تحقیقی

اثر عصاره آبی بخش هوایی گیاه اکیناسه پورپوره‌آ (سرخارگل) بر ایمنی‌زایی واکسن ژنی حامل ژن M2 ویروس انفلوآنزا

فاطمه روستا[۱]، دکتر فاطمه فتوحی*[۲]، دکتر امیر قائمی[۳]، بهناز حیدرچی[۴]، دکتر وحیده مظاهری[۵]، مریم فاضلی[۶]، علی ترابی[۷]، محسن غفاری[۱]

۱- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران. ۲- استادیار گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات انفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران. ۳- استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ۴-کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات انفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران. ۵- پزشک عمومی ، آزمایشگاه تحقیقات انفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران. ۶- دانشجوی دکتری تخصصی ویروس‌شناسی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس. ۷- کارشناس علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه تحقیقات انفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *تغییرات مداوم آنتی‌ژنتیکی در ویروس انفلوآنزا، هرسال موجب ایجاد نگرانی‌هایی در تولید واکسن می‌گردد. آنتی‌ژن‌های حفاظت شده به‌دلیل آن که نیاز به تطبیق سویه‌های طراحی شده برای واکسن با سویه‌های در حال گردش ندارند؛ انتخاب مناسبی برای واکسن هستند. ژن M2 در میان ویروس‌های انفلوآنزا حفاظت شده است و این پتانسیل را دارد که به عنوان یک واکسن جهانی در نظر گرفته شود. این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره آبی بخش هوایی گیاه اکیناسه پورپوره آ (سرخارگل) بر ایمنی‌زایی واکسن ژنتیکی حامل ژن M2 ویروس انفلوآنزا انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه مداخله‌ای روی موش‌های ماده ۸-۶ هفته‌ای نژاد BALB/c با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم انجام شد. پلاسمید کدکننده ژن M2 ویروس انفلوآنزا سویه A/New Caledonia/20/99 (H1N1) پس از انتقال به باکتری E.coli top10 f' و کشت در محیط لورین برتانی مایع، در مقیاس انبوه تخلیص شد و غلظت آن با روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری گردید. ۴۰ سر موش در ۸ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه‌های واکسن، ویروس انفلوآنزای غیرفعال شده (PR8) و یا واکسن ژنی (pcDNA-M2) را به تنهایی یا همراه با عصاره دریافت کردند. به گروه‌های کنترل، پلاسمید خالی (pcDNA)، عصاره اکیناسه و یا بافر فسفات تزریق شد. پلاسمید و ویروس غیرفعال شده درون ماهیچه‌ای و عصاره گیاه اکیناسه درون صفاقی تزریق گردید. واکسیناسیون در سه دوره با فاصله ۱۵روز انجام شد. از همه حیوانات قبل از ایمن‌سازی و ۲۱ روز بعد از آخرین واکسیناسیون خونگیری به‌عمل آمد و آنتی‌بادی اختصاصی M2 با روش الایزای غیرمستقیم اندازه‌گیری گردید. سپس موش‌ها تحت بیهوشی و از طریق بینی با ویروس انفلوآنزا PR8 سازگار شده با موش آلوده شدند و به مدت سه هفته برای ارزیابی کارایی واکسن، از نظر کاهش میزان مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و آزمون One-way ANOVA و Kaplan–Meier test تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها : *بیشترین پاسخ ایمنی اختصاصی در گروه دریافت کننده ویروس غیرفعال و عصاره اکیناسه مشاهده شد. تفاوت مشاهده شده در پاسخ ایمنی اختصاصی در گروه‌هایی که واکسن ژنی را دریافت کرده بودند؛ در مقایسه با گروه‌های کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به‌علاوه پاسخ ایمنی اختصاصی در گروهی که واکسن ژنی را همراه با عصاره دریافت کرده بودند؛ نسبت به گروهی که فقط واکسن ژنی به آنها تزریق شده بود؛ تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). همچنین بیشترین درصد بقا در موش‌هایی دیده شد که ویروس کامل غیرفعال و یا واکسن ژنی همراه با عصاره اکیناسه به آنها تزریق شده بود.*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که سازه ژنی کدکننده پروتئین M2 قابلیت القاء ایمنی علیه ویروس انفلوآنزا را داراست و می‌تواند موش‌های واکسینه شده را در مقابل چالش کشنده با ویروس PR8 محافظت نماید. به‌علاوه کاربرد عصاره آبی بخش هوایی گیاه اکیناسه همراه با واکسن، منجر به افزایش کارایی واکسن ژنی M2 در القاء ایمنی و حفاظت بخشی در مدل حیوانی می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *واکسن ژنی ، عصاره اکیناسه پورپوره‌آ ، انفلوآنزا ، ژن M2*

* نویسنده مسؤول : دکتر فاطمه فتوحی ، پست الکترونیکی fotouhi@pasteur.ac.ir

نشانی : تهران، خیابان جمهوری، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، شماره ۳۵۸، کدپستی ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، تلفن و نمابر ۶۶۴۹۶۵۱۷-۰۲۱

وصول مقاله : ۹۰/۵/۱۶ ، اصلاح نهایی : ۹۰/۹/۱۳ ، پذیرش مقاله : ۹۰/۹/۱۳

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ویروس انفلوآنزا یک پاتوژن جهانی و مهم در گونه‌های مختلف مثل پرندگان، پستانداران و انسان است. واکسن‌های انفلوآنزا که به‌صورت تجاری برای انسان، اسب و خوک استفاده می‌شوند؛ عموماً واکسن‌های ویروس کامل غیرفعال شده هستند (۱). واکسن‌های غیرفعال از ویروسی که در تخم مرغ تکثیر یافته؛ تهیه می‌شوند. با وجود کاهش بروز و شدت علائم بالینی در اثر استفاده از این واکسن‌ها، حفاظت کاملی در مقابل عفونت ایجاد نمی‌گردد (۲).

واکسن‌های ژنی نسل نوینی از واکسن‌ها هستند که در قیاس با واکسن‌های نسل قبل دارای مزایایی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به توانایی تحریک هر دو سیستم ایمنی سلولار و همورال، پایداری ساختارهای DNA و عدم نیاز به زنجیره سرد برای نگهداری اشاره کرد. همچنین استفاده از این نوع واکسن‌ها از ایجاد واکنش‌های آلرژیک در قیاس با واکسن‌هایی که در تخم‌مرغ تولید می‌شوند؛ جلوگیری می‌کند (۳). یکی از واکسن‌های جایگزین که می‌تواند به برخی از این مشکلات غلبه کند؛ واکسن‌های اسیدنوکلئیکی است که آنتی‌ژن‌های حفاظت شده ویروس را کددهی می‌کند. قطعه هفتم ژنوم ویروس انفلوآنزا دو پروتئین بسیار حفاظت شده ماتریکس (M1) و کانال یونی (M2) را رمزدهی می‌کند. ژن M2 بین تمامی تحت تیپ‌های ویروس انفلوآنزای نوع A مشترک است. به‌همین دلیل این ژن می‌تواند انتخاب مناسبی برای طراحی یک واکسن دائمی باشد. مطالعات نشان داده است که پروتئین M2 توانایی ایجاد پاسخ ایمنی حفاظتی نسبی بر ضد سویه‌های مختلف ویروس انفلوآنزای نوع A را دارا است. در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری در جهت افزایش کارایی ایمنی‌زایی پروتئین M2 صورت گرفته است (۴).

به دلیل پائین بودن قدرت ایمنی‌زایی واکسن‌های طراحی شده برای انفلوآنزا کاربرد ادجوانت‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. ایده کاربرد ادجوانت‌ها در تقویت ایمنی‌زایی واکسن‌ها به سال‌ها قبل برمی‌گردد. از بین ادجوانت‌ها تاکنون آلوم در ساختار چندین واکسن استفاده شده است. کاربرد ادجوانت آلوم در ساختار واکسن انفلوآنزا تنها به‌طور اندکی ایمنی‌زایی را افزایش داده است. از این رو کاربرد آلوم برای واکسن انفلوآنزا مفید نبوده است (۵).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به طب سنتی در راستای پیشگیری یا درمان بیماری‌ها معطوف گردیده است. اکیناسه پورپوره آ (*Echinacea purpurea*) (سرخار گل) گیاهی چند ساله است و به خانواده گل ستاره (Asteraceae) که بر طبق فارماکوپه‌های معتبر به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند شناخته شده است؛ تعلق دارد (۶). اثر ادجوانتی عصاره سرخار گل در مطالعات متعددی مورد تایید قرار گرفته است (۹-۷). در مطالعه‌ای افزایش اینترفرون گاما IFN-γ و عامل نکروزدهنده تومور TNF به‌صورت ex vivo به‌عنوان تایید‌کننده افزایش فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی درنظر گرفته شد (۱۰و۱۱). تا به امروز مطالعه‌ای در زمینه اثر این گیاه بر واکسن‌های ژنی انفلوآنزا منتشر نشده است. این مطالعه به منظور ارزیابی اثر عصاره آبی بخش هوایی گیاه سرخار گل بر ایمنی‌زایی واکسن ژنی حامل ژن M2 ویروس انفلوآنزا انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه مداخله‌ای روی موش‌های کوچک آزمایشگاهی ۸-۶ هفته‌ای ماده نژاد BALB/C با وزن تقریبی ۳۰۰ گرم در انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۸۹ انجام شد. حیوانات از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و قبل از شروع مطالعه به مدت یک هفته در حیوانخانه در شرایط ۱۲ ساعت نور - تاریکی نگهداری شدند (۴). پروتکل اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

از ویروس انفلوآنزای A/ PR/8 /34 سازگار شده با موش استفاده گردید. سلول‌های MDCK در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰درصد FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)، پنی‌سیلین ۱۰۰U/ml و استرپتومایسین ۱۰۰ µl/ml (Sigma- Aldrish, St. Louis, Mo, USA) کشت داده شد. سپس ویروس به آن تلقیح گردید (۴).

عصاره آبی بخش هوایی گیاه اکیناسه پورپوره‌آ با غلظت ۲۰ mg/ml از شرکت دارویی زربند (E.PC04-L002-82) (۱۲) تهیه شد.

واکسن ژنی مورد استفاده وکتور pCDNA3 حامل ژن M2 بود که توسط اسقایی و همکاران در واحد انفلوآنزای انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود. وکتور فوق و همچنین وکتور پایه فاقد ژن (pcDNA3) به باکتری E.coli top 10 f' منتقل و از کشت شبانه باکتری‌ها به روش لیز قلیایی تهیه و خالص‌سازی شدند (۱۳).

به‌منظور تعیین عیار عفونت‌زایی ویروس ($TCID_{50}$)، رقت‌های لگاریتمی ویروس A/PR8 (H1N1) (10^{-1} تا 10^{-8}) در محیط کشت فاقد سرم تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به یاخته‌های تک‌لایه‌ای MDCK در پلیت ۹۶ خانه‌ای تلقیح شد. پس از بروز آثار آسیب سلولی (CPE) در ۱۰۰درصد از یاخته‌های نمونه شاهد که مقدار ۲۵میکرولیتر ویروس رقیق نشده به آنها تلقیح شده بود؛ میزان بروز CPE در چاهک‌ها ثبت گردید. به‌دلیل آن که CPE در مورد ویروس انفلوآنزا به خوبی قابل مشاهده نیست؛ برای تایید وجود ویروس از روش هماگلوتیناسیون استفاده شد. صد میکرولیتر از محیط هر چاهک از رقت‌های مختلف مورد استفاده ویروس به پلیت HA منتقل ومطابق‌روش‌استاندارد،تست‌هماگلوتیناسیون‌انجام‌شد(۱۴).

برای تعیین دوز مرگ‌آور ویروس PR8 در موش‌ها و ارزیابی

www.SID.ir

کارایی واکسن در چالش با ویروس وحشی به روش زیر عمل شد.

۱۲ سر موش هشت هفته‌ای ماده در ۴ گروه ۳ تایی تقسیم شدند و به هر کدام ۲۰λ کتامین و ۵λ زایلازین داخل صفاقی تزریق گردید و موش‌ها نیمه هوشیار شدند. سپس به هر کدام λ ۵۰ ویروس (۲۵λ در هر حفره بینی) با رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} تلقیح شد. سپس موش‌ها به مدت ۱۰ روز در زیر هود نگهداری و هر روز از نظر بروز آثار بیماری‌زایی و یا مرگ و میر بررسی شدند (۱۴).

برای واکسیناسیون، ۴۰ سر موش ماده در شرایط استاندارد از نظر دما، نور، غذا و آب نگهداری شدند و به صورت تصادفی در ۸ گروه ۵ تایی در قفس‌های جداگانه قرار گرفتند (۴).

گروه اول (M2): موش‌های دریافت کننده pcDNA-M2

گروه دوم (M2+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده pcDNA-M2+Echinacea

گروه سوم (pcDNA): موش‌های دریافت کننده pcDNA

گروه چهارم (pcDNA+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده pcDNA+ Echinacea

گروه پنجم (PR8): موش‌های دریافت کننده PR8

گروه ششم (PR8+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده PR8+ Echinacea

گروه هفتم (PBS): موش‌های دریافت کننده PBS

گروه هشتم (Echinacea): موش‌های دریافت کننده Echinacea

تزریق اول در زمان صفر و دو تزریق یادآور به فاصله دو هفته از یکدیگر انجام شد (۴). برحسب گروه‌های مورد آزمایش، ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمیدهای تخلیص شده به صورت درون عضله‌ای تزریق شد (۱۵). در گروه‌های دریافت کننده عصاره، میزان ۱۰۰ میکروگرم عصاره گیاه اکیناسه به ازای هر حیوان به صورت درون صفاقی تزریق شد (۱۲). در گروه‌هایی که با ویروس غیرفعال ایمن شدند؛ میزان $TCID_{50}$ 1 از ویروس غیرفعال شده انفلوآنزا درون عضله‌ای به هر حیوان تزریق شد (۱۶).

برای بررسی ایمنی‌زایی واکسن ژنی، 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 موش‌ها و با پیپت پاستور انجام شد.

برای اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی‌های ضد M2 در گروه‌های مورد مطالعه از روش الایزا استفاده شد. برای این کار از پپتید M2e که واجد ۲۳ اسیدآمینه خارج سلولی پروتئین M2 است؛ استفاده گردید (۱۷). محلول یک میکروگرم در میلی‌لیتر پپتید فوق در بافرفسفات در هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شد و به مدت یک شب در یخچال نگهداری گردید. به منظور پوشاندن فضاهای خالی از بافر فسفات حاوی Skim milk یک درصد استفاده شد. سرم گروه‌های مختلف مورد مطالعه با رقت ۱ به ۲۰ و آنتی‌بادی موشی نشاندار شده با آنزیم پراکسیداز با رقت ۱ به ۵۰۰۰ به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه مورد استفاده قرار گرفت. در تمام مراحل از بافرفسفات واجد توئین ۲۰ برای شستشو استفاده شد. در مرحله نهایی سوبسترای TMB اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. سپس موش‌ها در گروه‌های مختلف مورد آزمایش با LD_{50} 1 از ویروس A/PR8/(H1N1) از طریق بینی تلقیح شدند و به مدت سه هفته در حیوانخانه و در زیر هود آزمایشگاهی سطح دو ایمنی نگهداری شدند و میزان مرگ و میر در گروه‌های مورد مطالعه ثبت گردید (۱۷).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 وآزمون One-way ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. همچنین درصد بقا در گروه‌های مورد مطالعه پس از چالش با ویروس PR8 با استفاده از Kaplan–Meier test مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

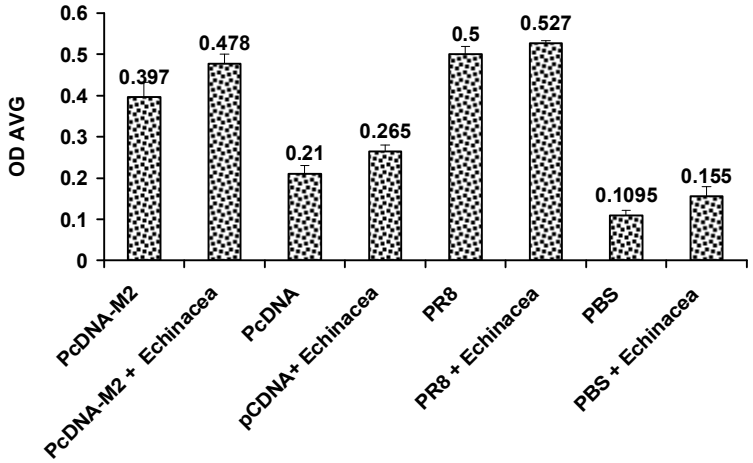
با استفاده از فرمول کربر عیار ویروس PR8 مورد استفاده در کشت سلول ($TCID_{50}$) و همچنین دوز کشنده ویروس (LD_{50}) معادل $10^{4/25}$ واحد در میلی‌لیتر تعیین گردید.

به منظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی، آنتی‌بادی‌های اختصاصی M2 در گروه‌های مورد مطالعه به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر در نمودار یک آورده شده است. بیشترین پاسخ ایمنی در گروه دریافت کننده ویروس غیرفعال و عصاره آبی گیاه سرخار گل (PR8+Echinacea) مشاهده شد. اگرچه تفاوت این گروه با حیواناتی که فقط PR8 دریافت کرده بودند؛ معنی دار نبود اما تفاوت‌های مشاهده شده در آن، با تمام گروه‌های کنترل معنی‌دار بود ($P<0/05$). همچنین تفاوت مشاهده شده در پاسخ ایمنی اختصاصی در گروه‌های M2 و M2+ Echinacea در مقایسه با گروه‌های کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/001$). به‌علاوه پاسخ ایمنی اختصاصی در گروهی که واکسن ژنی را همراه با عصاره (M2+ Echinacea) دریافت کرده بودند؛ نسبت به گروه M2 تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/001$) که نشان داد عصاره توانسته اثر ضد ویروسی واکسن را افزایش دهد.

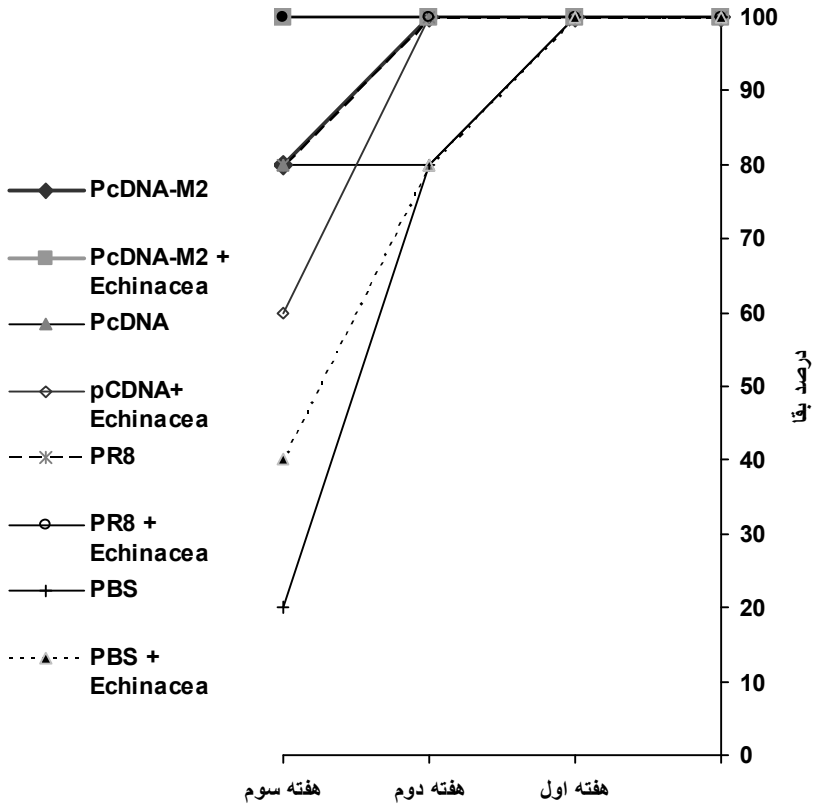
به منظور بررسی کارایی واکسن ژنی در حفظ بقای حیوانات، دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون موش‌ها با یک دوز کشنده ویروس PR8 تلقیح گردیدند. مقایسه میزان مرگ و میر آنها در نمودار ۲ آمده است. بیشترین درصد بقا در موش‌هایی دیده شد که ویروس کامل غیرفعال و یا واکسن ژنی را همراه با عصاره اکیناسه (PcDNA-M2 + Echinacea و PR8 + Echinacea) دریافت کرده

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: مقایسه میزان جذب نوری در گروه‌های مختلف دریافت کننده واکسن
گروه اول (M2): موش‌های دریافت کننده pcDNA-M2 ؛ گروه دوم (M2+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده pcDNA-M2+Echinacea ؛ گروه سوم (pcDNA): موش‌های دریافت کننده pcDNA
گروه چهارم (pcDNA+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده pcDNA+ Echinacea
گروه پنجم (PR8): موش‌های دریافت کننده PR8 ؛ گروه ششم (PR8+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده PR8+ Echinacea ؛ گروه هفتم (PBS): موش‌های دریافت کننده PBS
گروه هشتم (Echinacea): موش‌های دریافت کننده Echinacea



نمودار ۲: میزان بقای موش‌های واکسینه شده بعد از چالش در گروه‌های مختلف برحسب هفته
گروه اول (M2): موش‌های دریافت کننده pcDNA-M2 ؛ گروه دوم (M2+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده pcDNA-M2+Echinacea ؛ گروه سوم (pcDNA): موش‌های دریافت کننده pcDNA
گروه چهارم (pcDNA+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده pcDNA+ Echinacea
گروه پنجم (PR8): موش‌های دریافت کننده PR8 ؛ گروه ششم (PR8+ Echinacea): موش‌های دریافت کننده PR8+ Echinacea ؛ گروه هفتم (PBS): موش‌های دریافت کننده PBS
گروه هشتم (Echinacea): موش‌های دریافت کننده Echinacea

www.SID.ir

بودند. به طوری که تمام موش‌های این دو گروه در پایان هفته سوم زنده و سالم بودند. گرچه تفاوت ملاحظه شده در درصد بقا بین این دو گروه با سایر گروه‌های واکسن (PcDNA-M2 و PR8) با استفاده از تست کاپلان مایر معنی‌دار نبود؛ اما در مقایسه با گروه‌های کنترل (PcDNA، pCDNA+ Echinacea ، PBS ، PBS + Echinacea) به‌طور معنی‌داری از درصد بقای بالاتری برخوردار بودند ($P<۰/۰۵$).

بحث

بیماری انفلوآنزا سالیانه ۱۰درصد یا به عبارت دیگر ۵۰۰ میلیون نفر از جمعیت جهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۸). علاوه بر شیوع فصلی، پاندمی‌های جدید از جمله پاندمی A/H_1N_1 سال ۲۰۰۹ گهگاه ظهور کرده و با سرعت بسیار زیاد در میان افراد سرایت می‌یابد. به دلیل اپیدمی‌های هرساله و خطر بروز پاندمی، دستیابی به یک واکسن کارا از دیرباز مورد توجه محققان بوده است (۱۹). استفاده از واکسن غیرفعال انفلوآنزا با وجود مزیت‌هایی نظیر بی‌خطر بودن مصرف، به دلیل ایجاد پاسخ ضعیف در جمعیت‌های درمعرض خطر مانند نوزادان و سالمندان و نیاز به تغییرات هر ساله در آن، محققان را بر آن داشته است که به‌دنبال واکسن کارآمدتری باشند که نیاز به تغییر نداشته و بتواند ایمنی متقاطع قابل قبولی را در مقابل سویه‌های مختلف ویروس به‌وجود آورد. از این رو توجه پژوهشگران به واکسن‌های ژنی که پروتئین‌های حفاظت شده ویروس را کددهی می‌کنند؛ معطوف شده است. ایمنی‌زایی با DNA حاوی ایمنوژن‌ها می‌تواند در ایجاد پاسخ ایمنی مناسب و طولانی مدت مؤثر باشد (۲۰). پروتئین کانال یونی (M2) که توسط قطعه هفتم ژنوم ویروس انفلوآنزا رمزدهی می‌شود؛ از جمله پروتئین‌های بسیار حفاظت شده این ویروس است و به عنوان کاندید واکسن واحد انفلوآنزا نام برده می‌شود. آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه پروتئین کانال یونی می‌تواند تکثیر ویروس را در کشت سلولی کاهش دهد. همچنین تزریق آنتی‌بادی فوق به مدل حیوانی، باعث حفاظت آنها در برابر سویه‌های مختلف ویروس می‌گردد (۲۱). از طرف دیگر در عفونت طبیعی میزان آنتی‌بادی‌های ویژه کانال یونی از سطح بالایی برخوردار نیست؛ پس راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی علیه این ژن ویروسی می‌تواند به حفاظت میزبان در برابر ویروس‌های انفلوآنزا موجود و نیز ویروس‌های نوپدید منجر شود. تا به امروز انواع مختلف واکسن براساس ساختار این ژن ساخته شده است و از ادجوانت‌های متعددی برای افزایش پاسخ‌های ایمنی استفاده شده است (۲۲).

در این مطالعه ساختار پلاسمیدی که واجد ژن M2 بود؛ به عنوان واکسن ژنی بر ضد ویروس انفلوآنزا به‌کار گرفته شد و ایمن‌زایی با ژن کدکننده این پروتئین توانست باعث القای کارآمد سیستم ایمنی شده و مدل حیوانی را در برابر بیماری انفلوآنزا محافظت نماید.

از طرف دیگر، اخیراً گیاهان دارویی که خاصیت ایمنی‌بخشی دارند و می‌توانند ایمنی سلولار و هومورال را در مقابل پاتوژن‌ها افزایش دهند؛ مورد توجه قرار گرفته‌اند. عصاره اکیناسه پورپوره‌آ برای جلوگیری و درمان عفونت‌های ویروسی مختلف در حیوانات و انسان استفاده شده است (۸). Barrett در سال ۲۰۰۳ نشان داد که عصاره اکیناسه در محیط in vitro از تکثیر ویروس‌های ایجادکننده عفونت در بخش فوقانی دستگاه تنفسی جلوگیری می‌نماید (۲۳).

در مطالعه قائمی و همکاران (۱۲) نقش عصاره اکیناسه به عنوان محرک ایمنی در کاهش شدت بیماری چشمی حاد ناشی از HSV-1 در مدل موشی نشان داده شد. همچنین نقش عصاره اکیناسه در جلوگیری از نهفته شدن ویروس HSV-1 در گانگلیون عصبی موش بررسی شد و نتایج نشان دادکه عصاره اکیناسه از نظر کاهش عفونت‌زایی، کاهش دوره نهفتگی ویروس و افزایش ایمنی‌زایی موثر است. همچنین در مطالعه Chen و همکاران (۲۴) استفاده از یک عصاره گیاهی همراه با واکسن ژنی روی ویروس Foot-and-Mouth Disease (FMD) موثر بود و اثر واکسن ژنی را در ایجاد پاسخ ایمنی افزایش داد. میزان آنتی‌بادی اختصاصی ویروس FMD در گروهی که واکسن را همراه با عصاره دریافت کرده بودند؛ نسبت به گروه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری وجود داشت که نشان داد عصاره توانسته اثر ضد ویروسی واکسن را افزایش دهد.

مقاله حاضر اولین گزارش از اثر عصاره اکیناسه بر کارایی واکسن‌های ژنی انفلوآنزا است. عصاره اکیناسه می‌تواند فعالیت سیتوتوکسیک سلول‌های کشنده طبیعی را افزایش دهد. تیمار لکوسیت‌های دارای هسته چندشکلی با اکیناسه سبب افزایش تحرک تصادفی و مهاجرت آنها به سمت عامل کموتاکتیک در محیط کشت می‌گردد. همچنین عصاره فوق یا ترکیبات مشتق از آن اثرات مستقیمی روی ماکروفاژها دارد. به طوری که منجر به بیان واسطه‌های پیش‌التهابی و عوامل ضدمیکروبی توسط آنها می‌گردد (۷و۸). بدین ترتیب مصرف همزمان عصاره و واکسن ژنی باعث همراهی پاسخ‌های التهابی و اختصاصی علیه ویروس انفلوآنزا شده و لذا کارآیی واکسن را افزایش می‌دهد. البته این موضوع نیاز به بررسی‌های بیشتر برای مطالعه اثربخشی عصاره گیاهی روی سایر واکسن‌های ژنی دارد که در مطالعات آتی در دست انجام است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سازه ژنی کدکننده پروتئین M2 قابلیت القاء ایمنی علیه ویروس انفلوآنزا را داراست و می‌تواند موش‌های واکسینه شده را در مقابل چالش با ویروس PR8 محافظت نماید. به علاوه کاربرد عصاره آبی بخش هوایی گیاه اکیناسه همراه

Archive of SID
www.SID.ir

با واکسن، منجر به افزایش کارایی واکسن ژنی M2 در القاء ایمنی و حفاظت بخشی در مدل حیوانی می‌گردد. لذا می‌تواند به عنوان یک ادجوانت مناسب در مطالعات آتی در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم فاطمه روستا برای اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی از دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود. بدین‌وسیله از خانم‌ها تینا بلوریه و منصوره طباطبائیان، کارشناسان محترم بخش کشت سلولی آزمایشگاه تحقیقات انفلوآنزا انستیتو پاستور ایران و سایر همکاران گرامی آن واحد سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalla AM. Principle of virology. 2nd. Washington DC: ASM Press. 2003; pp:1655-9.

2. Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. Emerg Infect Dis. 2002 Aug;8(8):796-801.

3. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Influenza report 2006. Cagliari: Flying Publisher. 2006; pp:129-31.

4. Rao SS, Kong WP, Wei CJ, Van Hoeven N, Gorres JP, Nason M, et al. Comparative efficacy of hemagglutinin, nucleoprotein, and matrix 2 protein gene-based vaccination against H5N1 influenza in mouse and ferret. PLoS One. 2010 Mar;5(3):e9812.

5. 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 Jan;305(1):192-200.

6. Mazza G, Cottrell T. Volatile components of roots, stems, leaves, and flowers of Echinacea species. J Agric Food Chem. 1999 Aug;47(8):3081-5.

7. Luettig B, Steinmüller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea. J Natl Cancer Inst. 1989 May;81(9):669-75.

8. Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. Echinacea stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats. J Nutr Biochem. 2002 Aug;13(8):487.

9. Goel V, Chang C, Slama JV, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu TK. Alkylamides of Echinacea purpurea stimulate alveolar macrophage function in normal rats. Int Immunopharmacol. 2002 Feb; 2(2-3):381-7.

10. See DM, Broumand N, Sahl L, Tilles JG. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. Immunopharmacology. 1997 Jan;35(3):229-35.

11. Burger RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Int J Immunopharmacol. 1997 Jul;19(7):371-9.

12. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Gill P, Arefian E, Soudi S, Hassan ZM. Prophylactic effects of Echinacea purpurea polysaccharide against lethal ocular herpes simplex virus type I. Saudi Med J. 2008 Aug;29(8):1204-6.

13. Esghaei M, Monavari SH, Tavassoti-Kheiri M, Shamsi-Shahrabadi M, Heydarchi B, Farahmand B, et al. Expression of the influenza M2 protein in three different eukaryotic cell lines. J Virol Methods. 2012 Jan;179(1):161-5.

14. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Epidemiol. 1938; 27(3):493-7.

15. Ilyinskii PO, Gambaryan AS, Meriin AB, Gabai V, Kartashov A, Thoidis G, et al. Inhibition of Influenza M2-Induced Cell Death Alleviates Its Negative Contribution to Vaccination Efficiency. PLoS ONE. 2008; 3(1): e1417.

16. Weber TP, Stilianakis NI. Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: a critical review. J Infect. 2008 Nov;57(5):361-73.

17. Jimenez GS, Planchon R, Wei Q, Rusalov D, Geall A, Enas J, et al. Vaxfectin-formulated influenza DNA vaccines encoding NP and M2 viral proteins protect mice against lethal viral challenge. Hum Vaccin. 2007 Sep-Oct;3(5):157-64.

18. Neumann G, Chen H, Gao GF, Shu Y, Kawaoka Y. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. Cell Research. 2010;20:51-61.

19. Nguyen-Van-Tam JS, Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. Vaccine. 2003 May; 21(16):1762-8.

20. Lambert LC, Fauci AS. Influenza vaccines for the future. N Engl J Med. 2010 Nov; 363:2036-44.

21. Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Jul;78(7): 4170-4.

22. Wang W, Chen H, Tan WJ, Deng Y, Wang M, Liu Y, et al. [DNA vaccination via in vivo electroporation can elicit specific immune response against highly pathogenic H5N1 influenza viral structural antigens in mice]. Bing Du Xue Bao. 2010 May; 26(3):170-5. [Article in Chinese]

23. Barrett B. Medicinal properties of Echinacea: a critical review. Phytomedicine. 2003 Jan;10(1):66-86.

24. Chen YS, Hung YC, Lin WH, Huang GS. Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. Nanotechnology. 2010 May;21(19):195101.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Paper

Effects of aqueous *Echinacea purpurea* extract on immunogenicity of DNA vaccine encoding M2 gene of Influenza virus

**Rousta F (MSc)[1], Fotouhi F (PhD)*[2], Ghaemi A (PhD)[3], Heidarchi B (MSc)[4]
Mazaheri V (MD)[5], Fazeli M (MSc)[6], Torabi A (BSc)[7], Ghaffari M (MSc)[1]**

[1]MSc of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Virology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. [4]MSc of Microbiology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. [5]MD, MPH, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. [6]PhD Candidate in Virology, Department of Medical Virology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. [7]BSc of Laboratory Science, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Continuous antigenic variation of Influenza *a* viruses causes a major concern to develop Influenza vaccine. Conserved antigens are suitable candidates for vaccine production due to its non-requirement to match the designed strains with circulating strains. The M2 gene is conserved among Influenza *a* viruses and has potential to be considered as a universal vaccine. This study was designed to evaluate the effects of aqueous *Echinacea purpurea* extract on immunogenicity of DNA vaccine encoding M2 gene of Influenza virus.

Materials and Methods: This interventional study was carried out on female BALB/c mice with 3-4 week age (250-300 gr). Plasmid DNA encoding M2 gene (pcDNA-M2) of Influenza virus A/New Caledonia/20/99 (H1N1) was transformed into *E.coli* top10 f' and cultured in LB broth media. Large scale plasmid preparation was done and the concentration was measured by spectrophotometric method. Mice were divided into eight groups and immunized three times with fifteen days apart. Vaccine groups received inactivated Influenza virus or pcDNA-M2, alone or in combination with Echinacea extract. Control groups were injected pcDNA, Echinacea extract, and phosphate buffer. All animals were left to bleed before immunization and at 21 days after the last vaccination and specific anti-M2 antibodies were measured by indirect ELISA. Then the mice were intranasally challenged under an aesthesia with mouse-adapted PR8 Influenza virus and monitored for 3 weeks to evaluate the vaccine regimen efficacy in reduction of mortality rate compared to control groups. Data were analyzed using SPSS-16, One-way ANOVA and Kaplan–Meier tests.

Results: The highest specific immune response was obtained in mice received inactivated virus plus extract ($P<0.05$). Immune responses in mice inoculated with pcDNA-M2 were significantly higher compared to all control groups mice ($P<0.05$). In addition the specific immune responses in group inoculated with pcDNA-M2 and aqueous extract was higher compared to the group receiving only pcDNA-M2 ($P<0.001$). The highest survival rate was observed in mice injected with inactivated virus or pcDNA-M2 plus extract.

Conclusion: This study showed that pcDNA-M2 induced specific immunity and protected mice against lethal challenge with PR8 Influenza virus. Furthermore, application of Echinacea extract with M2 gene vaccine increased vaccine efficacy.

Keywords: DNA vaccine, *Echinacea purpurea* extract, Influenza, M2 gene of Influenza virus

*** Corresponding Author: Fotouhi F (PhD), E-mail: fotouhi@pasteur.ac.ir**

Received 7 Aug 2011 **Revised** 4 Dec 2011 **Accepted** 4 Dec 2011

This paper should be cited as: Rousta F, Fotouhi F, Ghaemi A, Heidarchi B, Mazaheri V, Fazeli M, Torabi A, Ghaffari M. [Effects of aqueous *Echinacea purpurea* extract on immunogenicity of DNA vaccine encoding M2 gene of Influenza virus]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 14(4):82-88. [Article in Persian]

Archive of SID
www.SID.ir