

پاسخ ایمنی موش‌های Balb/C ایمن شده با ژن‌های ملحق شده p24 و gp41 از HIV-1 به عنوان کاندید واکسن

فاطمه رودباری^۱، فرزانه صباحی^{۲*}، محمدنبی سربلوکی^۳، فرزانه برخورداری^۴،

مهدی مهدوی^۵، احمد عادل^۶، فریدون مهدوی^۶

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۴- لیسانس، گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۶- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۱۲

دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲۸

چکیده

هدف: اپیدمی جهانی ویروس نقص سیستم ایمنی انسان به‌حدی ادامه یافت که از پیش‌بینی‌های قبلی نیز فراتر رفت. امیدوارکننده‌ترین وسیله برای کاهش این اپیدمی، یک واکسن مؤثر است. واکسن‌های DNA پاسخ ایمنی همورال و سلولی را القا می‌نمایند و مشابه واکسن‌های زنده عمل می‌کنند بدون آن‌که پتانسل بیماری‌زایی آن را داشته باشند. اهمیت ایمنی سلولی در کنترل ویرمی ویروس نقص سیستم ایمنی انسان و ویروس نقص سیستم ایمنی میمون منجر به هدایت تولید یک‌سری از کاندیدهای واکسن شده است که به‌طور مؤثری این پاسخ‌ها را القا می‌نمایند. در حال حاضر اعتقاد بر این است که یک استراتژی واکسن ویروس نقص سیستم ایمنی می‌بایست هر دو پاسخ ایمنی همورال و همین‌طور سلولی را تحریک نماید. p24 و gp41 نقش‌های بسیار مهمی را در واکنش متقابل ویروس-میزبان و بیماری‌زایی بازی می‌کنند. این پروتئین‌ها به‌عنوان کاندید قابل توجه واکسن، در نظر گرفته می‌شوند چراکه آثار ایمنی‌زایی و تعدیل ایمنی آن‌ها ثابت شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پاسخ ایمنی سلولی مؤثر علیه یک ناقل بیانی (pcDNA 3.1 Hygro) حاوی توالی‌های ایمونوژنیک p24-gp41، به‌عنوان کاندید واکسن DNA در موش‌های Balb/C، ارزیابی شد. برای ایمن‌سازی از دندروزوم استفاده شد که یک خانواده جدید از وسایل انتقال برای ترانسفکشن و درمان است. میزان اینترفرون گاما و آنتی‌بادی کل، با الایزا و تقسیم سلولی نفوسیتی نیز با MTT سنجش شد.

نتایج: آزمایش الایزا و MTT تأیید نمودند که ژن الحاقی p24-gp41 قادر به افزایش پاسخ ایمنی در موش‌ها است. **نتیجه‌گیری:** ساختاری که در این تحقیق استفاده شده می‌تواند کاندید خوبی برای واکسن DNA علیه ویروس نقص سیستم ایمنی انسان نوع یک باشد اگر آزمایش‌های تکمیلی بعدی نیز همانند آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق، ایمن‌زایی این قطعات ملحق شده را تأیید نماید.

کلیدواژگان: ویروس نقص سیستم ایمنی انسان نوع یک، واکسن DNA، gp41، p24.

۱- مقدمه

ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی (Human Immunodeficiency Virus: HIV) متعلق به خانواده رتروویریده (Retroviridae) است که به‌طور انتخابی سلول‌های T⁺CD4 و ماکروفاژها را آلوده کرده و از بین

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

Email: Sabahi_F@madares.ac.ir

می‌برد، بنابراین منجر به نقص در عملکرد سیستم ایمنی و در نهایت بیماری ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) و مرگ می‌شود [۲، ۱]. این ویروس دارای دو ژنوم RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت است که ۹ کیلوباز طول داشته و حاوی ۹ ژن است که ۱۵ پروتئین مختلف را کد می‌کند. ژن‌های *gag*، *env*، *pol* در تمام رتروویروس‌ها (Retroviruses) وجود دارند و پروتئین‌های حاصل از ترجمه آن‌ها پروتئین‌های ساختمانی را ایجاد می‌کنند. پروتئین‌های دیگر شامل پروتئین‌های تنظیم‌کننده (Rev، tat) و پروتئین‌های کمک‌کننده (*nef*، *vif*، *vpr*، *vpu*) هستند [۳-۶]. براساس تفاوت‌هایی که در توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم این ویروس وجود دارد آن را به HIV-1 و HIV-2، تقسیم‌بندی نموده‌اند. HIV از طریق خون یا محصولات خونی آلوده، تماس جنسی یا با استفاده از سوزن‌ها یا وسایل جراحی آلوده انتقال می‌یابد. انتقال از مادر به فرزند و حتی فرزند به مادر نیز محتمل است [۳، ۴، ۷].

AIDS اولین بار در سال ۱۹۸۱ شرح داده شد، اما بررسی‌های سرولوژی و اپیدمیولوژی نشان داد، این بیماری در همه کشورهای جهان به سرعت انتشار یافته است [۴]. به‌طوری‌که در حال حاضر هیچ کشوری در دنیا عاری از HIV نیست [۲]. براساس تخمینی، تاکنون ۶۰ میلیون نفر با HIV آلوده شده‌اند که از این‌ها نزدیک به ۲۲ میلیون نفر جان خود را از دست داده‌اند [۸]. تقریباً در هر روز ۱۶۰۰۰ عفونت جدید اتفاق می‌افتد که ۹۵ درصد از آن در کشورهای در حال توسعه است [۹]. اولین مورد HIV در ایران در سال ۱۹۸۷ گزارش شده است. پس از آن، تعداد زیادی موارد شناسایی شدند [۱۰، ۱۱]. طبق آخرین گزارش سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) در سال ۲۰۰۶ بالغ بر ۶۶۰۰۰ (۳۶۰۰۰-۱۶۰۰۰۰) فرد آلوده به HIV در ایران وجود داشته و بالغ بر ۱۶۰۰ (۹۲۰-۲۷۰۰) نفر مرگ ناشی از AIDS گزارش شده است [۱۲]. به‌علت وضعیت هشداردهنده HIV/AIDS در ایران، کنترل و مهار این بیماری جز مسائل مهم بهداشتی کشور تلقی می‌شود. مطالعات بالینی نشان داده است که داروهای ضد رتروویروسی کنونی به‌طور کامل نمی‌توانند افراد آلوده به ویروس را پاک‌سازی نمایند و نیز با مصرف دارو، واریانت‌های مقاوم دارو تولید می‌شود

[۹، ۱۳، ۱۴]. همچنین درمان‌های ضد ویروس گران بوده و نمی‌تواند این میزان بسیار زیاد افراد آلوده را پوشش دهد. این مسائل نشان می‌دهد، پاندمی AIDS در قرن آینده در کشورهای در حال توسعه به نسبت وحشتناک و گیج‌کننده‌ای خواهد رسید [۱۴]. بنابراین تنها راه برای رهایی از این موقعیت غم‌انگیز و توقف اپیدمی AIDS تولید و توسعه یک واکسن مؤثر است [۹، ۱۳-۱۵]. از لحاظ تاریخی، واکسیناسیون علیه عوامل عفونی، راهکار مؤثری برای بهبود بهداشت بوده است. واکسن‌های موفقیت‌آمیزی چون واکسن پولیومیلیت (Poliomyelitis) حاوی ارگانسیم‌های ضعیف شده یا غیرفعال شده بوده‌اند، اما این روش‌ها برای تولید یک واکسن پیشگیری‌کننده HIV بسیار خطرناک هستند، چرا که این ویروس به علت میزان جهش بالا و توانایی نوترکیب، می‌تواند به تیپ وحشی بازگردد. بنابراین رایج‌ترین و معمول‌ترین استراتژی برای واکسن AIDS استفاده از زیرواحدهای ویروسی به عنوان ایمونوژن‌هاست (Immunogenes) که یا به‌صورت پروتئین‌های کامل یا ژن‌هایی که می‌توانند پروتئین‌های ویروسی را بیان نمایند، است [۱۶]. یکی از واکسن‌های زیرواحدی که برای HIV طراحی شده است واکسن‌های پلاسمید DNA است. اساساً واکسن‌های DNA در پیشگیری از بیماری‌های عفونی که تا کنون هیچ واکسنی برای آن‌ها وجود ندارد، استفاده می‌شود [۱۷] و به‌عنوان یک تکنولوژی مهم واکسیناسیون در نظر گرفته می‌شود [۱۸]. واکسن‌های DNA حاوی DNA پلاسمید باکتریایی است که ایمونوژن خاص و مناسبی را کد می‌کنند و مستقیماً به میزبان حمل می‌شوند [۸، ۱۷، ۱۸]. به‌عبارت دیگر در این نوع واکسن‌ها، قسمتی از عامل بیماری‌زا (Pathogen) یا واحدهای غیرفعال شده‌ای از آن به‌جای کل عامل بیماری‌زای زنده، به‌کار برده می‌شود [۱۹]. واکسن‌های DNA، واکسن‌های نسل سوم هستند. برتری اصلی این واکسن بر پایه این حقیقت است که پروتئین، توسط سلول میزبان بیان می‌شود. در نتیجه بیان آنتی‌ژن طولانی مدت است و همچون عامل مؤثری است که به‌مدت طولانی زنده بوده و فعال است [۲۰]. برخلاف واکسن‌های پروتئینی زیرواحدی، واکسن‌های DNA وسیله مؤثری برای افزایش ایمنی سلولی است چرا که آنتی‌ژن‌ها، درون سلول‌های میزبان تولید می‌شوند و بنابراین از مسیر

به منظور کاندید واکسن های HIV خواهند بود [۱، ۶، ۲۱، ۳۱]. در این تحقیق آثار پلاسمید pcDNA3.1Hygro بر پاسخ ایمنی در موش های تزریق شده با این ناقل، بررسی شد. پلاسمید pcDNA3.1Hygro حاوی قطعات ملحق شده بخش هایی از پروتئین های p24 و gp41 (از HIV-1) بود که برای اولین بار تهیه شده تا به عنوان کاندید واکسن بررسی شود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- پلاسمیدها

ساختاری از قطعات ملحق شده p24 و gp41-HIV-1 تهیه شد که در آن از قسمتی از gp41 (۲۰۲-۳۰۹) و p24 (۱-۶۹۳) استفاده شد و در ناقل pcDNA3.1Hygro کلون شدند. در طراحی آغازگر (Primer)، علاوه بر محل آنزیمی KpnI و XhoI، توالی کوزاک (Kozak sequence) نیز برای بالا بردن میزان بیان، گنجانده شد. به منظور کنترل منفی نیز از کلون نمودن یکی از قطعات (gp41) استفاده شد، بدین ترتیب ساختار دیگری نیز تهیه شد.

پلاسمید pcDNA3.1Hygro و ساختارهای (p24-gp41) pcDNA3.1Hygro (gp41) و pcDNA3.1Hygro، به روشی اشرشیاکلی گونه Top10 F' ترانسفرم شدند. تخلیص ناقل ها در مقیاس بالا (Large-scale) با استفاده از کیت مگا اندوتوکسین فیری (EndoFree Plasmid Mega Kit) (QIAGEN، آلمان) مطابق دستور کارخانه سازنده، انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل غلظت، کیفیت و اندازه DNA به دست آمده، محصولات با اسپکتروفتومتر خوانده و نسبت جذب نوری (Optical Density: OD) ۲۶۰/۲۸۰ بررسی شد و نیز محصولات در ژل آگارز نمونه گذاری شدند. پلاسمیدهای تخلیص شده در آب عاری از اندوتوکسین حل و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۲- حیوان آزمایشگاهی

موش های Balb/C ماده ۶-۸ هفته ای استفاده شد (انستیتو پاستور کرج- ایران). موش ها بر طبق راهنمای مراقبت از

(Major Histocompatibility Complex class I) MHC-I پردازش می شوند [۱۶، ۱۹، ۲۱، ۲۲]. همچنین پروتئین های ترشح شده نیز می توانند در دسترس سلول های حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن (Antigen-presenting cells: APCs) قرار گیرند و مسیر پردازش MHC-II نیز فعال شود [۲۰، ۲۱]. سخن آخر این که مطالعات زیادی نشان داده اند که یک واکسن پیشگیری کننده مؤثر و ایمن برای HIV، می بایست به میزان زیادی آنتی بادی های خنثی کننده و پاسخ های بالقوه ایمنی به واسطه سلولی را افزایش دهد که همه این اهداف، با واکسن های DNA قابل دسترسی است [۲۳-۲۷].

همان طور که قبلاً گزارش شده، دندروزوم ها (Dendrosomes) یک خانواده جدید از نانوذره (Nanoparticle) کروی هستند که غیرسمی (Nontoxic) طبیعی، کوآلانت یا خود سرهم شوند، پر شاخه، دندریتیک (Dendritic)، قابل تجزیه شدن بوده و ساخت و آماده سازی آن ها آسان است. علاوه بر این ارزان قیمت و بسیار پایدار بوده و کار و استفاده از آن ها در مقایسه با سایر حمل کننده های سنتز شده DNA [لیپیدهای کاتیونیک، لیپوزوم ها (Liposomes)] آسان است. دندروزوم ها چندین نسل دارند که شامل Den123، Den450 و Den700 است. آزمایش های متعددی نشان دادند که دندروزوم در مقایسه با سایر حاملین ژن مثل لیپوفکشن (Lipofection)، در ارائه ژن به سلول های هدف کاملاً کارآمد عمل می نماید [۲۸، ۲۹].

پروتئین های p24 (آنتی ژن هسته) و gp41 (آنتی ژن پوشش) نقش های مهمی در واکنش متقابل ویروس-میزبان و بیماریزایی ویروس دارند. تحقیقات نشان داده که آنتی بادی های خنثی کننده اختصاصی گروه (یعنی اختصاصی برای طیف وسیعی از ایزوله های ویروسی)، اپی توپ های درون پروتئین gp41 را شناسایی می کنند [۳۰، ۳۱]. از طرفی گفته می شود پاسخ های سلول T کمکی و لنفوسیت های T سیتوتوکسیک (Cytotoxic T Lymphocytes: CTL) و یژه gag با بار (Load) ویروسی رابطه عکس دارند و نیز ارتباطی بین کاهش آنتی بادی و پاسخ های CTL علیه p24 و تغییر شرایط بالینی از مرحله بدون علامت به مرحله علامت دار (پیشرفت بیماری) و ویرمی وجود دارد. با توجه به اهمیت این دو قطعه، ایمونوژن های مشتق شده از این قطعات، ترکیبات با ارزشی

حیوانات انستیتو پاستور، نگهداری شدند.

بدین ترتیب گروه‌ها به فرم زیر نام‌گذاری شدند:

سری ۱: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro را دریافت نمودند.
سری ۲: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعات ملحق شده *p24-gp41* را دریافت نمودند.
سری ۳: گروهی که PBS استریل را دریافت نمودند.
سری ۴: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعه ملحق شده *gp41* را دریافت نمودند.
سری ۵: گروهی که دندروزوم استریل را دریافت نمودند.

۲-۳- برنامه تزریق

تزریق اول در زمان صفر و تزریق بعدی ۴ هفته بعد انجام شد و ۴ هفته بعد نیز موش‌ها قربانی شدند. در هر تزریق ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمیدهای تخلیص شده به همراه دندروزوم با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد. نحوه تزریق، داخل ماهیچه‌ای بوده که به هر دو ماهیچه چهار سر ران موش‌ها (به هر کدام ۵۰ میکرولیتر) تزریق شد.

۲-۷- جمع‌آوری سرم

موش‌ها از قسمت رترو-اریتال (Retro-orbital area) خون‌گیری شدند و سرم‌ها از نمونه‌های خون کامل از هر موش با انکوباسیون نمونه خون به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس سانتریفیوژ آن (۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه) تهیه شد. سرم‌های هر گروه مخلوط شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۴- Den 123

Den 123 که تحت شرایط استریل تهیه شده بود (دکتر سربلوکی، IBB دانشگاه تهران) با بافر فسفات سالیین (Phosphate Buffered Saline: PBS) مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. پس از این مدت، سوسپانسیون حاصل با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. محصول در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۸].

۲-۸- سنجش میزان ترشح سیتوکین (Cytokine)

در محیط آزمایشگاهی

در انتهای دوره آزمون، موش‌ها قربانی شدند و طحال آن‌ها در شرایط استریل خارج شد. طحال هر موش به‌طور جداگانه همگن شد و گلبول‌های قرمز در دمای اتاق با بافر لیزکننده، لیز شد. سلول‌های طحال شستشو داده شد و در محیط غنی شده RPMI (محیط RPMI-1640 (Gibco، آلمان) همراه با FCS ۱۰ درصد (که با حرارت غیرفعال شده)، ال-گلوتامین ۱ درصد، HEPES (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) ۴-۲ درصد، ۲ME (2-mercaptoethanol) ۰/۱ درصد و pen strep ۱ درصد (Gibco، آلمان) قرار داده شدند. سلول‌ها با غلظت 5×10^5 سلول در هر چاهک (ظرف‌های ۹۶ خانه‌ای griner، آلمان) در حضور و عدم حضور ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین خالص *p24-gp41* (انستیتو پاستور کرج-ایران) تقسیم شدند. برای کنترل مثبت نیز از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، فیتوهمآگلوتنین (Phytohaemagglutinin: PHA) (Gibco آمریکا) استفاده شد. ظرف‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

۲-۵- آماده سازی پلاسمید- نانوذره Den 123

۱۰۰ میکروگرم از پلاسمیدها با مقادیر مناسب از Den 123 درست قبل از تزریق مخلوط شد (نسبت پلاسمید به Den 123، ۱۵۰ به ۱ است). مخلوط حاصل ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس تزریق انجام شد [۲۸، ۳۲].

۲-۶- گروه‌بندی موش‌ها

۵۰ موش به ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم و هر گروه با یکی از رژیم‌های زیر (حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر) ایمن شدند: ۱۰۰ میکروگرم از ناقل pcDNA3.1Hygro، ۱۰۰ میکروگرم از ناقل مذکور که حاوی دو قطعه ملحق شده از ایمپوزن‌های *p24* و *gp41* است و ۱۰۰ میکروگرم از ناقل pcDNA3.1Hygro که حاوی تنها یکی از دو قطعه ملحق شده است (*gp41*). این سه ناقل به‌نحوی که در بند ۵ ذکر شد، با دندروزوم آماده تزریق شدند. دو گروه دیگر عبارتند از گروهی که PBS و دندروزوم را دریافت نمودند و

با ۵ درصد CO_2 و اتمسفر مرطوب انکوبه شدند. محلول رویی این چاهک‌ها بعد از ۳ روز جمع‌آوری و در دمای $70^\circ C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان اینترفرون گاما ($Interferon-gamma$: IFN- γ) محلول رویی فوق با استفاده از کیت ساندویچ-الایزا (R&D آمریکا) مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده، سنجش شد [۲۸، ۳۳].

۹-۲- سنجش تقسیم سلولی نفوسیتی

با روش MTT سلول‌های طحالی از نظر پاسخ‌های تقسیم سلولی نفوسیتی، اختصاصی آنتی‌ژن ارزیابی شدند. بدین منظور، همانند سنجش میزان ترشح سیتوکین در محیط آزمایشگاهی عمل شد با این تفاوت که پس از ۳ روز به چاهک‌ها مقدار ۲۵ میکرولیتر از محلول فیلتر شده $3-(4,5,6,7-tetramethyl-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)$ (MTT, Sigma) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و اتمسفر مرطوب، محلول رویی چاهک‌ها به آرامی خارج و رسوب‌های بنفش رنگ تولید شده (فورمازان) با اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide: DMSO) حل شدند. میزان OD در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد [۳۳، ۳۴].

۱۰-۲- سنجش ایمنی همورال

تیترا آنتی‌بادی اختصاصی p24-gp41 سرم، با الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ارزیابی شد. پس از انجام آزمون چکر بورد (Checker board)، آزمون ELISA راه‌اندازی شد که به‌طور خلاصه به شرح زیر است: میکروظرف‌های ۹۶ خانه‌ای (High Binding ELISA Strip Plates) (griner، آلمان) با پروتئین خالص p24-gp41 به غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر کربنات بیکربنات (هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر) پوشش (Coat) و سپس با پارافیلیم پوشیده و یک شبانه روز در دمای $4^\circ C$ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. ظرف‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو [PBS حاوی ۰/۰۵ درصد تویین ۲۰ (Tween 20)]، سه مرتبه شستشو داده و سپس با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مسدودکننده [PBS حاوی ۱

درصد BSA (Bovine Serum Albumin)] به مدت ۲/۵ ساعت در دمای اتاق، مسدود شدند. نمونه‌های سرم هر گروه یک به پنجاه رقیق شدند. پس از آن که چاهک‌ها، مجدداً سه مرتبه شستشو داده شدند، سرم‌های رقیق شده به چاهک‌ها با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شدند. ظرف‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس شستشو داده شدند. پس از آن، به چاهک‌ها به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگ HRP rabbit anti-mouse IgG (رازی فرابط، تهران، ایران) که یک به ۴۰۰۰ رقیق شده اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از TMB ($3,3',5,5'-tetramethylbenzidine$) (رازی فرابط، تهران، ایران) به چاهک‌ها اضافه شد. واکنش، پس از ۳۰ دقیقه با اسید سولفوریک ۲ نرمال متوقف شد. OD در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه سنجش ELISA (ELISA Reader) خوانده شد [۲۸، ۳۳، ۳۵].

۱۱-۲- تجزیه و تحلیل آماری

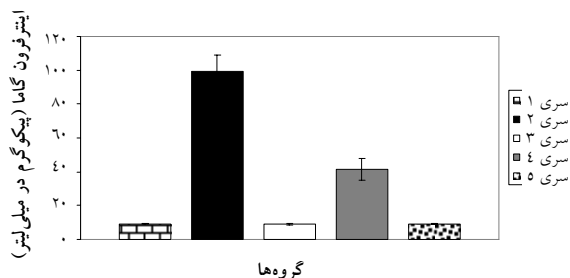
پس از جمع‌آوری داده‌های خام، در ابتدا آزمون نرمالیتی به وسیله آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. در صورت نرمال بودن، برای مقایسه کلی بین گروه‌ها از آزمون آنوای یک‌طرفه (one-Way ANOVA) در سطح ۹۵ درصد اطمینان و برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آزمون توکی استفاده شد. در صورت غیرنرمال بودن داده‌ها اقدام به نرمال کردن داده‌ها شد و در صورت نرمال نشدن از آزمون‌های غیرپارامتریک کروسکال والیس (Kruskal-Wallis) در نرم‌افزار SPSS ویرایش پانزدهم استفاده شد. همه داده‌ها به‌صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شدند [۳۳].

۳- نتایج

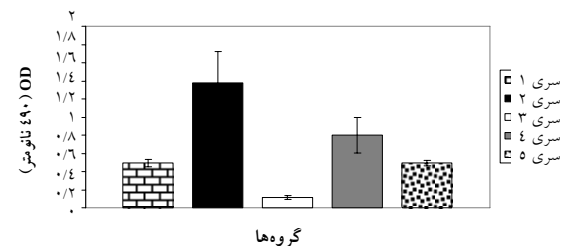
۱-۳- تقسیم سلولی نفوسیتی

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، یک سطح پایه‌ای از تقسیم سلولی در سلول‌های طحال موش‌های کنترل با شاخص تحریک (Stimulating Index: SI) (نسبت میزان سلول‌های تکثیر یافته به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک به سلول‌های

شده $p24-gp41$ را دریافت نموده است ($1/372 \pm 0/349$). پس از این گروه، گروه ۴ OD بالایی را نشان داده است ($0/8 \pm 0/19$). مقادیر OD در گروه‌های اول، سوم و پنجم به ترتیب $0/497 \pm 0/02$ ، $0/112 \pm 0/03$ و $0/49 \pm 0/03$ است.



شکل ۲ ترشح میزان IFN- γ در محلول روی سلول‌های تحریک شده طحال. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین نشان داده شده است. سری ۱: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro را دریافت نمودند؛ سری ۲: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعات ملحق شده $p24-gp41$ را دریافت نمودند؛ سری ۳: گروهی که PBS استریل را دریافت نمودند؛ سری ۴: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعه ملحق شده $gp41$ را دریافت نمودند؛ سری ۵: گروهی که دندروزوم استریل را دریافت نمودند.

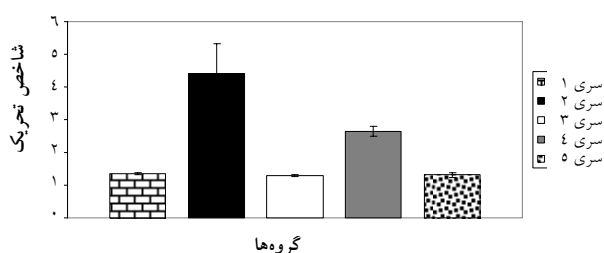


شکل ۳ پاسخ ایمنی همورال در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین نشان داده شده است. سری ۱: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro را دریافت نمودند؛ سری ۲: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعات ملحق شده $p24-gp41$ را دریافت نمودند؛ سری ۳: گروهی که PBS استریل را دریافت نمودند؛ سری ۴: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعه ملحق شده $gp41$ را دریافت نمودند؛ سری ۵: گروهی که دندروزوم استریل را دریافت نمودند.

۴- بحث

پاندمی AIDS به حدی پیشرفت نموده که یکی از بزرگترین بیماری‌های عفونی شده است که سلامت بشر و ثبات جامعه جهانی را تهدید می‌کند. حدود ۴۲ میلیون نفر در جهان به HIV-1 آلوده‌اند که بسیاری از آنها به سمت AIDS پیشرفت می‌نمایند. اگرچه درمان‌های ضد رتروویروسی مؤثری به امید کنترل تکثیر ویروسی تولید شده اما هزینه بالای ساخت داروها باعث شده که در ۹۰ درصد

کنترل) $1/36 \pm 0/034$ و $1/29 \pm 0/029$ و $1/32 \pm 0/077$ به ترتیب برای گروهی که ناقل (pcDNA3.1Hygro) تنها و PBS و دندروزوم را دریافت نمودند، مشاهده شد. میزان SI در گروهی که ناقل حاوی قطعه $gp41$ را دریافت نمودند، افزایش کم اما معنی‌داری را نشان داد ($2/65 \pm 0/144$) و بالاخره SI در گروهی که ناقل حاوی قطعات ملحق شده $p24-gp41$ را دریافت نمودند با افزایشی مناسب به میزان $4/40 \pm 0/928$ رسید.



شکل ۱ نتیجه آزمون تقسیم سلولی لنفوسیتی. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین نشان داده شده است. سری ۱: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro را دریافت نمودند؛ سری ۲: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعات ملحق شده $p24-gp41$ را دریافت نمودند؛ سری ۳: گروهی که PBS استریل را دریافت نمودند؛ سری ۴: گروهی که ناقل pcDNA3.1Hygro حاوی قطعه ملحق شده $gp41$ را دریافت نمودند؛ سری ۵: گروهی که دندروزوم استریل را دریافت نمودند.

۳-۲- سطح IFN- γ

سطح IFN- γ در محلول روی سلول‌های طحالی که تحریک مجدد شدند، ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده، هر چند که در گروه چهار، میزان این سیتوکین افزایش معنی‌داری را نشان داده ($41/4 \pm 6/61$) اما در گروه دو، نسبت به گروه‌های دیگر، افزایش چشمگیری را نشان داده است ($99/2 \pm 9/67$). مقادیر IFN- γ به ترتیب در گروه‌های اول، سوم و پنجم $9/16 \pm 0/28$ و $9/2 \pm 0/56$ ، $9/162 \pm 0/21$ شده است.

۳-۳- آنتی‌بادی کل

با استفاده از آزمون ELISA، پاسخ همورال علیه ناقل‌های تزریق شده در سرم موش‌های ایمن شده، ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بالاترین مقدار OD مربوط به گروه ۲ است که ناقل حاوی دو قطعه ملحق

کاندید واکسن، استفاده شده است. علت استفاده از بخش‌های انتخاب شده از این دو پپتید، وجود تعداد مناسبی اپی‌توپ‌های محرک سلول‌های B و به‌ویژه سلول‌های T در آن‌ها بوده است که برخی از این اپی‌توپ‌ها در تحقیقات قبلی استفاده شده و شایستگی آن‌ها در تحریک سیستم ایمنی تأیید شده است [۴۱-۴۳].

در این تحقیق نشان داده شد که گروهی از موش‌های Balb/C که pcDNA3.1/Hygro حاوی قطعات ملحق شده *p24* و *gp41* را دریافت نمودند، هم در آزمون MTT که تقسیم سلولی لنفوسیتی را می‌آزماید و هم در آزمون ساندویچ-الایزا که با آن میزان $\text{IFN-}\gamma$ سنجیده شد، تفاوت معنی‌دار قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند که این تأثیر می‌تواند به علت حضور اپی‌توپ‌های متعدد محرک سلول‌های T موجود در این دو قطعه باشد. هرچند گروهی که ناقل حاوی *gp41* را دریافت نمودند نیز نسبت به گروه‌های کنترل، افزایش معنی‌داری را در هر دو آزمون مذکور، نشان داده اما همواره کمتر از میزان مشابه در گروه ۲ بوده است چرا که اندازه این قطعه و در نتیجه تعداد اپی‌توپ‌های موجود به‌ویژه اپی‌توپ‌های محرک سلول‌های T در آن نیز کمتر است، بنابراین تحریک کمتری را سبب شده است که این اثر در تولید $\text{IFN-}\gamma$ مشهودتر بوده است. طبق مطالعه‌ای که در فوق به آن اشاره شد، افزایش پاسخ ایمنی همورال در همراهی دو پپتید *gag* و *env* با هم قابل پیش‌بینی بوده است [۳۹]. بنابراین بالاتر بودن میزان آنتی‌بادی کل در گروه دو نیز توجیه می‌شود.

سخن آخر این‌که هدف از این تحقیق، استفاده از این دو قطعه به‌عنوان کاندید واکسن برای HIV-1 بوده است. با توجه به نتایج آزمایش‌های این مطالعه، ایمن‌زایی و هم‌افزایی عملکرد این دو قطعه در کنار هم، که پیش‌فرض این مطالعه نیز بوده، تأیید شده است، بنابراین می‌توان به محقق شدن این هدف امید داشت و با اطمینان بیشتری به بررسی‌های تکمیلی این قطعات پرداخت تا بتوان آن‌را به‌عنوان واکسن DNA بهینه‌سازی نمود.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از همکاران محترم خانم رزیتا عدالت و آقایان رضوان ذبیح‌الهی و عباس جمالی بابت کمک‌های بی‌دریغشان در این مرحله از تحقیق، تقدیر و تشکر نمایند.

کشورهای مبتلا، این داروها در دسترس نباشند. به همراه انتشار گسترده HIV در بسیاری از قسمت‌های جهان، تولید مقاومت ویروس‌ها نسبت به درمان‌های ضد رتروویروسی و مشکلاتی که در اجرای درمان‌های دارویی در کشورهای توسعه نیافته با آن مواجه هستند، منجر به درک این حقیقت شده که ناگزیر به تولید یک واکسن پیشگیری‌کننده یا درمانی برای کنترل پاندمی HIV هستیم [۳۶]. براساس برآوردی، یک واکسن مفید و مؤثر ضد AIDS می‌تواند از بروز ۱۶۰۰۰ عفونت جدید HIV در هر روز جلوگیری کند. واکسن AIDS علاوه بر نجات زندگی انسان‌ها، می‌تواند سرمایه هنگفتی را در کشورهای در حال توسعه ذخیره نماید [۳۷].

فعال‌سازی و تکثیر لنفوسیت‌های T نقش اساسی را در القای هر دو پاسخ ایمنی بازی می‌نماید. از طریق القای تکثیر سلول‌های B فعال شده با آنتی‌ژن، بر ایمنی همورال و نیز با القای تکثیر لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک CD8^+ بر پاسخ ایمنی سلولی اثر می‌گذارد [۳۳]. بنابراین بررسی میزان تقسیم سلولی لنفوسیتی، روش مناسبی برای ارزیابی پاسخ ایمنی تولید شده است. از طرفی با سنجش میزان $\text{IFN-}\gamma$ نیز به ارزیابی مشابهی دست خواهیم یافت. به‌علاوه تا حدودی جهت ایمنی به سمت Th1 (T helper 1) نیز تأیید می‌شود که خود تأییدی بر فعالیت سلول‌های T است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، دو پروتئین *p24* و *gp41*، نقش‌های مهمی را در بیماری‌زایی HIV ایفا می‌نمایند و ایمنی علیه آن‌ها نیز در روند بیماری مؤثر است؛ بنابراین بدون شک مطالعه و تحقیق روی این قطعات بسیار ارزشمند خواهد بود. همچنین در برخی از مطالعات، نشان داده شد که علی‌رغم وجود اپی‌توپ‌های سلول B که در پپتید *p24* وجود دارد، در مقایسه با سایر پپتیدها، پاسخ آنتی‌بادی نسبتاً پایین‌تری را نشان می‌دهد؛ بنابراین کاندیدی از واکسن HIV که شامل نواحی *gag* که پروتئین‌های پوشش نیز به آن اضافه شده، باشد، احتمالاً آثار بیشتری را نشان خواهد داد [۳۸، ۳۹]. از طرفی تحقیقاتی که در حال حاضر در راستای ساخت واکسن، در حال انجام است بر القای هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولار متمرکز شده‌اند [۴۰] به همین دلایل، در این مطالعه برای اولین بار، از ساختاری که حاوی دو قطعه ملحق شده بخشی از ژن پروتئین‌های مذکور بوده است به عنوان

۶- منابع

- [1] Goto T, Nakai M, Ikuta K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron* 1998; 29(2-3): 123-38.
- [2] UNAIDS/WHO. Report on the global HIV/AIDS epidemic. December 2007. UNAIDS/WHO, Geneva, Switzerland.
- [3] Hare CB. Clinical overview of HIV Disease. HIV in site knowledge base chapter, January 2006, <http://hivinsite.ucsf.edu>.
- [4] Fomsgaard A. HIV-1 DNA vaccines. *Immunol Lett* 1999; 65(1-2): 127-31.
- [5] Girard MP, Osmanov SK, Kieny MP. A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 2006; 24(19): 4062-81.
- [6] Knipe David M, Howley Peter M. *Fields virology*. 4th ed, USA, Lippincott Williams&Wilkins, 2001 p: 1941-2041.
- [7] Mofenson LM, Fowler MG. Interruption of materno-fetal transmission. *AIDS* 1999; 13 Suppl A: S205-14.
- [8] Zinckgraf JW, Silbart LK. Modulating, gene expression using DNA vaccines with different 3'-UTRs influences antibody titer, seroconversion and cytokine profiles. *Vaccine* 2003; 21(15): 1640-9.
- [9] Stambas J, Brown SA, Gutierrez A, Sealy R, Yue W, Jones B, Lockey TD, Zirkel A, Freiden P, Brown B, Surman S, Coleclough C, Slobod KS, Doherty PC, Hurwitz JL. Long lived multi-isotype anti-HIV antibody responses following a prime-double boost immunization strategy. *Vaccine* 2005; 23(19): 2454-64.
- [10] <http://www.youandaids.org>
- [11] Tavoosi A, Zaferani A, Enzevaei A, Tajik P, Ahmadinezhad Z. knowledge and attitude towards HIV/AIDS among Iranian students. *BMC Public Health* 2004; 4: 17.
- [12] UNAIDS/WHO. Report on the global HIV/AIDS epidemic. Islamic Republic of Iran. December 2006.
- [13] Calarota SA; Weiner DB. Present status of human HIV vaccine development. *AIDS* 2003; 17suppl 4: S73-84.
- [14] Duarte Cano CA. The multiple-epitope polypeptide approach in HIV-1 vaccine development. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1999; 15(3): 149-53.
- [15] Xiao Y, Lu Y, Chen YH. Epitope-vaccine as a new strategy against HIV-1 mutation. *Immunol lett* 2001; 77(1): 3-6.
- [16] Giri M, Ugen KE, Weiner DB. DNA Vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(2): 370-89.
- [17] Schalk JAC, Hegger I, Jongen PMJM. Gene therapeutics and DNA vaccines, Quality and regulatory aspects. *rivm* 2001.
- [18] Kim JJ, Nottingham LK, Wilson DM, Bagarazzi ML, Tsai A, Morrison LD, Javadian A, Chalian AA, Agadjanyan MG, Weiner DB. Engineering DNA vaccines via co-delivery of co-stimulatory molecule genes. *Vaccine* 1998; 16(19): 1828-35.
- [19] Estcourt MJ, McMichael AJ, Hanke T. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol Rev* 2004; 199:144-55.
- [20] Wild J, Bojak A, Deml L, Wagner R. Influence of polypeptide size and intracellular sorting on the induction of epitope-specific CTL responses by DNA vaccines in a mouse model. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1732-43.

- [21] Farfan Arribas DJ. DNA vaccines against HIV-1: augmenting immunogenicity of gp120. A thesis presented at Worcester Polytechnic Institute, December 2001.
- [22] <http://focosi.altervista.org>
- [23] Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *J Virol* 2000; 74(14): 6278-86.
- [24] McMichael A, Mwau M, Hanke T. HIV T cell vaccines, the importance of clades. *Vaccine* 2002; 20(15): 1918-21.
- [25] Bazhan SI, Belavin PA, Seregin SV, Danilyuk NK, Babkina IN, Karpenko LI, Nekrasova NA, Lebedev LR, Ignatyev GM, Agafonov AP, Poryvaeva VA, Aborneva IV, Ilyichev AA. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1672-82.
- [26] http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/ctl_search.
- [27] Muthumani K, Kudchodkar S, Zhang D, Bagarazzi ML, Kim JJ, Boyer JD, Ayyavoo V, Pavlakis GN, Weiner DB. Issues for improving multiplasmid DNA vaccines for HIV-1. *Vaccine* 2002; 20(15): 1999-2003.
- [28] Balenga NA, Zahedifard F, Weiss R, Sarbolouki MN, Thalhamer J, Rafati S. Protective efficiency of dendrosomes as novel nano-sized adjuvants for DNA vaccination against birch pollen allergy. *J Biotechnol* 2006; 124(3): 602-14.
- [29] Sarbolouki MN, Sadeghizadeh M. Dendrosomes: a novel family for transfection and therapy. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2000; 75: 919-22.
- [30] Usami O, Xiao P, Ling H, Liu Y, Nakasone T, Hattori T. Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1-infected patients. *Microbes and Infect* 2005; 7(4): 650-7.
- [31] Janvier B, Baillou A, Archinard P, Mounier M, Mandrand B, Goudeau A, Barin F. Immune response to major epitope of p24 during infection with human immunodeficiency virus type 1 and implication for diagnosis and prognosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(3): 488-92.
- [32] Karimi A, Sarbolouki MN, Khatami F, Rastgoo N. Short Communication, CpG motif as an adjuvant in immunization of a recombinant plasmid encoding hepatitis C virus core protein. *Ir J Biotechnol* 2005; 3(1): 64-6.
- [33] Wang FX, Sun YT, Wang LX, Liu J. HIV-1 DNA vaccine with adjuvant cytokines induces specific immune responses against HIV-1 infection in mice. *Chin Med J(Engl)* 2006; 119(12): 1034-37.
- [34] Jin H, Li Y, Ma Z, Zhang F, Xie O, Gu D, Wang B. Effect of chemical adjuvants on vaccination. *Vaccine* 2004; 22(21-22): 2925-35.
- [35] Bolesta E, Gzyl J, Wierzbicki A, Kmiecik D, Kowalczyk A, Kaneko Y, Srinivasan A, Kozbor D. Clustered epitopes within the Gag-Pol fusion protein DNA vaccine enhance immune responses and protection against challenge with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 Gag and Pol antigens. *Virology* 2005; 332(2): 467-79.
- [36] Gómez CE, Abaitua F, Rodriguez D, Esteban M. Efficient CD8+ T cell response to the HIV-

- env V3 loop epitope from multiple virus isolates by a DNA prime/vaccinia virus boost(rWR and MVA strains) immunization regime and enhancement by the cytokine IFN-gamma. *Virus Res* 2004;105(1): 11-22.
- [37] MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Tebas P, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, Weiner DB. Plasmid vaccination of stable HIV-positive subjects on antiviral treatment results enhanced CD8 T-cell immunity and increased control of viral "blips". *Vaccine* 2005; 23(17-18): 2066-73.
- [38] Qiu JT, Song R, Dettenhofer M, Tian C, August T, Felber BK, Pavlakis GN, Yu XF. Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *J Virol* 1999; 73(11): 9145-52.
- [39] Agrawal L, Haq W, Hanson CV, Rao DN. Generating neutralizing antibodies, Th1 response and MHC non restricted immunogenicity of HIV-I env and gag peptides in liposomes and ISCOMs with in-built adjuvanticity. *J Immune Based Ther Vaccines* 2003; 1(1): 5.
- [40] Shinoda K, Xin KQ, Jounai N, Kojima Y, Tamura Y, Okada E, Kawamoto S, Okuda K, Klinman D, Okuda K. Polygene DNA vaccine induces a high level of protective effect against HIV-vaccinia virus challenge in mice. *Vaccine* 2004; 22(27-28): 3676-90.
- [41] Wild J, Bojak A, Deml L, Wagner R. Influence of polypeptide size and intracellular sorting on the induction of epitope-specific CTL responses by DNA vaccines in a mouse model. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1732-43.
- [42] Bazhan SI, Belavin PA, Seregin SV, Danilyuk NK, Babkina IN, Karpenko LI, Nekrasova NA, Lebedev LR, Ignatyev GM, Agafonov AP, Poryvaeva VA, Aborneva IV, Ilyichev AA. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1672-82.
- [43] Muthumani K, Bagarazzi M, Conway D, Hwang DS, Manson K, Ciccarelli R, Israel Z, Montefiori DS, Ugen K, Miller N, Kim J, Boyer J, Weiner DB. A Gag-Pol/Env-Rev SIV239 DNA vaccine improves CD4 counts, and reduce viral loads after pathogenic intrarectal SIV(mac)251challenge in rhesus Macaques. *Vaccine* 2003; 21(7-8): 629-37.