ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):133-141

Investigation of Immunization of DNA-Based Polyepitop HIV Vaccine Candidate in Mouse Model and the Impact of Alum Adjuvant and Subcutaneous Infusion on its Efficiency

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Jazaeri EO.[1] *MSc*,
Mahdavi A.*[1] *PhD*,
Abdoli A.[2] *PhD*

How to cite this article
Jazaeri EO, Mahdavi A, Abdoli A. Investigation of Immunization of DNA-Based Polyepitop HIV Vaccine Candidate in Mouse Model and the Impact of Alum Adjuvant and Subcutaneous Infusion on its Efficiency. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):133-141.

[1]Biological Sciences Department, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, Zanjan Iran
[2]Hepatitis & AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Correspondence*
Address: Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, NO.444, Professor Yousef Sobooti Boulevard, Gavazang, Zanjan, Iran
Phone: +98 (24) 33153310
Fax: +98 (24) 33155142
a.mahdavi@iasbs.ac.ir

Article History
Received: February 08, 2017
Accepted: July 04, 2017
ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

Aims One of the challenges of today's world and also global health priorities is pandemicity of AIDS. Studies have shown that the scope and breadth of the immune responses induction are very effective to protect against HIV. Moreover, simultaneous induction of humoral and cellular immunity responses increases the effectiveness of candidate HIV vaccines. To attain these goals, new approaches such as polyepitopic vaccine strategy and addition of different adjuvants in HIV vaccines' formulations have been recently considered.

Materials & Methods In the present study, eukaryotic expression vector (pcDNA3.1-*tat/pol/gag/env*) was transformed and amplified in the prokaryotic host cells E. coli (DH5α). After vector extraction, it was concentrated and formulated alone and in combination with Alum adjuvant and used as DNA candidate vaccines. DNA candidate vaccines were, then, subcutaneously injected to the BALB/c mice on 0, 14, and 28 days and elicited humoral and cellular immunity responses were finally evaluated.

Findings The results showed that the candidate DNA vaccine could not efficiently induce immunity responses (both humoral and cellular responses) by subcutaneous route injection.**Conclusion** Maybe, in one hand, pcDNA3.1-*tat/pol/gag/env* vector could not effectively be taken by APC and subsequently HIV1-top4 antigens could not be expressed, processed, and presented. On the other hand, it is likely that inefficiency subcutaneous injection leads to these results. Therefore, other vaccines' injection and deliveries routes along with addition of other adjuvants in vaccine's formulations could induce immunity responses efficiently and increase vaccine efficacy.

Keywords AIDS; DNA Vaccine; Adjuvant; Cellular Immunity; Humoral Immunity

CITATION LINKS

[1] Islamic Republic of Iran Aids progress ... [2] Challenges in the development of an HIV-1 ... [3] Designing and engineering of DNA-vaccine construction ... [4] The end of AIDS: HIV infection ... [5] HIV DNA vaccine: Stepwise improvements ... [6] DNA Vaccines-A ... [7] DNA vaccines: A ... [8] Kuby ... [9] Approaches to enhancing immune ... [10] New-generation vaccine ... [11] Multiple approaches for increasing the immunogenicity ... [12] Molecular cloning: A laboratory ... [13] Augmentation and suppression of immune responses ... [14] Clustered epitopes within a new poly-epitopic HIV-1 DNA vaccine shows ... [15] A DNA-based candidate HIV vaccine delivered via in vivo ... [16] HIV-1 vaccine immunogen ... [17] Immunogenicity of a new HIV-1 DNA construct ... [18] Multi-epitope DNA ... [19] Targeting a polyepitope protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4+ cytotoxic T lymphocytes: A novel approach to ... [20] T-cell vaccine strategies for human immunodeficiency ... [21] Cloning, expression and purification ... [22] Combined virus-like particle-based polyepitope ... [23] Comparative analysis using a mouse model ... [24] Design and evaluation of optimized artificial ... [25] HIV-1 Gag p24-Nef fusion peptide ... [26] HIV polytope candidate vaccine formulation with n-trimethyl chitosan nanoparticles as a potent delivery ... [27] HIV-1 Tat-based vaccines: An overview and perspectives ... [28] Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics ... [29] Chitosan-based systems for the delivery ... [30] CpG DNA as a vaccine ... [31] Mechanism of action of licensed vaccine ... [32] Mechanisms and applications of immune stimulatory ... [33] Mechanisms of stimulation of the immune response ... [34] Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines ... [35] The role of CpG motifs in innate ... [36] Vaccine adjuvants: Role and mechanisms of ... [37] Molecular analysis and phylogenetic characterization ... [38] Purification of proteins using polyhistidine affinity ... [39] Multiple factors affect immunogenicity of DNA plasmid HIV ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

بررسی ایمنی‌زایی واکسن پلی‌توپ کاندید HIV مبتنی بر DNA در مدل موشی و تاثیر رویکردهای استفاده از ادجوانت آلوم و تزریق زیرجلدی بر میزان کارآیی آن

احسان‌الله جزایری MSc
گروه بیوشیمی، پژوهشکده تحصیلات تکمیلی علوم پایه، زنجان، ایران
عطیه مهدوی* PhD
گروه علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه، زنجان، ایران
اصغر عبدلی PhD
گروه هپاتیت و ایدز، انیستیتو پاستور، تهران، ایران

چکیده

اهداف: یکی از چالش‌های دنیای امروز و یکی از اولویت‌های بهداشت جهانی، مبارزه با همه‌گیری بیماری ایدز (AIDS) است. مطالعات نشان داده است که دامنه و وسعت القای پاسخ‌های ایمنی در برابر HIV و القای همزمان پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی در افزایش کارآیی واکسن‌های کاندید HIV بسیار تاثیر گذار است. از این رو، اخیراً رویکردهایی نظیر استفاده از واکسن‌های پلی‌اپی‌توپی و افزودن ادجوانت‌ها در فرمولاسیون واکسن‌های کاندید علیه HIV بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، پس از ترانسفورماسیون و تکثیر وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1-tat/pol/gag/env در میزبان پروکاریوتی *E. coli* (DH5α)، استخراج وکتور و آماده‌سازی آن انجام شد. سپس واکسن‌های کاندید DNAای به‌صورت زیرجلدی، در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ به موش‌های ماده رده BALB/c تزریق شده و نهایتاً پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی القاشده توسط آنها ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که واکسن‌های DNAای مذکور با روش تزریق زیرجلدی به‌خوبی قادر به القای پاسخ‌های ایمنی (سلولی و خونی) نبودند.

نتیجه‌گیری: این مشاهده می‌تواند به‌دلیل نقص در هر یک از مراحل برداشت وکتور توسط سلول هدف تا بیان و ارایه سطحی اپی‌توپ‌ها از یک طرف، یا ناکارآمدی روش تزریق زیرجلدی از طرف دیگر باشد. از این رو، ممکن است سایر روش‌های تزریق یا رهایش واکسن به‌همراه استفاده از ادجوانت‌های مختلف در فرمولاسیون واکسن کاندید، بتوانند پاسخ‌های ایمنی بهتری را القا کنند.

کلیدواژه‌ها: ایدز، واکسن DNAای، ادجوانت، ایمنی سلولی، ایمنی خونی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۳

*نویسنده مسئول: a.mahdavi@iasbs.ac.ir

مقدمه

یکی از چالش‌های دنیای امروز و یکی از اولویت‌های بهداشت جهانی، بیماری ایدز با میزان مرگ‌ومیر سالیانه ۲میلیون نفر و روزانه ۷۰۰۰ مورد ابتلای جدید است. ایران نیز با خطر جدی شیوع و گسترش این بیماری روبه‌رو است. به نظر می‌رسد استفاده از واکسن تنها روش مطمئن و مقرون‌به‌صرفه برای مقابله با بیماری ایدز است[1].

رویکردهای متفاوتی برای طراحی واکسن در برابر HIV مورد استفاده قرار گرفته است، اما تاکنون هیچ‌کدام در برابر HIV موثر و کارآمد نبوده‌اند[2-5]. در استراتژی واکسیناسیون، با تقلید از عفونت طبیعی می‌توان ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن‌های پروتئینی خارجی را به‌طور مصنوعی وارد سلول کرده و پاسخ‌های ایمنی را القا کرد[6, 7]. از این رو، در روش‌های واکسیناسیون توسعه‌یافته که اخیراً مورد استفاده قرار می‌گیرند، DNA پلاسمیدی کدکننده پروتئین آنتی‌ژنی پس از تزریق، توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) برداشته شده و ژن کدکننده پروتئین آنتی‌ژنی بیان می‌شود و پس از عرضه روی سطح سلول، در نهایت منجر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و خونی خواهد شد[8].

مطالعات نشان داده است که دامنه و وسعت پاسخ‌های ایجادشده در برابر HIV-1 می‌تواند در ایجاد حفاظت بسیار تاثیرگذار باشد و از طرف دیگر، یک واکسن موثر و کارآ علیه HIV-1 بایستی بتواند به‌طور همزمان هر دو بازوی ایمنی خونی و سلولی را نیز تحریک کند[2]. از این رو و با توجه به سیستم ایمنی پلی‌کلونال پستانداران، امروزه استفاده از رویکرد طراحی و ساخت واکسن‌های پلی‌اپی‌توپ بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از طرف دیگر، با توجه به اینکه مولکول‌های نوترکیب سنتزشده به‌منظور استفاده در ترکیب واکسن‌ها، دارای خلوص بالایی هستند و به این ترتیب ایمنی‌زایی کمتری را نسبت به مولکول‌های مشابه در حالت طبیعی و در ساختار یک عامل بیماری‌زا ایجاد می‌کنند.

رویکرد دیگر، استفاده از ادجوانت‌ها به‌منظور تقویت ایمنی‌زایی یا حتی جهت‌دهی هدفمند پاسخ‌های ایمنی القاشده به سمت پاسخ‌های ایمنی خونی یا سلولی است[9-11]. با توجه به نتایج امیدبخش حاصل از واکسن‌های پلی‌توپی از یک طرف و نیز بهبود ایمنی‌زایی واکسن‌ها به‌دلیل افزودن ادجوانت‌ها به فرمولاسیون آنها از طرف دیگر، در این مطالعه، توالی ایمونوژن متشکل از اپی‌توپ‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های مهم و کلیدی HIV-1 (اپی‌توپ‌هایی از پروتئین‌های مهم تنظیمی و ساختاری Tat، Env، Pol و Gag) درج‌شده در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1-*tat/pol/gag/env* به‌عنوان واکسن کاندید DNAای مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تقویت پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده، به‌ویژه پاسخ‌های ایمنی خونی، از ادجوانت آلوم نیز در فرمولاسیون یکی از واکسن‌های کاندید استفاده شد. با توجه به انواع روش‌های مختلف تزریق و اینکه روش تزریق واکسن نیز از جمله عواملی است که می‌تواند در نهایت بر کارآیی واکسن تاثیر بگذارد، در این تحقیق روش تزریق زیرجلدی برای واکسیناسیون انتخاب شد تا نهایتاً کارآیی آن نیز نسبت به سایر روش‌ها مورد بررسی قرار گیرد. پس از تزریق واکسن‌های کاندید DNAای، شاخص‌های ایمنی خونی و سلولی موش‌های واکسینه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

وکتور pcDNA3.1-*tat/pol/gag/env* از انیستیتو پاستور ایران (تهران؛ ایران) تهیه شد. آنزیم‌های محدودگر *EcoR*I و *Xho*I (فرمنتاز؛ لیتوانی)، ادجوانت آلوم، آنتی‌بادی‌های ثانویه بزی IgG_1 و IgG_{2a} ضدموشی کونژوگه‌شده با پراکسیداز ترب کوهی (HRP) (سیگما؛ ایالات متحده)، آمپی سیلین (اینویتروژن؛ ایالات متحده)، RPMI 1640 (گیبکو؛ آلمان)، کیت سنجش سایتوکاین (آر اند دی؛ ایالات متحده) و کیت سنجش فعالیت لاکتات دهیدروژناز (LDH) و کیتBrdU (تاکارا؛ ژاپن) خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی از یک شرکت دیگر (مرک؛ آلمان) خریداری و تهیه شدند. همه داده‌های ارایه‌شده در این تحقیق ، داده‌های تجربی هستند و تکرارپذیری آنها با حداقل ۳بار تکرار آزمایش‌ها تایید شد.

تکثیر و تخلیص وکتور pcDNA3.1-HIV1-top4: پس از بررسی و تایید وجود ژن *HIV-1-top4* در وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود گر *EcoR*I و *Xho*I، به‌منظور تکثیر وکتور و دست‌یابی به غلظت مورد نظر DNA برای تزریق، از سویه کلونینگ باکتری *E.* (DH5α)

Archive of SID
www.SID.ir

coli استفاده شد. پس از تهیه باکتری‌های مستعد، ترانسفورماسیون وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 با استفاده از روش شیمیایی تغییریافته سامبروک به درون باکتری (DH5α) *E. coli* انجام شد. در مرحله بعد، استخراج و تخلیص وکتور در مقیاس انبوه و به روش لیز قلیایی انجام شد. بدین منظور، یک کلنی تک در محیط کشت انتخابی واجد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین باغلظت ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر انتخاب و در ۱۰میلی‌لیتر محیط کشت ال‌بی مایع واجد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین باغلظت ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تلقیح گشته و یک شب تا صبح در دمای ۳۷°C در انکوباتور شیکردار با دور ۲۵۰rpm قرار داده شد (پیش‌کشت). سوسپانسیون باکتری به ۱لیتر محیط کشت ال‌بی مایع واجد آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تلقیح شد و به‌مدت ۱۶-۱۲ساعت در دمای ۳۷°C و دور ۲۵۰rpm، کشت داده شد. سپس با سانتریفیوژ در شرایط دمایی ٤°C، دور ۸۰۰۰rpm و به‌مدت ۵دقیقه، رسوب‌گیری انجام شد. در ادامه استخراج پلاسمید با استفاده از روش شیمیایی فنل- کلروفرم، با کمی تغییرات و اصلاحات انجام شد[12]. به‌منظور تایید حضور قطعات ژنی مورد نظر در وکتورهای استخراج‌شده، نمونه‌های حاصل از استخراج وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 در معرض هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *EcoR*I و *Xho*I قرار گرفتند و سپس روی ژل آگارز ۱% بررسی شدند. پس از اطمینان از کیفیت مناسب پلاسمید استخراج‌شده، در نهایت غلظت پلاسمید استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. در فرآیند تکثیر و استخراج وکتور pcDNA3.1 (به‌عنوان کنترل) نیز همین روش دقیقاً مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی گروه‌های موشی مورد مطالعه: ۲٤ سر موش ماده رده BALB/c خریداری شد (انستیتو پاستور؛ ایران) و به حیوان‌خانه انستیتو پاستور ایران در تهران منتقل شد. در تمام مراحل آزمایش، موش‌ها در شرایط مناسب نگهداری شدند و مقررات و دستورالعمل‌های موسسه ملی سلامت (NIH) در مورد نگهداری و رفتار با حیوانات آزمایشگاهی کاملاً مورد توجه قرار گرفت. تزریق واکسن‌های کاندید ۱ هفته پس از انتقال و سازگارشدن موش‌ها با شرایط محیطی جدید انجام شد. برای بررسی ایمنی‌زایی واکسن‌های کاندید DNAای HIV-1-top-4 و بررسی اثر آلوم در افزایش کارآیی واکسن کاندید، گروه‌های موشی به‌صورت ٦تایی و در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند.

فرمولاسیون واکسن‌های کاندید: وکتورهای pcDNA3.1-HIV-1-top-4 و pcDNA3.1 با غلظت ۵۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر و ادجوانت آلوم با غلظت موثر ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در فرمولاسیون واکسن‌های کاندید مورد استفاده قرار گرفتند و واکسن‌های کاندید به‌صورت زیرپوستی در روزهای صفر، ١٤ و٢٨ به موش‌ها تزریق شدند[13] (جدول ۱).

جدول ۱) پروتکل فرمولاسیون واکسن کاندید DNAای مبتنی بر HIV1-top4

گروه	ایمونوژن	ادجوانت	روش تزریق
pcDNA3.1-HIV1-top4	pcDNA3.1-HIV1-top4 (50 µg/100 µl)	-	زیرجلدی
pcDNA3.1-HIV1 top4+Alum	pcDNA3.1-HIV1-top4 (50 µg/100 µl)	Alum (15µg/100 µl)	زیرجلدی
pcDNA3.1 (control)	pcDNA3.1 (50 µg/100 µl)	-	زیرجلدی
Alum (control)	-	Alum(15µg/ 100 µl)	زیرجلدی

سنجش پاسخ‌های ایمنی خونی: برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی خونی القاشده توسط واکسن‌های کاندید DNAای با فرمولاسیون‌های مختلف، ۷ روز پس از آخرین تزریق، در شرایط کاملاً استریل از چشم موش‌های واکسینه‌شده، خون‌گیری انجام شد. خون گرفته‌شده از موش‌های هر گروه در میکروتیوب‌های جداگانه‌ای ریخته شد و به‌مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس میکروتیوب‌ها در دمای اتاق، دور ٦۰۰۰rpm و به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم جداشده موش‌های هر گروه با دقت جمع‌آوری و به درون میکروتیوب‌های استریل جداگانه ریخته شد و تا زمان انجام آزمایش‌های ایمنی خونی در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد.

بررسی سطح سرمی آنتی‌بادی IgG_1 و IgG_{2a}: به‌منظور تعیین سطح ایمنی خونی القاشده توسط واکسیناسون، سطح سرمی آنتی‌بادی‌های IgG_1 و IgG_{2a} با روش الایزا اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، مقدار ۱۰۰میکرولیتر از آنتی‌ژن HIV-1-top4 با غلظت ۱۰میکروگرم در میلی‌لیتر به درون چاهک‌های پلیت ۹٦خانه‌ای الایزا ریخته شد. پلیت‌ها به‌مدت یک شب در دمای ٤°C انکوبه شدند تا کف پلیت توسط آنتی‌ژن پوشیده شود. سپس پلیت‌ها ۵بار شست‌وشو داده شده و ۳۰۰میکرولیتر بافر مسدودکننده (BSA+PBS ۱%، pH=۷/۲-۷/٤) به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۲ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. شست‌وشوی پلیت‌ها با بافر شست‌وشو مجدداً مطابق روش قبل تکرار شد و سپس به‌خوبی خشک شدند. سرم‌ها توسط بافر رقیق‌کننده (BSA+PBS ۱%، pH=۷/۲-۷/٤) به نسبت ٤۰۰برابر رقیق شدند (لازم به ذکر است که بهترین رقت سرمی وآنتی‌بادی-های مورد استفاده قبلاً بررسی و مشخص شده بود). به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۱۰۰میکرولیتر از سرم رقیق‌شده اضافه شد و پلیت‌ها ۲ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پلیت‌ها دوباره مانند روش قبل، ۵بار شسته شده و پس از آن کاملاً خشک شدند. آنتی‌ایزوتیپ‌های IgG_1 و IgG_{2a} که از منبع بز بودند، با نسبت ۱/۱۰۰۰ در بافر رقیق‌کننده، رقیق شده و به هر یک از چاهک‌های مربوطه، مقدار ۱۰۰میکرولیتر از آنها اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۱ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پلیت‌ها دوباره مانند روش قبل، ۵بارشسته شده و پس از آن کاملاً خشک شدند. آنتی‌بادی‌های ثانویه بزی IgG_1و IgG_{2a} ضدموشی کونژوگه‌شده با پراکسیداز ترب کوهی به نسبت ۱/۷۰۰۰ در بافر رقیق کننده، رقیق شده و ۱۰۰میکرولیتر از آن به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۱ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پلیت‌ها مجدداً مانند روش قبل، ۵بار شسته شده و سپس کاملاً خشک شدند. به هر یک از چاهک‌ها، ۱۰۰میکرولیتر سوبسترای TMB اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. برای متوقف‌نمودن واکنش، به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال اضافه شد. میزان جذب هر یک از چاهک‌ها در طول موج ٤۵۰نانومتر خوانده شد[14] (کلیه مراحل انجام آزمایش طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده کیت انجام شد).

سنجش پاسخ‌های ایمنی سلولی: به‌منظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی القاشده توسط واکسن‌های کاندید DNAای با فرمولاسیون‌های مختلف، ابتدا سوپانسیون تک‌سلولی از سلول‌های طحال موش‌های واکسینه‌شده تهیه شد. بدین منظور، ۲ هفته پس از آخرین تزریق، موش‌ها با روش نخاعی، کشته شده و طحال آنها در زیر هود لامینار نوع II و با رعایت شرایط کاملا استریل جدا شد. سپس طحال‌ها در ظروف حاوی بافر سوسپانسیون (FBS ۲% +

Archive of SID
www.SID.ir

PBS) قرار داده شده و بلافاصله روی یخ قرار گرفتند. بافت‌های طحال پس از له و هموژن‌شدن در محلول بافر سوسپانسیون (با استفاده از انتهای پیستون سرنگ استریل) به‌مدت ۱۵دقیقه در دمای ۴°C و دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، ۲/۵میلی‌لیتر بافر لیز اضافه شد (محلول حاصل از ۹۰میلی‌لیتر از کلریدآمونیوم با غلظت ۰/۱۶مولار و ۱۰میلی‌لیتر از تریس با غلظت ۰/۱۷مولار با pH=۷/۲). مخلوط حاصل به‌مدت ۵دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و بلافاصله پس از آن مطابق شرایط قبل، سانتریفیوژ انجام شد. بافر لیز دور ریخته شد و به رسوب باقی‌مانده، ۵میلی‌لیتر بافر سوسپانسیون برای شست‌وشوی سلول‌ها اضافه شد. سانتریفیوژ مجدداً مانند شرایط قبل انجام شده و مایع رویی دور ریخته شد. به هر فالکون ۱میلی‌لیتر محیط کشت کامل (گیبکو؛ آلمان؛ دارای RPMI 1640 +۱۰%FBS +۴میلی‌لیتر L- گلوتامین+۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین+ ۱۰۰واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین) اضافه شد. سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی به‌وسیله رنگ ترپیان بلو (۰/٤%) و با استفاده از لام نئوبار، شمارش شدند[12].

ارزیابی پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های B و T: برای ارزیابی پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های B و T از آزمون BrdU و روش الایزا استفاده شد. بدین منظور تعداد ۳×۱۰^۶سلول استخراج‌شده از طحال، در ۱میلی‌لیترمحیط RPMI-1640 کامل، معلق شده و از سوسپانسیون سلولی به‌دست‌آمده به مقدار ۱۰۰میکرولیتر در هر چاهک پلیت ۹۶خانه‌ای کشت داده شد. آنتی‌ژن پروتئینی *HIV-1-top4* با غلظت ۱۰میکروگرم در میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. سلول‌های تحریک‌نشده به‌وسیله آنتی‌ژن به‌عنوان کنترل منفی و سلول‌های تحریک‌شده توسط کانکاناوالین با غلظت ۵میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. حجم نهایی تمام چاهک‌ها با محیط کشت کامل به ۲۰۰میکرولیتر رسانده شد. پلیت کشت سلولی در انکوباتور ۳۷°C و ۵% دی‌اکسیدکربن قرار داده شد. پس از ۷۲ساعت، به هریک از چاهک‌ها مقدار ۲۰میکرولیتر از ماده BrdU اضافه شد و دوباره به‌مدت ۱۸ساعت در انکوباتور ۳۷°C و ۵% دی‌اکسیدکربن قرار داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای اتاق و دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شده و پس از خارج‌کردن کامل محیط کشت رویی هر چاهک، در دمای ٦۰°C خشک شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از بافر دناتوره‌کننده نفوذپذیر شدند. به هر یک از چاهک‌ها ۱۰۰میکرولیتر آنتی‌بادی کنژوگه ضدBrdU اضافه شد. پس از ۲ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، پلیت‌ها ۵بار شست‌وشو داده شدند. سوبسترای TMB اضافه شد و پس از گذشت ۵-۳دقیقه، واکنش با اضافه نمودن ۱۰۰میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲مولار متوقف شد. میزان چگالی نوری در طول موج ٤۵۰ نانومتر خوانده شد. نتایج پاسخ‌های تکثیری به‌صورت ایندکس تحریک (SI) با تقسیم میزان جذب سلول‌های تحریک‌شده به میزان جذب سلول‌های تحریک‌نشده محاسبه شد (کلیه مراحل آزمایش طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده کیت انجام شد).

اندازه‌گیری سطح اینترفرون ۷: برای تعیین سطح سرمی سایتوکاین اینترفرون ۷ تولیدی توسط سلول‌های طحالِ در تماس با آنتی‌ژن، از آزمون الایزا استفاده شد. بدین منظور تعداد ٤×۱۰^۶سلول استخراج‌شده از طحال، در ۱میلی‌لیترمحیط RPMI-1640 کامل معلق شده و از سوسپانسیون سلولی به‌دست‌آمده به مقدار ۱۰۰میکرولیتر در هر چاهک پلیت ۹۶خانه‌ای کشت داده شد. آنتی‌ژن پروتئینی *HIV-1-top4* با غلظت ۱۰میکروگرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت در دمای ۳۷°C و در حضور ۵% دی‌اکسیدکربن به‌مدت ۷۲ساعت انکوبه شدند و سپس با دور rpm ۲۰۰۰ و دمای اتاق به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰میکرولیتر از محلول رویی هر چاهک با دقت جدا شده و به پلیت‌های الایزای جدید انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمون در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. در ادامه، پلیت‌های ۹٦خانه‌ای جدیدی تهیه و به هر یک از چاهک‌های آنها، ۱۰۰میکرو لیتر ازCapture آنتی‌بادی اضافه شد و پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه به‌مدت یک شب انکوبه شدند. محتویات داخل چاهک‌ها تخلیه و با بافر شست‌وشو، ۵مرتبه شست‌وشو داده شد. سپس ۳۰۰میکرولیتر از بافر مسدودکننده به چاهک‌ها اضافه و پلیت‌ها به‌مدت ۲ساعت در دمای آزمایشگاه، انکوبه شدند. محتویات داخل چاهک‌ها تخلیه شد و چاهک‌ها با بافر شست‌وشو، ۵بار شست‌وشو داده شده و پس از آن کاملاً خشک شدند. مقدار ۱۰۰میکرولیتر از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در مرحله قبل و استانداردهای آماده‌شده با غلظت‌های ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ٦۳ و ۳۱/۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر از اینترفرون ۷ در چاهک‌های مربوطه به‌صورت دوتایی اضافه شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و سپس همانند مراحل قبل ۵بار شسته شدند. ۱۰۰میکرولیتر از آنتی‌بادی شناساگر به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها همانند مرحله قبل انکوبه شدند. شست‌وشوی پلیت‌ها مجدداً مانند قبل انجام گرفت. ۱۰۰میکرولیتر ازاسترپتوآویدین- HRP به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها به‌مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. و سپس مجدداً شسته شدند. ۱۰۰میکرولیتر از محلول سوبسترا به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها در تاریکی انکوبه شدند. ۱۰۰میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به هر چاهک اضافه و بلافاصله مقدار چگالی نوری چاهک‌ها در طول موج ٤۵۰نانومتر خوانده شدند. با توجه به منحنی استاندارد حاصل از چگالی نوری چاهک‌های استاندارد، میزان اینترفرون ۷ مربوط به نمونه‌های مورد آزمایش محاسبه شد (کلیه مراحل آزمایش طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده کیت انجام شد).

ارزیابی فعالیت‌های ایمنی سلول‌های CTL: برای ارزیابی فعالیت‌های ایمنی سلول‌های: لنفوسیت‌های T کشنده (CTL) از روش سنجش فعالیت لاکتات دهیدروژناز (LDH assay) استفاده شد. بدین منظور، ابتدا کشت سلولی از سلول‌های هدف SP2 با تعداد ۲۰،۰۰۰عدد سلول در هر ۱۰۰میکرولیتر تهیه شده و در چاهک‌های پلیت ۹٦خانه‌ای ریخته شد. آنتی‌ژن پروتئینی *HIV-1-top4* با غلظت ۱۰میکروگرم در هر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت یک شب در دمای ۳۷°C و ۵% دی‌اکسیدکربن انکوبه شد. از سلول‌های استخراج‌شده از طحال هر کدام از موش‌های واکسینه‌شده نیز کشت سلولی با تعداد ۲×۱۰^۶عدد سلول در هر ۱۰۰میکرولیتر تهیه شد. در ادامه، سلول‌های هدف و افکتور کشت‌داده‌شده با همین نسبت به هم اضافه شده و به‌مدت ۵ساعت در دمای ۳۷°C و ۵% دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. کنترل‌های ذکرشده نیز در نظر گرفته شدند (۳۰دقیقه قبل از اتمام زمان انکوباسیون، به چاهک کنترل، تریتون X-100 اضافه شد). پس از طی زمان مذکور، پلیت در دمای اتاق و دور ۲۵۰g به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت رویی هر یک از چاهک‌ها، به دقت جمع‌آوری شده و درون چاهک‌های متناظر در پلیت ۹٦خانه‌ای مخصوص الایزا ریخته شد. به هر چاهک مقدار ۱۰۰میکرولیتر محلول واکنش آزمون، که به فاصله‌اندکی قبل از شروع کار تهیه شده بود (طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت

Archive of SID

www.SID.ir

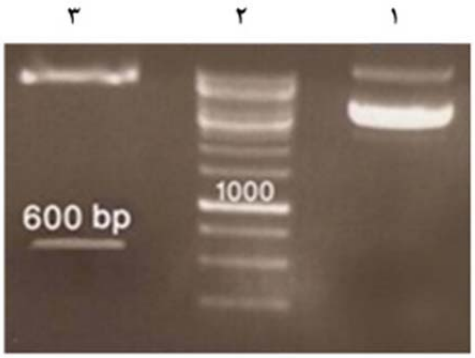
سازنده کیت) اضافه شد. پلیت به‌مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق و به دور از هر گونه نور مستقیمی، انکوبه شد. سپس به هر یک از چاهک‌ها ۵۰میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش اسیدسولفوریک ۲ نرمال اضافه شد. میزان جذب هر یک از چاهک‌ها در طول موج ٤٥٠نانومتر خوانده شد (کلیه مراحل آزمایش طبق پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده کیت انجام شد). در نهایت، درصد سایتوتوکسیسیتی سلول‌های CTL هر کدام از نمونه‌ها به روش زیر محاسبه شد.

$$\text{Cytotoxici ty (\%)} = \frac{(\text{test} - \text{effector control}) - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

بررسی و تجزیه آماری: کلیه آزمایش‌های ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی و خونی، ۳بار تکرار شد و تکرارپذیری آنها تایید شد. معنی‌داری تفاوت بین گروه‌های مختلف دریافت‌کننده واکسن‌های کاندید نیز به‌وسیله نرم‌افزار آماری Graphpad prism 6 و روش آماری واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و تست تکمیلی Tukey تحلیل و ارزیابی شد و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

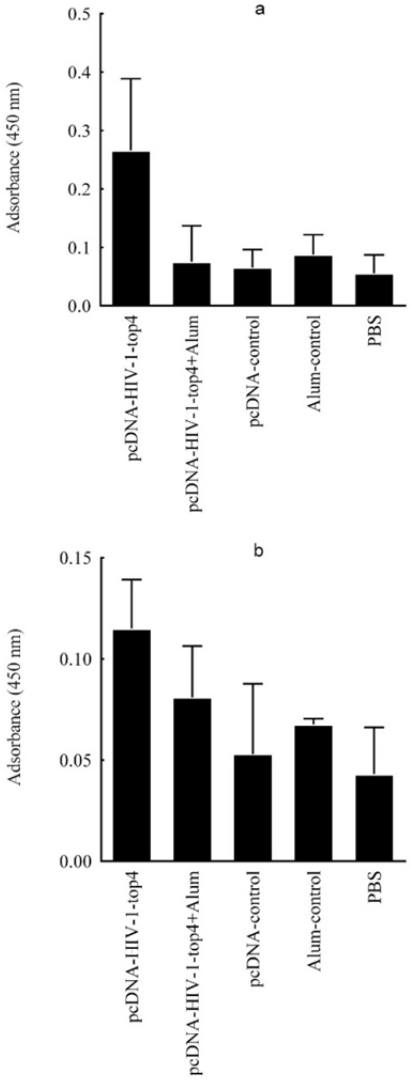
یافته‌ها

نتایج حاصل از هضم آنزیمی وکتورهای pcDNA3.1-HIV-1-top4 و انتقال وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 به داخل باکتری *E. coli* سویه DH5α مستعدشده: در ابتدای کار، به‌منظور اطمینان از کیفیت وکتور و حضور ژن *HIV-1-top-4* درون این وکتور، نمونه‌های وکتور پس از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱% بررسی شده و پس از حصول اطمینان، برای مراحل بعدی کار مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). برای انتقال وکتور pcDNA-HIV-1-top4 نوترکیب به میزبان باکتریایی نیز از روش شیمیایی کلریدکلسیم استفاده شد. با توجه به حضور ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4، نتیجه ترانسفورماسیون سویه میزبان با کشت سلول‌های ترانسفورم‌شده روی محیط کشت الbی آگار انتخابی دارای آمپی‌سیلین بررسی شد. کلونی‌های تشکیل‌شده روی محیط کشت انتخابی، نشان‌دهنده موفقیت عمل ترانسفورماسیون است. برای تکثیر و استخراج وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4، کشت شبانه از باکتری *E.coli* (DH5α) حاوی وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 تهیه شد. سپس با استفاده از روش استخراج ذکرشده در بخش مواد وروش‌ها، استخراج وکتور انجام شد. نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱% بارگذاری شدند و مورد تایید قرار گرفتند.



شکل ۱) نتایج حاصل از هضم آنزیمی وکتورهای pcDNA3.1-HIV-1-top4

سنجش پاسخ‌های ایمنی خونی القاشده توسط واکسن‌های کاندید مبتنی بر DNA نوترکیب HIV-1-top4: بررسی پاسخ‌های ایمنی خونی ایجادشده به‌وسیله واکسن‌های کاندید، از طریق اندازه‌گیری سطح سرمی آنتی‌بادی‌های IgG_1 و IgG_{2a} با روش الایزا انجام شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌های سرمی به‌دست‌آمده از موش‌های دریافت‌کننده واکسن‌های کاندید DNAای (در طول موج ٤٥٠نانومتر)، به‌عنوان معیاری از سطح سرمی IgG_1 و IgG_{2a} در نظر گرفته شد. همان طور که در نمودارهای ۱-الف و ۱-ب دیده می‌شود، گروه‌های دریافت‌کننده وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 بدون ادجوانت و وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 به‌همراه ادجوانت آلوم در مقایسه با گروه‌های کنترل، پاسخ‌های ایمنی خونی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد نکرده‌اند.



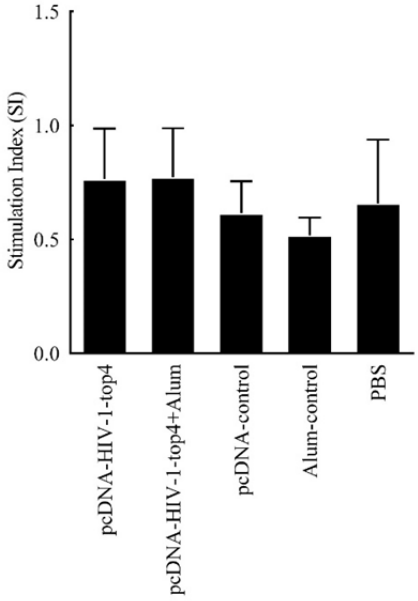
نمودار ۱ (الف و ب) نتایج اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌های سرمی به‌دست‌آمده از موش‌های دریافت‌کننده واکسن‌های کاندید DNAای

بررسی پاسخ‌های ایمنی سلولی القاشده توسط واکسن‌های کاندید مبتنی بر DNA ی نوترکیب HIV1-top4: به‌منظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی القاشده توسط واکسن‌های کاندید DNA ایی، تکثیر لنفوسیت‌ها (آزمون BrdU)، میزان IFN γ تولیدی توسط سلول‌های طحال (سنجش سایتوکاین) و نیز درصد

Archive of SID
www.SID.ir

سایتوتوکسیسیتی CTLها (آزمون LDH) اندازه‌گیری شد که در ادامه نتایج حاصل از هر یک از این سنجش‌ها ذکر می‌شود.

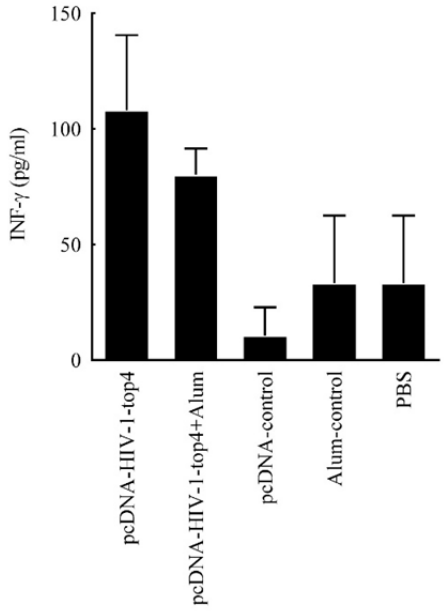
پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های B و T القاشده توسط واکسن‌ها: ردیابی و تشخیص همانندسازی DNA در سلول‌های در حال تکثیر با استفاده از پیش‌سازهای نشان‌دارشده DNA و واردشدن آنها به درون DNA در فاز S از چرخه زندگی سلولی، امکان‌پذیر است. از جمله معمول‌ترین این پیش‌سازهای نشان‌دار می‌توان به BrdU اشاره کرد. شناسایی و ردیابی BrdU بر پایه روش‌های ایمونولوژیکی بوده و به‌وسیله آنتی‌بادی‌های اختصاصی آنتیBrdU و با روش الایزا انجام می‌شود. نتایج محاسبه ایندکس تحریک (SI) نمونه‌های به‌دست‌آمده از سلول‌های طحال موش‌های واکسینه‌شده با فرمولاسیون‌های متفاوت واکسن‌های کاندید DNAای نشان داد که گروه‌های دریافت‌کننده وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 بدون ادجوانت و نیز وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 به‌همراه ادجوانت آلوم در مقایسه با گروه‌های کنترل، پاسخ‌های ایمنی قابل ملاحظه‌ای را القا نکرده‌اند (نمودار ۲).



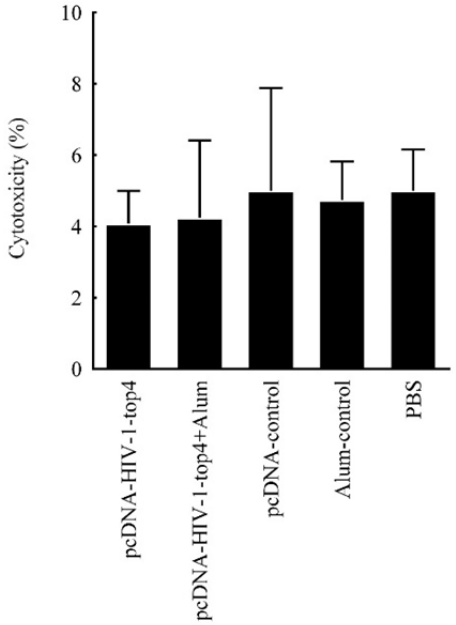
نمودار ۲) ایندکس تحریک نمونه‌های به‌دست‌آمده از سلول‌های طحال موش‌های واکسینه‌شده

سنجش سطح اینترفرون ۷ در موش‌های واکسینه: همان طور که در نمودار ۳ دیده می‌شود، نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری سطح اینترفرون ۷ نمونه‌های مورد آزمایش نشان داد که گروه‌های دریافت‌کننده وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 فاقد ادجوانت و نیز وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 فرموله‌شده با ادجوانت آلوم، در مقایسه با گروه‌های کنترل، پاسخ‌های ایمنی قابل ملاحظه‌ای را القا نکرده‌اند.

ارزیابی درصد سایتوتوکسیستی سلول‌های CTL: برای ارزیابی فعالیت‌های ایمنی سلول‌های CTL، از روش سنجش فعالیت لاکتات‌دهیدروژناز (LDH assay) استفاده شد. این روش، به‌منظور اندازه‌گیری میزان مرگ‌ومیر و لیز سلولی، براساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز آزادشده از سیتوزول سلول‌های آسیب‌دیده به درون محیط کشت سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج محاسبه درصد سایتوتوکسیسیتی نمونه‌های به‌دست‌آمده از سلول‌های طحال موش‌های واکسینه‌شده با فرمولاسیون‌های متفاوت واکسن‌های کاندید DNAای نشان داد که گروه‌های دریافت‌کننده وکتورهای pcDNA3.1-HIV-1-top4 فاقد ادجوانت و نیز وکتور pcDNA3.1-HIV-1-top4 فرموله‌شده با ادجوانت آلوم، در مقایسه با گروه‌های کنترل، قادر به القای پاسخ‌های ایمنی قابل ملاحظه‌ای نبوده‌اند (نمودار ۴).



نمودار ۳) سطح اینترفرون ۷ نمونه‌های مورد آزمایش



نمودار ٤) ارزیابی درصد سایتوتوکسیستی سلول‌های CTL

بحث

کشف واکسن‌های DNAای در اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی رویکرد جدیدی را در واکسیناسیون ایجاد کرد و به زودی ارزش خود را در مطالعات واکسن نشان داد. اکثر واکسن‌های DNAای که در حال

www.SID.ir

حاضر مورد مطالعه هستند، به‌منظور توسعه پاسخ‌های ایمنی سلولی، به‌ویژه پاسخ‌های$CD8^+$ CTL، طراحی شده‌اند که در کنترل بار ویروسی و پیشرفت بیماری نقش بسیار مهمی دارند. از طرف دیگر، مشخص شده است که واکسن‌هایی که بازوی سلولی سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند نمی‌توانند حفاظتی را در برابر ابتلا به بیماری ایجاد کنند[5]. با توجه به مطالب ذکرشده و با درنظرگرفتن تاثیر واکسن‌های مختلف پروتئینی و DNAای در القای پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی علیه HIV و لزوم القای هر دو بازوی سیستم ایمنی برای افزایش کارآیی واکسن‌های کاندید، تحریک همزمان هر دو جنبه پاسخ‌های ایمنی بایستی در نظر گرفته شود.

همچنین مطالعات پایه‌ای و نتایج آزمایش‌های بالینی نیز نشان داده‌اند که گستردگی پاسخ‌های ایمنی (علیه دامنه گسترده‌ای از آنتی‌ژن‌ها) علیه HIV می‌تواند کارآمدی واکسن را افزایش دهد. در راستای این امر، استراتژی‌ها واقداماتی در راستای تقویت هدفمند هر دو بازوی سیستم ایمنی (ایمنی خونی و سلولی) به کار گرفته می‌شود که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد[5-7, 15-20].

یکی از رویکردهای مورد استفاده، کنار هم قراردادن و ساخت ایمونوژن‌های پلی‌اپی‌توپ است. این واکسن‌ها از دامنه گسترده‌ای از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی اصلی HIV تشکیل شده‌اند که به‌طور مجزا تحریک‌کننده لنفوسیت‌هایB و T هستند و با قرارگرفتن در کنار هم می‌توانند به‌طور همزمان پاسخ‌های آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده گسترده و نیز ایمنی سلولی را القا کنند. استفاده از این روش می‌تواند ضمن افزایش کارآیی واکسن، سبب غلبه بر مشکلات ناشی از تنوع ژنتیکی HIV از یک طرف و تنوع ژنتیکی جمعیت انسانی از طرف دیگر شود. این دستاورد امیدهایی را برای تولید واکسن‌های موثرتر علیه HIV ایجاد کرده است. با این حال، ممکن است انواعی از اپی‌توپ‌های متغیر که می‌توانند باعث ایجاد حفاظت شوند، نادیده گرفته شوند. در انتخاب اپی‌توپ‌ها بایستی مواردی از قبیل نقش آنها در چرخه زندگی ویروسی، حفظ‌شدگی جزیی اپی‌توپ‌ها در انواع زیر گونه‌ها، قابلیت شناسایی آنها توسط CTLها یا لنفوسیت‌های B و نیز دامنه گسترده میل اتصال آنها با آلل‌های مختلف MHC در انسان، در نظر گرفته شوند[3].

تاکنون توالی‌های پروتئینی متفاوتی از HIV-1 به‌عنوان اهدافی برای استفاده به‌عنوان واکسن مورد توجه قرار گرفته‌اند، اما مطالعات نشان داده است که برخی از پروتئین‌های ویروس ایدز کاندیدهای مناسب‌تری برای ساخت واکسن‌های پلی‌اپی‌توپی هستند که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های Tat، Env، Pol و Gag اشاره کرد. این پروتئین‌ها نقش بسیار مهمی در چرخه زندگی و عفونت‌زایی ویروس ایدز ایفا می‌کنند و مهار آنها می‌تواند بیماری‌زایی ویروس را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد.

علاوه بر این، بررسی پاسخ‌های ایمنی در مبتلایان به ایدز نشان داده است که سیستم ایمنی درصد قابل توجهی از این افراد، نسبت به پروتئین‌های Tat، Env، Pol و Gag پاسخ نشان داده است و حتی در برخی موارد، این پاسخ‌ها بسیار قوی هستند[17]. به علاوه، در مطالعات مختلف انجام‌شده روی اپی‌توپ‌های هر یک از پروتئین‌های مذکور، مشخص شده است (علی‌رغم وجود تنوع ژنتیکی MHCها در افراد مختلف که بر میان‌کنش MHC و آنتی‌ژن و به‌دنبال آن بر میزان ایمنی‌زایی آنتی‌ژن تاثیرگذار است) که کدام یک از این اپی‌توپ‌ها قادر به ایجاد پاسخ ایمنی مناسب هستند و می‌توانند سبب القای پاسخ‌های ایمنی در طیف وسیع‌تری از جمعیت شوند. لذا انتخاب این اپی‌توپ‌های خاص به‌عنوان واکسن می‌تواند به کنترل بیماری و جلوگیری از پیشروی آن کمک کند.

در راستای تحقیقات صورت‌گرفته در جهت توسعه و تولید واکسن‌های پلی‌اپی‌توپی، مشخص شده است که ترکیبی از اپی‌توپ‌هایی از پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی HIV، ایمنی‌زایی بیشتری را نسبت به مواردی که تنها از پروتئین‌های ساختاری یا تنظیمی استفاده می‌شود، ایجاد می‌کند[3, 14, 17, 19, 21-26]. با توجه به موارد ذکرشده در این پژوهش، اپی‌توپ‌هایی از پروتئین‌های ساختاری Pol/Gag/Env همراه با دو اپی‌توپ حفظ‌شده از پروتئین تنظیمی Tat ویروس HIV-1[27]، به‌عنوان واکسن کاندید پلی‌اپی‌توپی مورد استفاده قرار گرفته و ایمنی‌زایی آنها در قالب واکسن‌هایDNAای ارزیابی شد.

رویکرد دیگر، استفاده از ادجوانت‌ها در فرمولاسیون واکسن‌ها است. ادجوانت‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور غیراختصاصی، ولی هدفمند، می‌توانند ایمنی خونی یا سلولی را تحریک کنند. مطالعات زیادی نشان می‌دهند که ادجوانت آلوم پاسخ‌های ایمنی خونی را به‌خوبی القا می‌کند. از این رو و با توجه به القای ضعیف پاسخ‌های ایمنی خونی توسط واکسن‌های DNA ایی، در این پژوهش از ادجوانت آلوم برای بررسی تاثیر آن در افزایش ایمنی‌زایی واکسن کاندید استفاده شد[9, 28-36].

مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که روشی که برای تزریق واکسن انتخاب می‌شود، در ایمنی‌زایی و کارآیی آن بسیار موثر است. بنابراین، رویکرد دیگر در راستای افزایش اثربخشی واکسن، استفاده از روش‌های متفاوت تزریق و دلیوری واکسن کاندید است. عموماً واکسن‌های DNAای به‌صورت عضلانی به‌همراه الکتروپوریشن یا با استفاده از تفنگ ژنی تزریق می‌شوند. گزارش‌های مختلفی هم از تزریق زیرجلدی این واکسن‌ها وجود دارد. از این رو، در این مطالعه به‌منظور ارزیابی کارآیی تزریق زیرجلدی در میزان ایمنی‌زایی واکسن‌های کاندید DNAای، از این روش تزریق برای واکسیناسیون گروه‌های موشی استفاده شد[17, 25, 26, 37].

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، القای پاسخ‌های ایمنی خونی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های یک واکسن کاندید موفق علیه HIV-1 است. آنتی‌بادی‌های سرمی اختصاصی علیه HIV (به‌ویژه علیه پروتئین‌های سطحی gp120 و gp41 که در اتصال به گیرنده‌های سطحی CD4 و CCR5 لنفوسیت‌های T کمکی و به‌دنبال آن ادغام غشای ویروس و سلول میزبان نقش دارند) می‌توانند در جلوگیری از ابتلا به عفونت ایدز موثر باشند[14, 17, 21, 25, 26, 38]. در این مطالعه، اندازه‌گیری سطح سرمی آنتی‌بادی‌های IgG_1 (به‌عنوان شاخصی از پاسخ ایمنی خونی و تحریک سلول‌های Th2) و IgG_{2a} (به‌عنوان شاخصی از پاسخ ایمنی خونی و تحریک سلول‌های Th1) موش‌های واکسینه‌شده توسط واکسن‌های کاندید DNAای با فرمولاسیون‌های مختلف نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری با گروه‌های کنترل وجود ندارد (نمودارهای ۱-الف و ۱-ب) و این واکسن‌ها قادر به القای مناسب پاسخ‌های ایمنی خونی نبوده‌اند[6, 7].

جعفرپور و همکاران از پلاسمید pcDNA3.1-*tat/pol/gag/env* با روش تزریق عضلانی همراه با پالس‌های الکتروپوریشن به‌عنوان واکسن کاندید DNAای در مدل موشی استفاده کردند، اما از نتایج کار آنها در مورد ایمنی‌زایی خونی واکسن کاندید DNAای گزارشی منتشر نشده است[14]. القای پاسخ‌های ایمنی سلولی نیز یکی دیگر از مهم‌ترین ویژگی‌های واکسن‌های کاندید موفق علیه HIV است. مطالعات نشان داده

Archive of SID
www.SID.ir

است که القای پاسخ‌های سلولی در کنترل بار ویروسی و جلوگیری از پیشرفت بیماری نقش بسیار مهمی دارد. لذا در این مطالعه، میزان پاسخ‌های تکثیری القاشده، میزان سایتوکاین اینترفرون ۷ تولیدشده و درصد سایتوتوکسیسیتی سلول‌های CTL به‌عنوان معیارهایی از القای پاسخ‌های ایمنی سلولی توسط واکسن‌های کاندید، مورد ارزیابی قرار گرفتند[14, 17, 21, 25, 26, 38].

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، واکسن‌های DNAای در القای پاسخ‌های تکثیری نیز به‌خوبی عمل نکرده‌اند. پاسخ‌های ایجادشده در همه گروه‌ها تقریباً یکسان بوده و به لحاظ آماری تفاوت چشمگیری بین گروه‌های اصلی و کنترل دیده نمی‌شود (نمودار ۲). نتایج کار *جعفرپور* و همکاران نشان داد که واکسن کاندید DNAای top4 تزریق‌شده به‌صورت عضلانی همراه با پالس‌های الکتروپوریشن، در القای پاسخ‌های تکثیری موفق بوده است[14]. پاسخ‌های سایتوکاینی اینترفرون ۷ به‌عنوان نمادی از پاسخ‌های ایمنی سلولی Th1 و القای سلول‌های $T\ CD8^+$ هستند که نقش کلیدی در کنترل و حذف عفونت ویروسی ایفا می‌کنند و مشخص شده است که کاهش سطح این سایتوکاین با پیشرفت بیماری ایدز بسیار مرتبط است[21].

همان طور که در بخش یافته‌ها اشاره شد، بررسی سطح اینترفرون ۷ تولیدشده به‌وسیله واکسن‌های کاندید DNAای نشان می‌دهد که این واکسن‌ها در القای پاسخ‌های سایتوکاینی نیز موفق عمل نکرده‌اند. هر چند پاسخ‌های ایجادشده در گروه‌های موشی دریافت‌کننده واکسن کاندید DNAای pcDNA3.1-top4 فاقد ادجوانت و گروه دریافت‌کننده واکسن کاندید DNAای pcDNA3.1-top4 به‌همراه ادجوانت آلوم، نسبت به گروه‌های کنترل بالاتر است و تفاوت نیز به لحاظ آماری معنی‌دار است، ولی در مجموع مقدار اینترفرون ۷ تولیدی پایین‌تر از حد استاندارد تحریک بوده و به این ترتیب می‌توان گفت که این واکسن‌های کاندید در القای پاسخ‌های ایمنی سلولی نیز نا موفق بوده‌اند (نمودار ۳). این در حالی است که نتایج کار *جعفرپور* و همکاران نشان می‌دهد واکسن کاندید DNAای pcDNA3.1-top4 تزریق‌شده با روش عضلانی به‌همراه الکتروپوریشن، سطوح بالایی از اینترفرون ۷ تولید کرده است.

بررسی درصد سایتوتوکسیسیتی سلول‌های CTL (به‌عنوان معیاری دیگر از پاسخ‌های ایمنی سلولی و شاخص عملکرد سلول‌های CTL) نیز با اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز آزادشده توسط سلول‌های لنفوسیتی هدف ارزیابی شد. سلول‌های آلوده با عرضه‌کردن آنتی‌ژن‌های HIV روی سطح خود، توسط سلول‌های CTL شناسایی و مورد حمله قرار می‌گیرند و پس از کشته‌شدن، باعث آزادسازی آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز در محیط پیرامون خود می‌شوند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق (نمودار ٤)، تفاوت پاسخ‌های القاشده توسط واکسن‌های DNAای نسبت به یکدیگر و نسبت به گروه‌های کنترل، به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. لذا می‌توان نتیجه گرفت که واکسن‌های DNAای در القای سایتوتوکسیسیتی نیز موفق نبوده‌اند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، با توجه به نتایج حاصل و موارد ذکرشده می‌توان نتیجه گرفت که واکسن‌های کاندید DNAای با فرمولاسیون‌های مختلف (به‌تنهایی و نیز فرموله‌شده با ادجوانت آلوم) در تحریک و فعال‌کردن هر دو بازوی خونی و سلولی سیستم ایمنی ناموفق بوده‌اند. با درنظرگرفتن تنوع روش‌های تزریق واکسن‌های DNAای و تاثیر آن بر میزان برداشت سازه DNAای توسط سلول‌های APC و به‌دنبال آن سایر مراحل دخیل در القای پاسخ‌های ایمنی، میزان موفقیت و کارآیی این دسته از واکسن‌ها می‌تواند بسیار متغیر باشد[39]. عدم عملکرد مناسب واکسن‌های DNAای مبتنی بر top4 در این تحقیق ممکن است ناشی از اختلال در هر یک از مراحل برداشت پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1 حاوی ژن پلی‌اپی‌توپ توسط سلول‌های APC، مسیر بیان ژن پلی‌اپی‌توپ، شناسایی و پردازش پروتئین پلی‌اپی‌توپ بیان‌شده درون سلولی توسط کمپلکس پروتئازوم و لیزوزوم و در نهایت اتصال و عرضه آنتی‌ژن‌های HIV-1-top4 توسط مولکول‌هایMHC کلاس I و II روی سطح سلول‌های APC باشد. از این رو، ممکن است استفاده از سایر روش‌های تزریق و دلیوری واکسن کاندید HIV-1-top4، که بتوانند بر برداشت وکتور حاوی این ژن توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و به‌دنبال آن پردازش و عرضه آنتی‌ژن‌های مورد نظر روی سطح این سلول‌ها و تحریک سیستم ایمنی و القای پاسخ‌های ایمنی تاثیر بگذارند، پاسخ‌های ایمنی قوی‌تری را القا کرده و کارآیی واکسن کاندید را افزایش دهند.

تشکر و قدردانی: از معاونت پژوهشی دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان به‌منظور حمایت از این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: تاییدیه اخلاقی در این پژوهش مورد نیاز نبوده است.

تعارض منافع: نویسندگان این مقاله با هیچ فرد یا گروهی تعارض منافع ندارند.

سهم نویسندگان: احسان‌الله جزایری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰%)؛ عطیه مهدوی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰%)؛ اصغر عبدلی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰%).

منابع مالی: منابع مالی این پژوهش توسط دانشگاه تحصیلات تکمیلی زنجان با شماره گرنت G2016IASBS32630 تامین شده است.

منابع

1- National AIDS Committee Secretariat. Islamic Republic of Iran Aids progress report [Internet]. Tehran: Ministry of Health and Medical Education; 2014 [cited 2016 Dec 20]. Available from: http://bit.ly/2TTiCT4

2- Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. Nature. 2008;455(7213):613-9.

3- Bazhan SI, Belavin PA, Seregin SV, Danilyuk NK, Babkina IN, Karpenko LI, et al. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. Vaccine. 2004;22(13-14):1672-82.

4- Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. Lancet. 2013;382(9903):1525-33.

5- Felber BK, Valentin A, Rosati M, Bergamaschi C, Pavlakis GN. HIV DNA vaccine: Stepwise improvements make a difference. Vaccines (Basel). 2014;2(2):354-79.

6- Lavanya J, Saxena S, Jais M, Dutta R. DNA Vaccines-A Review. Jeevanu Times. 2013;13(1):12.

7- Liu MA. DNA vaccines: A review. J Intern Med. 2003;253(4):402-10.

8- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Kuby

Archive of SID

www.SID.ir

VLP and attenuated Salmonella strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. Vaccine. 2004;22(13-14):1692-9.
24- Reguzova A, Antonets D, Karpenko L, Ilyichev A, Maksyutov R, Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. PLoS One. 2015;10(3):e0116412.
25- Mahdavi M, Ebtekar M, Azadmanesh K, Khorram Khorshid HR, Rahbarizadeh F, Yazdi MH, et al. HIV-1 Gag p24-Nef fusion peptide induces cellular and humoral immune response in a mouse model. Acta Virol. 2010;54(2):131-6.
26- Eshghjoo S, Abdoli A, Khatami Sh, Noormohammadi Z. HIV polytope candidate vaccine formulation with n-trimethyl chitosan nanoparticles as a potent delivery system. Int J Ther Appl. 2015;21:1-11.
27- Caputo A, Gavioli R, Bellino S, Longo O, Tripiciano A, Francavilla V, et al. HIV-1 Tat-based vaccines: An overview and perspectives in the field of HIV/AIDS vaccine development. Int Rev Immunol. 2009;28(5):285-334.
28- Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(1):59-82.
29- Arca HÇ, Günbeyaz M, Şenel S. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. Expert Rev Vaccines. 2009;8(7):937-53.
30- Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert Rev Vaccines. 2011;10(4):499-511.
31- Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. Vaccine. 2009;27(25-26):3331-4.
32- Krieg AM. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression. 1999;1489(1):107-16.
33- Hogen Esch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. Vaccine. 2002;20 Suppl 3:S34-9.
34- Mohan T, Verma P, Nageswara Rao D. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. Indian J Med Res. 2013;138(5):779-5.
35- Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. Curr Opin Immunol. 2000;12(1):35-43.
36- Marciani DJ. Vaccine adjuvants: Role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. Drug Discov Today. 2003;8(20):934-43.
37- Sarrami Forooshani R, Das SR, Sabahi F, Adeli A, Esmaeili R, Wahren B, et al. Molecular analysis and phylogenetic characterization of HIV in Iran. J Med Virol. 2006;78(7):853-63.
38- Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In: Thorner J, Emr SD, Abelson JN, editors. Methods in enzymology, applications of chimeric genes and hybrid proteins part A: Gene expression and protein purification. 326th Volume. Amsterdam: Elsevier; 2000. pp. 245-54.
39- Jin X, Morgan C, Yu X, De Rosa S, Tomaras GD, Montefiori DC, et al. Multiple factors affect immunogenicity of DNA plasmid HIV vaccines in human clinical trials. Vaccine. 2015;33(20):2347-53.
Immunology: W. H. Freeman; 2007.
9- Mutwiri G, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Babiuk LA. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(3):226-32.
10- O'Hagan DT. New-generation vaccine adjuvants. eLS. 2015 Jul.
11- Rosa DS, Ribeiro SP, Fonseca SG, Almeida RR, Santana VC, Apostólico Jde S, et al. Multiple approaches for increasing the immunogenicity of an epitope-based anti-HIV vaccine. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015;31(11):1077-88.
12- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
13- Barouch DH, Santra S, Steenbeke TD, Zheng XX, Perry HC, Davies ME, et al. Augmentation and suppression of immune responses to an HIV-1 DNA vaccine by plasmid cytokine/Ig administration. J Immunol. 1998;161(4):1875-82.
14- Jafarpour N, Memarnejadian A, Aghasadeghi MR, Kohram F, Aghababa H, Khoramabadi N, et al. Clustered epitopes within a new poly-epitopic HIV-1 DNA vaccine shows immunogenicity in BALB/c mice. Mol Biol Rep. 2014;41(8):5207-14.
15- Kopycinski J, Cheeseman H, Ashraf A, Gill D, Hayes P, Hannaman D, et al. A DNA-based candidate HIV vaccine delivered via in vivo electroporation induces CD4 responses toward the α4β7-binding V2 loop of HIV gp120 in healthy volunteers. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(9):1557-9.
16- Mann JK, Ndung'u T. HIV-1 vaccine immunogen design strategies. Virol J. 2015;12:3.
17- Mahdavi M, Ebtekar M, Mahboudi F, Khorram Khorshid H, Rahbarizadeh F, Azadmanesh K, et al. Immunogenicity of a new HIV-1 DNA construct in a BALB/c mouse model. Iran J Immunol. 2009;6(4):163-73.
18- Suhrbier A. Multi-epitope DNA vaccines. Immunol Cell Biol. 1997;75(4):402-8.
19- Thomson SA, Burrows SR, Misko IS, Moss DJ, Coupar BE, Khanna R. Targeting a polyepitope protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4+ cytotoxic T lymphocytes: A novel approach to vaccine design. J Virol. 1998;72(3):2246-52.
20- Korber BT, Letvin NL, Haynes BF. T-cell vaccine strategies for human immunodeficiency virus, the virus with a thousand faces. J Virol. 2009;83(17):8300-14.
21- Arabi S, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Kohram F, Aghababa H, Khoramabadi N, et al. Cloning, expression and purification of a novel multi-epitopic HIV-1 vaccine candidate: A preliminary study on immunoreactivity. Vaccine Res. 2014;1(1):10-5.
22- Karpenko LI, Ilyichev AA, Eroshkin AM, Lebedev LR, Uzhachenko RV, Nekrasova NA, et al. Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine design, immunogenicity and toxicity studies. Vaccine. 2007;25(21):4312-23.
23- Karpenko LI, Nekrasova NA, Ilyichev AA, Lebedev LR, Ignatyev GM, Agafonov AP, et al. Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial

Archive of SID
www.SID.ir