عیار آنتی‌بادی علیه ویروس آنفلوانزا در گروه‌های موش تحت آزمایش شد بدون آنکه هیچ‌گونه واکنش‌های موضعی و عمومی در بازرسی‌های روزانه مشاهده شود. وزن‌گیری طبیعی موش‌ها و عدم بروز واکنش‌های التهابی ناخواسته موضعی و اثرات جانبی در طول دوره آزمایش، همچنین نتایج حاصل از آزمایش هیستوپاتولوژی بیانگر این هستند که یاور Mx1 اثر سویی بر روی حیوان ندارد. این ترکیب در بافت‌های میزبان بیان می‌شود و چون برای بدن بیگانه نیست برخلاف بسیاری از یاورهای غیرزیستی سبب بروز حساسیت و واکنش‌های شدید سیستمیک، شوک آنافیلاکسی، سمیت شیمیایی برای بافت‌های بدن و واکنش‌های متقاطع با آنتی‌ژن‌های بافتی 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 بخشی‌از 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

1. Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 2006;12(6):881-6.
2. 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.
3. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A (H7N9) virus in China. *N Engl J Med* 2014;370(6):520-32.
4. 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.
5. 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.
6. Wang W, Singh M. Selection of adjuvants for enhanced vaccine potency. *World J Vaccine* 2011;1(2):33.
7. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004;82(5):488-96.
8. Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 2010;22(3):411-6.
9. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 2009;21(1):23-9.
10. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted. *Vaccine* 2001;19(17-19):2673-80.
11. 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.
12. Haller O, Staeheli P, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 2007;89(6-7):812-8.
13. Haller O, Staeheli P, Kochs G. Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev Sci Tech* 2009;28(1):219-31.
14. 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.
15. Dittmann J, Stertz S, Grimm D, Steel J, García-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.
16. Zimmermann P, Mänz B, Haller O, Schwemmle M, Kochs G. The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses. *J Virol* 2011;85(16):8133-40.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Hilleringmann M, Jobst B, Baudner BC. Influenza cell-culture vaccine production. *Mol Vaccines* 2014;823-37.
21. Zhang H, Wang L, Compans RW, Wang B-Z. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses* 2014;6(5):1974-91.
22. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 2014;14(5):315-28.
23. 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.
24. Shahsavandi S, Ebrahimi MM, editors. Influenza. Tehran: Jehade Daneshgahi; 2012. [Persian]



www.SID.ir

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.

Archive of SID



www.SID.ir

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal

*Tehran University Medical Journal, June 2015; Vol. 73, No. 3: 192-201* *Original Article*

# Mx bio adjuvant for enhancing immune responses against influenza virus

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.*

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

## Abstract

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

***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.

Archive of SID



www.SID.ir