Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(106): 32-43

Immunological Assessment of Three Tandem Repeat of Influenza Virus M2 Extracellular Domain with Adjuvant in Balb/c Mice Model

Hadiseh Shokouhi[1], Mohammad Reza Zolfaghari[2], Behrokh Farahmand[3], Mansooreh Tabatabaeian[4], Najmeh Taheri[5], Fatemeh Fotouhi[6]*

1- MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University,Qom, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
3- Assistant Professor, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
4- Laboratory Expert, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
5- MSc in Cellular and Molecular Biology, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
6- Associate Professor, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 12 Jul 2015, Accepted: 4 Nov 2015

Abstract

Background: Influenza A viruses are globally important respiratory pathogens which cause a high degree of morbidity and mortality during annual epidemics. M2 protein which expressed on the viral surface facilitates virus entry to the host cells. The extracellular domain of M2 protein (M2e) consists of N-terminal 24 residue which shows remarkable conservation among all subtypes of influenza A viruses. In this study, we evaluated the immunogenicity of three tandem repeats of M2e along with different adjuvants in BALB/C mice model.

Materials and Methods: Recombinant protein (3M2e) was expressed in Escherichia coli and purified. Six weeks old BALB/c mice were immunized interdermally with three doses of 3M2e alone or supplemented with Alum/CpG motif as adjuvant. Control group was injected with PBS. Two weeks after the last immunization, specific anti-M2 was measured using ELISA method and finally mice were challenged with one lethal dose (LD90) of PR8 virus.

Results: The results showed that 3M2e can induce specific antibody alone. However, 3M2e protein supplemented with Alum-CpG induced higher level of specific antibodies, so that, there was a significant difference with 3M2e group ($p<0.05$). Anti-M2 antibodies mostly consisted of IgG2a subclass which considered as activity index of TH1 Cells. Moreover, this group showed enhanced protection against wild-type virus (survival rate=60%).

Conclusion: Applying Alum-CpG as a complex adjuvant may play a crucial role in integrating innate and acquisitive immunity. We increased density of M2e in combination with complex adjuvant and showed that this vaccine induced power immune responses and semi-protected mice against lethal challenge.

Keywords: Influenza Virus, 3M2e protein, Alum adjuvant, CPG adjuvant

*Corresponding Author:
Address: Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin street, Tehran, Iran.
Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۱ (شماره پیاپی ۱۰۶)، فروردین ۱۳۹۵، ۴۳-۳۲

ارزیابی ایمنی زایی توالی تکرار سه تایی ناحیه خارج سلولی پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا همراه با ادجوانت در مدل موش بالب سی

حدیثه شکوهی[۱]، محمدرضا ذوالفقاری[۲]، بهرخ فرهمند[۳]، منصوره طباطبائیان[۴]، نجمه طاهری[۵]، فاطمه فتوحی[۶*]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

۳- استادیار، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۴- کارشناس آزمایشگاه، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۵-کارشناس ارشد سلولی ومولکولی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۶- دانشیار، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: ویروس‌های آنفلوانزا یکی از مهم‌ترین عوامل بروز عفونت‌های تنفسی می‌باشند که باعث بیماری و مرگ و میر بسیار در طی اپیدمی‌های سالیانه می‌گردند. پروتئین M2 در سطح ذره ویروس آنفلوانزا، ورود ویروس به سلول‌های میزبان را تسهیل می‌کند. بخش خارج سلولی این پروتئین که واجد ۲۴ اسید امینه است، در اکثر نژادهای آنفلوانزای نوع A انسانی حفاظت شده می‌باشد. در این مطالعه، ایمنی‌زایی توالی سه تایی M2e به همراه ادجوانت‌های مختلف در مدل موشی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها: پروتئین نوترکیب (3M2e) پس از بیان در اشرشیاکلی تخلیص شد. موش‌های بالب سی شش هفته‌ای با پروتئین تخلیص شده به تنهایی و یا همراه با ادجوانت Alum-CpG در سه دوزبه صورت زیرجلدی واکسینه شدند. موش‌های شاهد، بافر فسفات دریافت کردند. دو هفته بعد از آخرین ایمن سازی، آنتی بادی اختصاصی M2 در سرم موش‌ها به وسیله تست الایزا بررسی گردید و در نهایت حیوانات با یک دوز کشنده LD90 ویروس PR8 چالش شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق 3M2e به تنهایی می‌تواند باعث تولید آنتی بادی اختصاصی شود. ولی همراهی آلوم و CPG میزان بیشتری آنتی‌بادی اختصاصی را در موش‌ها القا کرد، به طوری که اختلاف معنی‌داری با گروه 3M2e داشت($p<۰/۰۵$). آنتی‌بادی‌های فوق بیشتر شامل زیرنوع IgG2a بودند که معمولاً به عنوان شاخصی از فعالیت سلول‌های Th1 در نظر گرفته می‌شود. هم‌چنین این گروه از موش‌ها در چالش با ویروس وحشی بهتر محافظت شده بودند (میزان بقای ۶۰ درصد).

نتیجه‌گیری: به کارگیری کمپلکس ادجوانت Alum-CpG نقش مهمی در برانگیختن ایمنی ذاتی واکتسابی دارد. در این پژوهش نشان دادیم که با افزایش دانسیته M2e و استفاده از کمپلکس ادجوانت می‌توان پاسخ‌های ایمنی کارآمدی را القا کرد و موش‌ها را در مقابل چالش کشنده با ویروس تا حدی محافظت نمود.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، پروتئین 3M2e، ادجوانت آلوم، ادجوانت CpG

* **نویسنده مسئول:** تهران، خیابان دوازده فروردین، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا

Email:fotouhi@pasteur.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

مقدمه

بیماری‌های تنفسی شامل بیش از نیمی از بیماری‌های حاد هستند که سالیانه در جهان رخ می‌دهند. در این میان ویروس آنفلوانزا به عنوان یک پاتوژن جهانی و مهم، عامل عمده‌ای در ایجاد بیماری و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های تنفسی به شمار می‌رود. ویروس آنفلوانزا جزو خانواده ارتومیکسوویریده و دارای اسیدریبونوکلئیک قطعه قطعه است. اصطلاح میکسو ویروس به علت وابستگی این ویروس‌ها به مخاط به کاربرده می‌شود که با توجه به پروتئین‌های M1 ، M2 و NP که اختصاصی تیپ هستند به سه گروه آنفلوانزای A، B و C تقسیم می‌شوند. دو گلیکوپروتئین ویروسی، هماگلوتینین و نورآمینیداز بر روی پوشش لیپیدی ویروس قرار گرفته‌اند، به طوری که تغییرات آنتی ژنی ویروس‌های آنفلوانزا و ایمنی میزبان به وجود آن‌ها بستگی دارد. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A و B به علت تغییرات مکرر آنتی ژنی که در دو گلیکوپروتئین سطحی آن‌ها رخ می‌دهد همواره مورد توجه بوده‌اند. این تغییرات باعث جلوگیری از عملکرد آنتی بادی‌های تولید شده علیه سروتیپ‌های والدی بر روی سروتیپ جدید می‌شود(۱).

همین امر باعث شکست در زمینه‌ی ساخت واکسن علیه این ویروس شده است. این ویژگی مشکل بزرگ‌تری به وجود آورده و آن هم ایجاد سویه‌های جدید از این ویروس است که منجر به ایجاد پاندمی در میان جوامع انسانی می‌شود. پاندمی زمانی به وجود می‌آید که ویروسی با زیر گونه‌ی جدیدهماگلوتینین و نورامینیداز و یا با زیرگونه جدید هماگلوتینین به تنهایی به وجود بیاید و بتواند در انسان تولید عفونت و بیماری کند و به راحتی در جوامع انسانی از فردی به فرد دیگر انتقال پیدا کند. به همین علت ویروس‌های آنفلوانزا در برابر اقدامات پیش‌گیری کننده مقاومت نشان می‌دهند(۲). به دلیل تغییرات آنتی‌ژنی مستمر سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا تاکنون هیچ پژوهشی منتج به تولید واکسنی که برای سال‌های متمادی کارایی داشته باشد، نشده است. بنابراین محققان به دنبال واکسنی هستند که فرمولاسیون ثابتی داشته باشد تا بتوان جهت پیش‌گیری از اپیدمی‌های آنفلوانزا و حتی پاندمی‌های احتمالی از آن بهره جست. واکسن‌های ویروسی آنفولانزا که به صورت تجاری برای انسان به صورت هر ساله و بر اساس سویه در گردش تولید می‌شود، واکسن‌های ویروس کامل غیر فعال شده هستند و با وجود این که بروز بیماری و شدت علائم بالینی را کاهش می‌دهند، نمی‌توانند حفاظت کاملی در مقابل عفونت ویروسی ایجاد کنند.

امروزه استفاده از واکسن‌های زیرواحدی که فاقد بیماری‌زایی بوده و به عنوان واکسن‌های بی خطر، موثر و پایدار به شمار می‌آیند مورد توجه محققان قرار گرفته است. برای تولید این واکسن‌ها ترجیحاً از پروتئین‌های حفاظت شده ویروس آنفلوانزا استفاده می‌شود که باعث به وجود آمدن پاسخ ایمنی متقاطع شود و بتواند میزبان را در برابر انواع مختلف ویروس محافظت نماید.

در این زمینه نواحی حفاظت شده‌ی پروتئین M2 از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پروتئین M2 یک پروتئین هموتترامرغشایی بوده و به عنوان کانال یونی عمل می‌کند و بخش خارج سلولی آن در بین تمام سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزای نوع A حفاظت شده است. این پپتید یک کاندید مناسب برای تهیه واکسن می‌باشد، اما از آن‌جا که اندازه کوچکی دارد و موجب ایمنی‌زایی مختصری می‌شود، روش‌های گوناگونی به کارگرفته شده تا منجر به تولید واکسن موثر و کارآمدی گردد. از جمله می‌توان با افزایش تعداد توالی‌های M2e و استفاده از ادجوانت‌های مختلف ایمونوژن قوی‌تری تولید نمود. یکی از ادجوانت‌های مورد استفاده در این مطالعه آلومینیوم هیدروکساید است. نمک‌های آلوم، بیشتر به شکل فسفات آلومینیوم یا هیدروکسید آلومینیوم به طور گسترده‌ای به عنوان ادجوانت‌های انسانی استفاده شده‌اند. این ادجوانت قادر است با ایجاد دپو و به دام انداختن آنتی ژن در محل تزریق با آزاد سازی و ارائه آرام و مستمر آن به سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن ایمنی زایی را افزایش دهد. سایر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

مکانیسم‌های احتمالی عمل نمک‌های آلومینیوم شامل فعال سازی کمپلمان، ائوزینوفیل و یا ماکروفاژ است(۳).

الیگونوکلئوتیدهای CpG دومین ادجوانت مورد استفاده در این مطالعه است. این الیگونوکلئوتیدها مشابه موتیف DNA باکتریایی بوده و شامل یک زنجیره دراز از دئوکسی نوکلئوتیدهای DNA همراه با دی نوکلئوتیدهای CpG مرکزی است. CpG تعدیل کننده سیستم ایمنی بوده و توانایی تحریک آنتی بادی‌ها را دارد(۴، ۵).

در این مطالعه در راستای راه اندازی یک واکسن واحد علیه ویروس آنفولانزا، پس از تولید پروتئین 3M2e در سیستم پروکاریوت و تخلیص آن، اثر ادجوانتی آلوم وCpG بر ایمونوژنیسیتی 3M2e و میزان مرگ و میر حاصل از چالش با ویروس کشنده در گروه‌های دریافت کننده واکسن در قیاس با گروه کنترل در مدل موشی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی انجام شد. در این تحقیق از ویروس آنفولانزای A/ PR/8 /34 سازگار شده با موش استفاده گردید. نظر به این که این ویروس باعث مرگ و میر در موش می‌شود و در انسان هیچ‌گونه عوارض بیماری‌زایی ندارد، در تحقیقات آزمایشگاهی ویروس آنفلوانزا خصوصا در طراحی واکسن علیه این ویروس، از سویه PR8 جهت چالش استفاده می‌گردد. تکثیر ویروس در رده سلولی MDCK صورت گرفت. سلول‌های MDCK در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco BRL)، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین (Aldrish، سیگما) کشت داده شدند.

مدل آزمایشگاهی

برای این پژوهش از موش‌های بالب سی ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای استفاده گردید که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و قبل از شروع کار به مدت یک هفته در حیوان خانه نگهداری شدند.

تعیین دوز کشنده‌ی ویروس PR8 در موش بالب سی

به منظورارزیابی کارایی واکسن درچالش با ویروس وحشی لازم بود مشخص شود که چه مقداری از ویروس برای حیوان کشنده است. از این رو،۲۰ سر موش ۸ هفته‌ای در۴ گروه ۵ تایی تقسیم شدند و به هرکدام ۲۰ میکرولیترکتامین و ۵ میکرولیترزایلازین به صورت صفاقی تزریق گردید تا موش‌ها نیمه هوشیار شوند. سپس به هرکدام ۱۰۰ میکرولیتر ویروس (۵۰ میکرولیتر در هر حفره بینی) بارقت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} تلقیح شد. موش‌های هر گروه به مدت ۲ هفته در قفس‌های جداگانه و زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی نگهداری شده و روزانه از نظر بروزآثار بیماری و یا مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند.

تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب

در این پژوهش پلاسمید بیانی (pET-28a/3M2e) واجد تکرار سه تایی ترادف M2e، که قبلا در آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران ساخته و تعیین توالی شده بود، استفاده گردید.

برای بیان سازه‌ی نوترکیب فوق از سلول‌های اشرشیا کلی سویه BL21(DE3) استفاده شد. بیان پروتئین نوترکیب در این سویه در مقایسه با سویه‌های مشابه نظیر pLysS BL21(DE3) دارای سطح بالاتری است و به علاوه میزان ممانعت کنندگی بیان آن کمتر است. بدین منظور پلاسمید نوترکیب به داخل سلول‌های اشریشیا کلی سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد، سپس در محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت ۲ تا ۳ ساعت و زمانی که میزان جذب نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ تا ۰/۷ رسید، ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط برداشته شد و به عنوان نمونه صفر در نظر گرفته شد. رسوب‌گیری نمونه با انجام سانتریفوژ آن به مدت ۳ دقیقه و ۹۰۰۰ دور در

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

دقیقه صورت گرفت. سپس به جهت القای بیان، IPTG با غلظت یک میلی‌مولار به محیط اضافه شد و در انکوباتور شیکردار با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. رسوب سلولی در ساعت‌های مختلف پس از القا (ساعات اول تا چهارم) جمع‌آوری شد و نتایج بیان از طریق الکتروفورز پروتئین در ژل ۱۵ درصد پلی آکریل آمید (SDS PAGE) بررسی گردید.

استخراج پروتئین نوترکیب

پس از تائید بیان و با توجه به نتایج حاصله، کلونی‌های انتخاب شده در ارلن‌های یک لیتری حاوی ۲۵۰ سی‌سی محیط کشت تلقیح شدند و پس از حصول جذب نوری مناسب و افزودن القاگر IPTG با غلظت یک میلی‌مولار، پروتئین مورد نظر به روش زیر از رسوب باکتری جدا گردید:

رسوب جمع‌آوری شده در بافر لیز کننده واجد اوره تعلیق شده و به مدت یک ساعت روی هم‌زن مغناطیسی داخل یخچال قرار داده شد. برای تخریب دیواره سلول‌ها از ۱۲ مرتبه سونیکاسیون و در هر نوبت ۲۰ پالس با قدرت ۸۵ استفاده شد. سوسپانسیون سونیکه شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰۰G سانتریفیوژ شد. رسوب باقیمانده مجددا در بافر لیز کننده تعلیق شده و مراحل تکرار گردید تا نهایتا رسوبی باقی نماند. در تمام مراحل فوق نمونه‌برداری صورت گرفت و میزان پروتئین استخراج شده با الکتروفورز بررسی گردید.

تخلیص پروتئین نوترکیب

تخلیص پروتئین 3M2e نو ترکیب با استفاده از ستون‌های Ni-TED 1000 packed (MN ، آلمان) و با اعمال تغییراتی در دستورالعمل مربوطه صورت گرفت.

سوسپانسیون حاصل از استخراج که حاوی تمامی پروتئین‌های باکتری و پروتئین نوترکیب مورد نظر ما است برروی ستون برده شد. به دلیل باقی ماندن بخشی از پروتئین نوترکیب در نمونه جمع‌آوری شده از زیر ستون و به جهت بهره‌گیری کامل از حداکثر ظرفیت، محلول جمع‌آوری شده چند بار روی ستون برده شد. هم‌چنین جهت افزایش کارایی، در هر مرحله خروجی ستون مسدود شده و ستون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شست و شوی ستون، پروتئین مورد نظر با استفاده از بافر الوشن از ستون کنده و در مقادیر کم جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده از طریق SDS PAGE بررسی گردید.

در آخر جهت حذف نمک‌های اضافی و آماده سازی پروتئین مورد نظر برای تزریق، از ستون‌های کروماتوگرافی G با قدرت عبور مواد ریزتر از پروتئین مورد نظر استفاده شد. در این حالت پروتئین در طی عبور از ستون فرصت تغییر ساختار نخواهد داشت. در این پژوهش از ستون G-25 (BioRad) با قدرت عبور ذرات ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون برای نمک زدایی و اوره زدایی پروتئین نوترکیب استفاده کردیم.

واکسیناسیون حیوانات

بیست و پنج سر موش بالب سی ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج خریداری شده و بعد از یک هفته نگهداری در بخش حیوان خانه به ۵ گروه ۵ تایی اصلی و شاهد تقسیم شدند. واکسیناسیون به صورت تحت جلدی در سه دوز ۱۵ میکروگرمی و در فواصل دو هفته‌ای انجام شد. گروه اول پروتئین 3M2e ، گروه دوم پروتئین 3M2e همراه با ادجوانت آلوم (انستیتو پاستور ایران، واحد تولیدی کرج)، گروه سوم پروتئین3M2e همراه با ادجوانت آلوم وCpG (Eurofins MWG) و گروه چهارم پروتئین 3M2e همراه با CpG دریافت کردند. یک گروه از موش‌ها نیز به عنوان شاهد، PBS دریافت کرد. دو هفته بعد از آخرین تزریق از سینوس اربیتال موش‌ها خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جهت بررسی با الایزا جدا گردید.

بررسی ایمنی زایی واکسن

دو هفته پس از تزریق سوم از هریک از حیوانات دریافت کننده واکسن خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جدا شد. خون‌گیری از سینوس اربیتال موش‌ها و با پیپت پاستور انجام شد. میزان IgG اختصاصی M2 در سرم گروه‌های مختلف با تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت(۶). بدین منظور از

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

پپتید M2e که واجد ۲۳ اسیدآمینه خارج سلولی پروتئین M2 می‌باشد استفاده گردید. محلول یک میکروگرم در میلی‌لیتر پپتید فوق در بافر فسفات در هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا (۱۰۰ میکرولیتر) ریخته شد و به مدت یک شب در یخچال نگهداری گردید. به منظور پوشاندن فضاهای خالی از بافر فسفات حاوی آلبومین سرم گاو ۳ درصد استفاده شد. سرم گروه‌های مختلف مورد مطالعه با رقت ۱ به ۱۰۰۰ و آنتی بادی موشی نشان‌دار با آنزیم پراکسیداز (A8924، سیگما) با رقت ۱ به ۵۰۰۰ به عنوان آنتی بادی ثانویه مورد استفاده قرار گرفت. در تمام مراحل از بافر فسفات واجد توئین ۲۰ برای شست و شو 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. در ادامه، زیر نوع IgG (IgG1 و IgG2a) نیز بر طبق مراحل گفته شده در فوق و به روش الایزا ارزیابی شد و پس از شست و شوی رقت‌های سرمی، از آنتی بادی ویژه زیرنوع IgG موش(M5532,M5657، سیگما) که در خرگوش تهیه شده بود استفاده گردید. آنتی‌بادی نشان‌دار که در مرحله آخر اضافه گردید بر علیه IgG خرگوش در بز تهیه شده بود(A5420، سیگما).

چالش حیوانات واکسینه

گروه‌های مختلف مورد آزمایش دو هفته پس از آخرین ایمن سازی با یک دوز کشنده ویروس چالش شده و به مدت دو هفته در حیوان خانه و در زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی نگه داری شدند و میزان مرگ و میر در گروه‌های مورد مطالعه ثبت گردید.

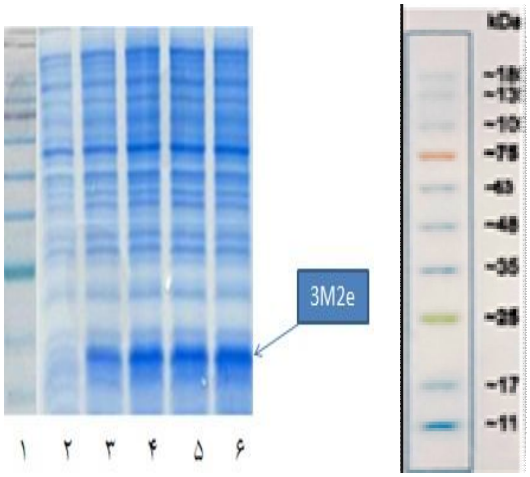
تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری آزمایش‌های مختلف ایمنی با استفاده از نرم افزار اکسل و آزمون آنووای یک طرفه با استفاده از نرم افزار Graph pad. Prism نسخه ۶ انجام شد.

یافته‌ها

نتایج بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب در باکتری BL21

پلاسمید نوترکیب pET-28a/3M2e به سلول مستعد BL21 ترانسفورم شد و پس از نمونه برداری در ساعت‌های مختلف، نمونه‌های پروتئینی در ژل آکریل آمید- بیس آکریل آمید الکتروفورز گردید. براساس نتایج حاصله که در شکل ۱ آورده شده است، پروتئین 3M2e قبل از القا بیان نداشته و به تدریج در ساعت‌های بعد ازالقا، میزان بیان افزایش یافته است. به این ترتیب پروتئین 3M2e سه ساعت پس از القا به بیشترین میزان رسیده و جمع‌آوری شد.

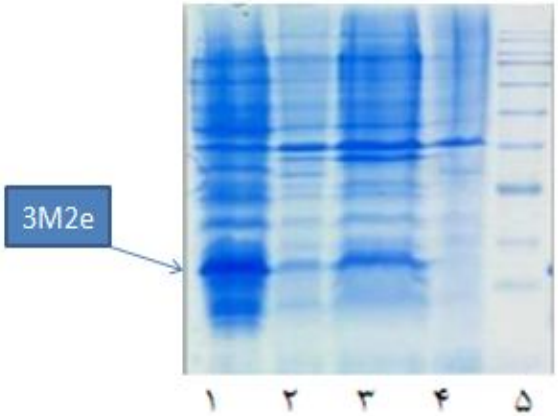


شکل ۱. الکتروفورز نمونه حاصل از بیان پروتئین3M2e در باکتری اشرشیاکلی سویه (BL21(DE3 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پس از القا با IPTG ۱میلی‌مولار. ستون ۱: مارکر پروتئین؛ ستون ۲: نمونه باکتری قبل از القا؛ ستون ۳ تا ۶: نمونه باکتری در ساعات اول تا چهارم پس از القا.

پس از تائید بیان، پروتئین نوترکیب در مقیاس زیاد تولید و از رسوب باکتری جدا گردید. جهت تعیین تعداد سونیکاسیون مناسب و بهینه سازی استخراج پروتئین به کار رفته در این پژوهش، استخراج‌های متعدد با تعداد پالس و قدرت‌های سونیکاسیون متفاوت انجام شد که نتایج حاصله در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود (ستون ۱)، بیش از ۹۰ درصد پروتئین مورد نظر پس از یک مرحله لیز باکتری و انجام سونیکاسیون

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

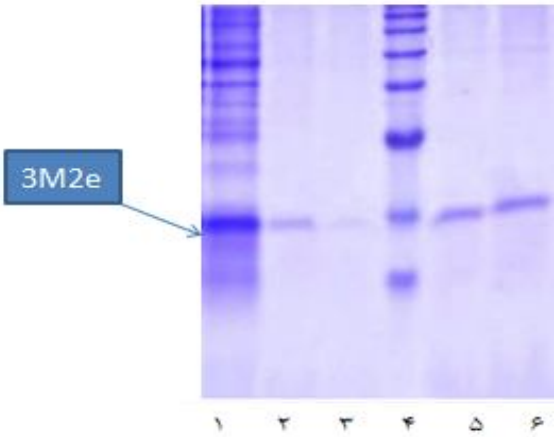
از لاشه سلولی جدا شده و نیازی به تکرار مراحل لیز و سونیکاسیون نبوده است.



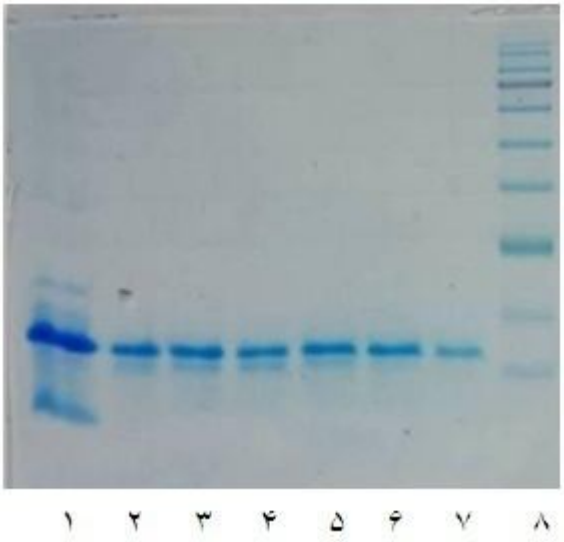
شکل۲ . نتایج الکتروفورز مراحل استخراج پروتئین 3M2e از باکتری اشرشیاکلی سویه (BL21(DE3. ستون ۱ و ۲ به ترتیب: سوسپانسیون و رسوب حاصل بعد از یک بار سونیکاسیون؛ ستون۳ و ۴ به ترتیب: سوسپانسیون و رسوب حاصل بعد از دو بار سونیکاسیون)؛ ستون ۵: مارکر پروتئینی

با توجه به این که پروتئین نوترکیب بیان شده واجد دنباله هیستیدینی بود، با استفاده از ستون Ni-TED تخلیص گردید. در ابتدا سه میلی‌لیتر سوسپانسیون حاصل از استخراج بر روی ستون برده شد و خروجی ستون جمع‌آوری و الکتروفورز گردید. همان‌طور که در شکل۳ ستون ۱ دیده می‌شود، پروتئین 3M2e به میزان زیادی در مایع رد شده از ستون باقی ماند. برای برطرف کردن این مشکل، مایع جمع‌آوری شده از ستون چندین مرتبه‌ی دیگر بر روی ستون برده شد. در مرحله‌ی بعد، شست وشوی ستون انجام شد (شکل۳، ستون‌های ۲ و ۳). شواهد نشان می‌دهد که پروتئین مورد نظر در این مراحل از ستون جدا نشده است. در آخر پروتئین نوترکیب با استفاده از بافر الوشن از ستون جدا گردیدکه ستون ۵ و۶ شکل ۳ نتایج این مرحله را نشان می‌دهند. به منظور افزایش غلظت پروتئین 3M2e ، در کارهای بعدی در مرحله‌ی الوشن، خروجی ستون مسدود شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا پروتئین مورد نظر مدت زمان بیشتری با بافر الوشن در تماس باشد و در نهایت تخلیص پروتئین 3M2e با غلظت بیشتر انجام گردیدکه نتایج آن نشان داده نشده است.

در نهایت جهت حذف نمک‌های اضافی و آماده سازی پروتئین مورد نظر برای تزریق، از ستون کروماتوگرافی G استفاده شد. نتیجه الکتروفورز مراحل تخلیص پروتئین در شکل‌های ۳ و ۴ دیده می‌شود.



شکل۳. الکتروفورز نمونه حاصل از تخلیص پروتئین 3M2e. ستون ۱: نمونه‌ی رد شده از ستون؛ ستون‌های ۲و ۳: نمونه‌های حاصل از شست و شوی ستون؛ ستون ۴: مارکر پروتئینی؛ ستون‌های ۵ و ۶: نمونه‌های الوشن



شکل ۴. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از ستون G25 ، ستون ۱: نمونه‌ی پروتئین 3M2e تخلیص شده قبل از اوره زدایی؛ ستون‌های ۲ تا ۷: نمونه‌های خروجی از ستون؛ ستون ۸: مارکر پروتئینی

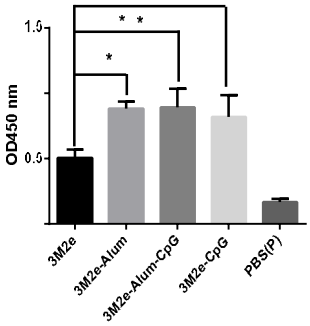
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

نتایج اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد M2 به روش الایزا در موش‌های مورد مطالعه

دو هفته پس از آخرین دوز واکسن، از تمام حیوانات خون‌گیری به عمل آمد و میزان آنتی بادی‌های ویژه M2 در گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شد (نمودار ۱). پس از انجام آزمایش الایزا و رسم منحنی استاندارد و محاسبه و تحلیل مقادیر به دست آمده با آزمون آماری آنووای یک طرفه معلوم شدکه تولید آنتی بادی IgG در همه گروه‌های واکسن نسبت به گروه کنترل PBS نتایج معنی‌داری را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$).

نتایج به دست آمده نشان داد که تزریق پروتئین $3M_2e$ به تنهایی نیز باعث القای پاسخ ایمنی همورال می‌گردد. گروه دریافت کننده‌ی پروتئین 3M2e به همراه ادجوانت آلوم و هم‌چنین گروهی که پروتئین 3M2e را به همراه آلوم و CpG دریافت کردند، ایمنی‌زایی بیشتری را نسبت به گروه دریافت کننده پروتئین بدون ادجوانت نشان دادند که این تفاوت‌ها معنی‌دار بوده است($p<۰/۰۱$). این تفاوت در گروهی که واکسن 3M2e را به همراه CpG دریافت کرده بودند $p<۰/۰۵$ معنی‌دار بوده است.

هم‌چنین نتایج الایزا نشان داد که گروه کنترل (PBS) فاقد آنتی بادی اختصاصی ضد پروتئین M2 است. نتایج اندازه‌گیری زیر نوع آنتی بادی‌ها (IgG1 و IgG2a) نیز در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاکی از تولید هر دو زیر نوع آنتی بادی در گروه‌های واکسن می‌باشد. زیر نوع IgG2a که غالبا به عنوان شاخصی از عملکرد سیستم ایمنی سلول در نظر گرفته می‌شود در سرم موش‌های گروه 3M2e همراه با آلوم و CPG به میزان قابل توجهی افزایش یافت.



نمودار ۱. نتایج مربوط به اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های ویژه M2 به روش الایزا. در این روش رقت ۱۰۰۰ : ۱ سرم موش‌های مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه شده است. * :($p<۰/۰۱$) و ** ($p<۰/۰۵$)

نتایج چالش موش‌های واکسینه شده با ویروس‌های آنفلوانزا

نتایج تعیین دوز کشنده ویروس PR8 نشان داد که در رقت $۱۰^{-۳}$ ویروس، ۱۰۰ درصد از حیوان‌ها مردند و در رقت $۱۰^{-۴}$ تمام حیوان‌ها زنده ماندند. از این رو، رقت $۱۰^{-۳}$ ویروس به عنوان دوزی که می‌تواند بیش از ۹۰ درصد حیوانات را بکشد (LD90) در نظر گرفته شد.

تمامی گروه‌های مورد آزمایش دو هفته پس از آخرین ایمن سازی با یک LD90 از ویروس آنفلوانزای H1N1 PR8 چالش شدند و طی این مدت موش‌های هر گروه درون قفس‌های مجزا و در زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی موجود در حیوان خانه انستیتو پاستور نگهداری شدند. میزان مرگ و میر هر گروه تا ۱۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله در نمودار ۲ آمده است.

همان‌طور که در این نمودار ملاحظه می‌شود در مورد گروه‌های دریافت کننده 3M2e همراه با ادجوانت آلوم و CPG شاهد بقای ۶۰ درصد موش‌های چالش شده با ویروس بودیم. این در حالی است که در گروه‌های دریافت کننده 3M2e و گروه کنترل همه حیوانات تلف شدند.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

جدول ۱. نسبت زیر نوع‌های IgG2a به IgG1 در گروه‌های موشی علیه پروتئین M2

	IgG1	IgG2a	IgG2a/ IgG1
3M2e	۱/۷۱	۰/۳۹	۰/۲۳
3M2e-Alum	۱/۵۰	۰/۹۷	۰/۶۵
3M2e-Alum-CPG	۱/۴۹	۱/۲۱	۰/۸۲
3M2e-CPG	۱/۵۱	۱/۱۲	۰/۷۴

بحث

ویروس آنفلوانزای نوع A بر اساس دو گلیکوپروتئین سطحی ویروس (هماگلوتینین و نورآمینیداز) به زیر نوع‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شود. این گلیکوپروتئین‌ها بهترین آنتی‌ژن برای تولید ایمنی محافظتی در میزبان هستند. هماگلوتینین آنتی‌ژن اصلی ویروس است و میزان جهش در آن بسیار زیاد است. یکی از دلایل این جهش‌های سریع عملکرد نیمه دقیق آنزیم رپلیکاز ویروسی و همین طور عدم توانایی آنزیم درتصحیح اشتباهاتش (ویژگی اگزونوکلئازی) می‌باشد. تجمع این جهش‌های نقطه‌ای در پروتئین‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز که دریفت نامیده می‌شود باعث عدم تاثیر آنتی‌بادی‌های اختصاصی در گردش شده و ویروس می‌تواند در بخش قابل توجهی از جمعیتی که از تماس قبلی ایمن شده بودند، ظاهر شود و به صورت آنفلوانزای فصلی بروز کند.

علاوه بر شیوع فصلی، در صورت جا به جایی قطعات ژنوم ویروس‌های انسانی و پرندگان و ظهور ویروس حاوی گلیکوپروتئین‌های سطحی جدید، ممکن است ویروس جدید باعث بروز پاندمی شده و با سرعت زیاد در میان جوامع انسانی منتشر شود. در طی سه قرن اخیر، ۱۰ پاندمی بزرگ اتفاق افتاده که سه تا از این پاندمی‌ها در قرن بیستم در سال‌های ۱۹۱۸، ۱۹۵۷ و ۱۹۶۸ بوده است. نخستین پاندمی قرن بیست و یکم در سال ۲۰۰۹ با آغاز عفونت در مکزیک و انتشار آن در طی چند ماه به اکثر کشورهای دنیا با میزان مرگ و میر حدود ۱ درصد از مبتلایان به وقوع پیوست(۷).

بنابراین شاخصه‌ی ویروس آنفلوانزا، تنوع در گلیکو پروتئین‌های سطحی آن است که در نتیجه ویروس می‌تواند از پاسخ ایمنی میزبان فرار کند. اگر چه افزایش سرعت تولید و کارایی واکسن‌های منطبق برعلیه سویه در گردش حائز اهمیت است، اما جلوگیری از بیماری آنفلوآنزا به دلیل قدرت ویروس در پنهان کردن خود و ظهور به صورت یک عامل جدید دشوار است که این مسئله نیاز به تولید واکسن علیه سویه‌ی جدید را دو چندان می‌کند. با ظهور روش‌های مدرن و افزایش درک و شناسایی ایمونولوژی آنفلوانزا، تحقیقات و پژوهش‌ها در جهت توسعه‌ی واکسن جامع آنفلوانزا که نیاز به تغییرات هر ساله نداشته باشد ادامه دارد. به طور قطع این پژوهش‌ها می‌بایست بر پایه‌ی آنتی ژن‌های حفاظت شده ویروس باشد.

چند کاندید مناسب در این زمینه وجود دارد که از آن جمله می‌توان به ناحیه ثابت یا حفاظت شده ساقه پروتئین هماگلوتینین و هم‌چنین پروتئین M2 اشاره کرد. اثر بخشی موفق چندین واکسن بر اساس پروتئین M2 علیه سویه‌های همولوگ وهترولوگ ویروس آنفلوانزا ثابت شده است(۸).

این پروتئین به میزان فراوانی در غشاء پلاسمایی سلول‌های آلوده به ویروس بیان شده و به مقدار زیاد در ویریون تحت بیان است، ولی فقط مقدار کمی از آن (به طور متوسط ۶ تا ۲۰ مولکول) به ذرات ویروسی ملحق می‌شود. پروتئین دست نخورده M2 به صورت یک هموتترامر شامل یک جفت دایمر متصل به هم از طریق پیوند دی‌سولفیدی یا به صورت یک تترامر پیوسته با پیوند دی‌سولفیدی شکل می‌گیرد. ناحیه خارج سلولی این پروتئین که M2e نام دارد شامل ۲۴ اسیدآمینه است(۹). طبق مطالعات انجام شده، اسید آمینه‌های ۲ تا ۹ بخش N ترمینال این پپتید (SLLTEVET) در بین همه‌ی تحت تیپ‌های ویروس آنفولانزا حفاظت شده است(۹). آنتی بادی‌های مونوکلونال علیه اپی توپ فوق، همانند سازی ویروس آنفولانزای A را در سلول‌های MDCK مهار می‌کنند و هم‌چنین باعث مهار همانند سازی ویروس در ریه حیوان

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

شده و آن‌ها را در برابر دوز کشنده عفونت محافظت می‌نمایند(۹).

به دلیل این که واکسن‌های نوین زیر واحدی تنها شامل قطعه آنتی ژنی ضد عامل بیماری‌زا می‌باشند، فاقد محرک‌های کمکی لازم به منظور تحریک مناسب سیستم ایمنی هستند. یکی از نگرانی‌های موجود در مورد واکسن‌های آنفلوانزا بر اساس پروتئین M2e ، قدرت ایمنی‌زایی پایین آن است. به منظور افزایش ایمنی‌زایی این پروتئین، محققان چندین نسخه از M2e نسخه را با برخی پروتئین‌های ایمنی‌زا ادغام و یا از ادجوانت‌های مختلف استفاده کرده‌اند. از جمله این که M2e با پروتئین تترامر GCN4 که یک پروتئین فعال کننده رونویسی یوکاریوتی است، ادغام شد و در نتیجه توانایی پاسخ‌های آنتی‌بادی ویژه M2e افزایش یافت و موش‌های واکسینه شده با آن به طور کامل علیه ویروس آنفولانزا حفاظت شدند(۱۰). در همین راستا توالی M2e با هسته ویروس هپاتیت B (M2e-HBC) نیز ادغام شد که توانست موش‌ها را بر علیه ویروس آنفولانزا حفاظت کند(۱۱). ادغام M2e با بخش آمینی HSP70 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز باعث افزایش ایمنی‌زایی در مدل حیوانی شد(۱۲). قرار دادن چند کپی متوالی از M2e و ادغام آن با TLR5 سالمونلا تیفی موریوم به عنوان ادجوانت در مدل موشی مورد آزمایش، باعث افزایش پاسخ آنتی بادی ویژه M2e شده و حیوان را در برابر ویروس محافظت کرد(۱۳).

در مطالعه حاضر در راستای راه اندازی یک واکسن واحد علیه ویروس آنفولانزا، طراحی واکسن پروتئینی برمبنای استفاده از توالی چند گانه پپتید M2e صورت گرفت. با همراه کردن دو ادجوانت مختلف (آلوم و CPG) با پروتئین3M2e، ایمنی‌زایی این پروتئین را با سنجش میزان آنتی بادی‌های ویژه‌ی M2 بررسی کردیم. دو هفته پس از آخرین تزریق، ایمنی هموورال با تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله بیان‌گر آن بود که گر چه تزریق پروتئین 3M2e به تنهایی نیز باعث القای پاسخ ایمنی هموورال گردیده است، اما همراهی ادجوانت‌ها باعث افزایش معنی‌دار میزان آنتی بادی‌های اختصاصی شده است. در سال ۲۰۰۹ ، وو و همکاران پپتید M2e را با واکسن رایج آنفلوانزا ترکیب کردند. نتایج نشان داد که میزان آنتی‌بادی تولید شده برابر با آنتی‌بادی تولید شده در واکسن‌های رایج می باشد، اما افزودن ادجوانت الوم به این ترکیب جدید باعث افزایش آنتی‌بادی تولیدی شده وایمنی وسیع الطیف علیه ویروس آنفلوانزا به وجود می‌آورد(۱۴).

هدف از واکسیناسیون ایجاد ایمنی حفاظتی است که در برخی از واکسن‌ها همراهی یک ادجوانت مناسب باعث افزایش ایمنی می‌شود. ادجوانت‌ها در بسیاری از واکسن‌ها استفاده می‌شوند، ولی مکانیسم عمل آن‌ها به طور کامل شناخته نشده است. مواردی از قبیل افزایش ایمنی‌زایی آنتی ژن‌های ضعیف، افزایش سرعت و مدت پاسخ ایمنی، افزایش میل ترکیبی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن و اختصاصی‌تر کردن این اتصال، تغییر زیر کلاس آنتی‌بادی، تحریک ایمنی سلولی، افزایش تحریک ایمنی مخاطی، افزایش واکنش‌های ایمنی در افراد خردسال و مسن، کاهش دوز آنتی ژن در واکسن و کاهش قیمت متعاقب آن و بالاخره غلبه بر رقابت آنتی‌ژن‌ها در واکسن‌های ترکیبی، محققان را مجاب به استفاده از ادجوانت‌های مناسب کرده است. ادجوانت‌ها از طریق مکانیسم‌هایی مانند تشکیل دپو در محل تزریق، تحریک سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، به کارگیری سلول‌های ایمنی، افزایش جذب و ارائه آنتی ژن به سیستم ایمنی و انتقال آن به گره‌های لنفاوی اثر خود را اعمال می‌کنند(۳).

یکی از ادجوانت‌های مورد استفاده در این مطالعه آلومینیوم هیدروکساید است. همان‌طور که پیشتر گفته شد مکانیسم دقیق عمل این ادجوانت هنوز به طور کامل شناخته نشده است. گفته می‌شود این ادجوانت با تحریک Th2 القاء پاسخ ایمنی هموورال را افزایش می‌دهد(۱۵). در گروه دیگری از موش‌ها الیگونوکلئوتیدهای CpG به عنوان ادجوانت استفاده گردید. این الیگونوکلئوتیدها تعدیل کننده سیستم ایمنی بوده و توانایی القای تولید آنتی‌بادی‌ها را

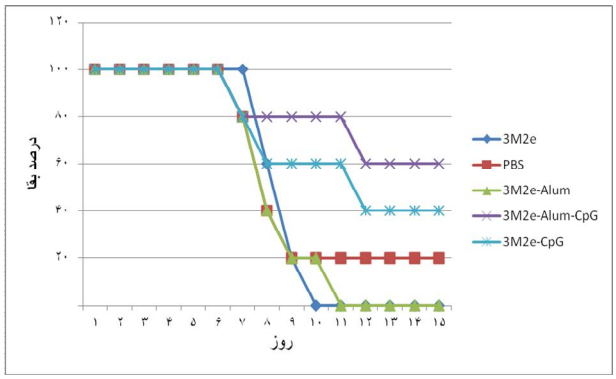
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

دارند. این ادجوانت در تغییر مسیر ایمنی به سمت پاسخ‌های تیپ ۱ موثر است(۴، ۵).

در این پژوهش، ایمنی‌زایی پروتئین 3M2e در گروه‌های مورد مطالعه که آن را همراه با آلوم و یا CpG و یا ترکیب هر دو ادجوانت دریافت کرده بودند نسبت به گروه دریافت کننده پروتئین بدون ادجوانت تفاوت معنی داری نشان داد، گر چه این گروه‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند.

مطالعات مختلف نشان داده است که القای ایمنی هومورال به تنهایی قادر به ایجاد حفاظت کامل در مقابل ویروس آنفولانزای A نیست، اما می‌تواند باعث حفاظت نسبی گردد. برای رسیدن به یک واکسن جامع، مد نظر قرار دادن هردو بازوی سیستم ایمنی هومورال و سلولی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه با اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های زیر نوع IgG (IgG1 و IgG2a) به طور غیر مستقیم میزان تحریک ایمنی سلولی ارزیابی و در چهار گروه واکسن با یکدیگر مقایسه گردید. عموماً تولید آنتی‌بادی IgG2a و IgG1 به ترتیب به عنوان شاخصی از فعالیت سلول‌های Th1 و Th2 در نظر گرفته می‌شوند. بر این اساس، همان‌طور که انتظار می‌رفت، در گروهی که پروتئین 3M2e را به تنهایی دریافت کرده بودند گرایش پاسخ‌ها به سمت Th2 بود. در گروهی که پروتئین 3M2e را همراه CpG دریافت کردند، با وجود کاهش نسبی آنتی بادی اختصاصی (IgG کل)، میزان آنتی بادی IgG2a افزایش چشم‌گیری داشت که می‌تواند بیان‌گر راه اندازی پاسخ‌های Th1 باشد. اما در گروهی که پروتئین 3M2e را همراه با آلوم و CPG دریافت کردند، ضمن حفظ میزان کلی IgG، نسبت IgG2a به IgG1 به یک نزدیک‌تر است. با توجه به این که آلوم به تنهایی القا کننده Th2 است، همراهی CpG در واکسن حاوی پروتئین و آلوم می‌تواند باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی شده و به دلیل دپوی ایجاد شده به وسیله آلوم، به میزان بیشتری قادر خواهد بود Th2 را تحریک کرده و هم‌چنین پاسخ ایمنی سلولی را القا نماید(۱۵). بدین معنی که همراهی CPG منجر به القای تولید میزان بسیار بالایی از آنتی‌بادی‌های ضد M2 به ویژه ایزوتیپ IgG2a می‌شود که احتمالا حاصل فعالیت هر دو گروه سلول‌های Th1 و Th2 می‌باشد. تولید این آنتی بادی‌ها معمولاً با تولید اینترفرون گاما همراه است. نتایج این پژوهش با سایر پژوهش‌ها قابل مقایسه است. برای مثال، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ انجام شد پپتید M2e ویروس آنفلوانزا را به ادجوانت CpG-ODN الحاق کردند و نشان دادند که ترکیب M2e-CpG-ODN، پاسخ ایمنی Th1 وتیترIgG2a و اینترفرون گاما را افزایش می‌دهد(۱۶).

هم‌چنین مقایسه نتایج چالش موش‌ها با ویروس H1N1 نشان داد که گروه 3M2e-Alum-CpG، نسبت به سایر گروه‌های واکسن دارای بقای بهتری بوده است(نمودار ۲). احتمالاً همراهی CPG ، علاوه بر تحریک اختصاصی سیستم ایمنی، توانسته است ایمنی ذاتی را نیز تحریک کرده و در حفاظت بخشی نقش داشته باشد.



نمودار ۲. میزان بقا در موش‌های واکسینه شده بعد از چالش با H1N1

نتیجه گیری

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به کارگیری پروتئین 3M2e همراه با ادجوانت‌های آلوم و CPG، باعث القای پاسخ سیستم ایمنی هومورال و سلولی بر علیه آنتی ژن 3M2e می‌شود که می‌تواند اثر حفاظت بخشی پروتئین M2e را به عنوان یک واکسن واحد علیه ویروس‌های آنفلوانزا بهبود بخشد.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:58 +0330 on Friday February 23rd 2018

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی و مساعدت بخش آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران انجام پذیرفته است. بدین وسیله نویسندگان از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوانزا کمال تشکرو قدردانی را دارند.

منابع

1. Arias CF, Escalera-Zamudio M, de los Dolores Soto-Del M, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). Archives of medical research. 2009; 40(8):643-54.
2. Peiris J, Tu Ww, Yen Hl. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. European journal of immunology. 2009; 39(11):2946-54.
3. Foumani M, Asadpour L, Azizi Saraji A, Sharifat Salmani A, Aghasadeghi M. Adjuvants and Their Mechanisms of Action. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2012; 12(3):276-91.[Persian]
4. Qin W, Jiang J, Chen Q, Yang N, Wang Y, Wei X, et al. CpG ODN enhances immunization effects of hepatitis B vaccine in aged mice. Cell Mol Immunol. 2004; 1(2):148-52.
5. Lin L, Gerth AJ, Peng SL. CpG DNA redirects class-switching towards" Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. European journal of immunology. 2004; 34(5): 1483-7.
6. Rousta F, Fotouhi F, Ghaemi A, Heidarchi B, Fazeli M, Ghaffari M. Effects of aqueous Echinacea purpurea extract on immunogenicity of DNA vaccine encoding M2 gene of Influenza virus. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2012; 14(4):82-8.
7. Baras B, Stittelaar KJ, Simon JH, Thoolen R, Mossman SP, Pistoor F, et al. Cross-protection against lethal H5N1 challenge in ferrets with an adjuvanted pandemic influenza vaccine. PLoS One. 2008; 3(1):e1401-2.
8. Tompkins SM, Zhao Z-S, Lo C-Y, Misplon JA, Liu T, Ye Z, et al. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. Emerging infectious diseases. 2007; 13(3):426-7.
9. Ebrahimi SM, Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. Virus Genes. 2011; 42(1):1-8.
10. Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. Microbes and infection. 2010; 12(4):280-6.
11. De Filette M, Martens W, Smet A, Schotsaert M, Birkett A, Londoño-Arcila P, et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies. Vaccine. 2008; 26(51):6503-7.
12. Ebrahimi SM, Tebianian M, Toghyani H, Memarnejadian A, Attaran HR. Cloning, expression and purification of the influenza A (H9N2) virus M2e antigen and truncated Mycobacterium tuberculosis HSP70 as a fusion protein in Pichia pastoris. Protein expression and purification. 2010; 70(1):7-12.
13. Jia P-p, Hu Y-h, Chi H, Sun B-g, Yu W-g, Sun L. Comparative study of four flagellins of Vibrio anguillarum: Vaccine potential and adjuvanticity. Fish & shellfish immunology. 2013; 34(2):514-20.
14. Wu F, Yuan X-Y, Huang W-S, Chen Y-H. Heterosubtypic protection conferred by combined vaccination with M2e peptide and split influenza vaccine. Vaccine. 2009; 27(43): 6095-101.
15. Millan CLB, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist C-A, Davis HL. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998; 95(26):15553-8.
16. Wu F, Yuan X-Y, Li J, Chen Y-H. The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. Vaccine. 2009; 27(32):4320-4.