Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

Original Article

Evaluating novel adjuvant systems for the induction of humeral and cellular immune responses in hepatitis C virus capsid protein immunization

Aghasadeghi MR , Sadat SM, Bahramali G, Hekmat S, Motevali F, Alizadeh S, Kadkhodaeian S, Rouhvand F*

Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran

Received August 19, 2009; Accepted February 1, 2010

Abstract:

Background: As a worldwide problem, hepatitis C Virus (HCV) infection similar to HIV and vaccine studies on HCV is among the hottest research topics in the field. Such a vaccine should elicit strong humeral and cellular responses against HCV antigens (Ags). The major aim of the present study was to compare and optimize the responses against HCV core protein (HCVcp) immunization formulated in novel human compatible adjuvants.

Materials and Methods: BALB/c mice were immunized by HCVcp, purified in native conditions and in different adjuvant formulation in separate following groups: Ag+CpG, Ag+M720 (Montanide ISA 720), Ag+F127 (Pluronic acid) and cocktails of Ag+F127+CpG and Ag+M720+CpG. ELISA-based assays were used to analyze IgG, cytokine and CTL responses.

Results: The M720 (+CpG) immunized mice developed the highest HCVcp-specific titrations of total IgG,IgG1, 2a, 2b, and that of IFN-γ and IL-4 cytokines. HCVcp-specific-CTLs against relevant MHC class I peptides were detected only for Ag+M720+CpG, Ag+M720, and Ag+CpG groups, could be blocked by antimouse-CD8 antibodies and were stable for one year post-immunization.

Conclusions: The M720 formulation of HCVcp (with a synergistic effect by inclusion of CpG) induces equally strong Th1/Th2 responses and stable CTLs.

Keywords: Core protein, HCV, Novel adjuvant, Immunization in BALB/c

* **Corresponding Author.**
Email: rfarzin@pasteur.ac.ir
Tel: 0098 21 669 69291
Fax: 0098 21 669 69291

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences Spring 2010; Vol 14, No 1, Pages 26-39

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

ارزیابی چند سیستم ادجوانت جدید برای ایجاد پاسخ ایمنی همورال و سلولی در ایمنی زایی با پروتئین کپسید ویروس هپاتیت C

محمد رضا آقاصادقی [۱]، سید مهدی سادات [۲]، گلناز بهرامعلی [۲]، سهیلا حکمت [۳]، فاطمه متولی [۲]، شهاده علیزاده [۲]
سمیه کدخدائیان [۲]، فرزین روحوند [۱*]

خلاصه

سابقه و هدف: عفونت ویروس هپاتیت C همانند HIV یکی از معضلات عمده بهداشت جهانی است، از این رو مطالعه برای تولید واکسن بر علیه ویروس هپاتیت C (HCV) یکی از موضوعات بسیار مهم تحقیقاتی می‌باشد. واکسن تهیه شده باید پاسخ‌های سلولی و هومورل قوی را در مقابل آنتی ژن‌های HCV ایجاد نماید. لذا، هدف اصلی مطالعه حاضر مقایسه و بهینه سازی پاسخ‌های ایمنی بر علیه پروتئین کپسید (HCVcp) در ایمنی زایی با ادجوانت‌های جدید قابل استفاده در انسان، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: موش‌های BALB/c به وسیله HCVcp تخلیص شده در شرایط Native و با استفاده از ادجوانت‌های مختلف در گروه‌های: Ag + CpG، Ag + F127 (Pluronic acid)، Ag + M720 (Montanide ISA 720)، Ag + M720 +CpG، Coccktails of Ag + F127 + CpG تزریق شدند و تست‌های الایزا برای آنالیز IgG، سایتوکاین و پاسخ‌های CTL انجام شد.

نتایج: گروه موشی ایمنی زایی شده به وسیله M720 +CpG بالاترین تیتر آنتی بادی‌های IgG، IgG 2a، IgG1، IgG 2b، اینترفرون گاما و اینترلوکین 4 را نشان دادند. CTL های اختصاصی HCVcp برعلیه پپتیدهای MHC Class I، در گروه‌های Ag + M720 + CpG، Ag + M720 وAg +CpG مشاهده شدند که به وسیله آنتی‌بادی‌های Anti mouse CD8 مهار شده و پاسخ‌ها تا یک سال بعد از ایمنی زایی پایدار بودند.

نتیجه گیری: ترکیب M720 با آنتی ژن HCVcp (با یک اثر سینرژیک همراه با CpG) باعث القای همزمان پاسخ‌های قوی Th1/Th2 و CTL پایدار می‌گردد.

واژگان کلیدی: پروتئین Core، هپاتیت C، ادجوانت جدید، ایمنی زایی در موش

فصلنامه علمی ـ پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، صفحات ۳۹-۲۶

مقدمه

آلودگی با ویروس هپاتیت C (HCV) یکی از مهمترین عفونت‌های خونی است که باعث بروز بیماری‌های مزمن کبدی می‌گردد؛ این ویروس در سال ۱۹۸۹ شناسایی شد [۱]. میزان شیوع جهانی عفونت HCV در حدود ۳ درصد بوده که چهار برابر میزان شیوع HIV است و این مورد بیان‌گر آن است که بیش از ۲۰۰ میلیون نفر به این بیماری مزمن مبتلا بوده و هر ساله ٤ میلیون نفر نیز به این تعداد افزوده می‌شود [۲]. ابتلای حتی ۱۰ درصد از مبتلایان به HCV، به سیروز کبدی یک تهدید جدی علیه سلامت ملی و جهانی خواهد بود [۳].

علی‌رغم شمار زیاد افراد مبتلا، هنوز هیچ گونه واکسن مؤثری علیه HCV وجود نداشته و مؤثرترین درمان ضد ویروسی موجود (ترکیبی از INF-γ و ریباویرین) تنها در کمتر از ۵۰ درصد بیماران مؤثر می‌باشد [۳]؛ بنابراین تولید یک واکسن مؤثر و مفید علیه این پاتوژن ویروسی و پیشگیری از عواقب ناشی از این عفونت ضروری بوده و جزء اولویت‌های تحقیقاتی است. HCV حاوی ژنوم تک رشته‌ای RNA مثبت بوده که کد کننده سه پروتئین ساختاری (Core، E1، E2) و شش پروتئین غیرساختاری (NS) می‌باشد. ژنوم این ویروس دارای قدرت بالای جهش‌زایی است و به علت هتروژن بودن ژنوم، شش ژنوتیپ مختلف و بیش از ۷۰ زیرگونه برای آن معرفی شده است [٤،٥]. هتروژن بودن ژنوم و قابلیت بالای جهش زایی و در نتیجه تغییرات آنتی ژنی این ویروس، معضل بزرگی جهت درمان و طراحی واکسن برای چنین ویروسی با توانایی تغییر بالاست [٣،٦]. نشان داده شده است که ایجاد یک پاسخ ایمنی سریع و قوی توسط Th_1 و Th_2 به همراه پاسخ‌های ایمنی سلولی Multi-specific نسبت به پروتئین‌های

[۱] استادیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
[۳] مربی، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
* نشانی نویسنده مسوول:
تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، گروه هپاتیت و ایدز و آزمایشگاه بانک ژن نوترکیب ایران
تلفن: ۰۲۱ ۶۶۹۶۹۲۹۱ دورنویس: ۰۲۱ ۶۶۹۶۹۲۹۱
پست الکترونیک: rfarzin@pasteur.ac.ir
تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۸ تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۱۰/۱۲

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

HCV، باعث کاهش و محدودیت تکثیر ویروس تا پاک‌سازی نهایی آن از بدن میزبان آلوده می‌شود [۷،۳]. علاوه بر این، بسیاری از شواهد بیان‌گر آن است که احتمالا CTL های CD_8^+ نقش حیاتی در حذف HCV طی دوره پاک‌سازی خود به خودی ویروس بدون درمان با اینترفرون و همچنین درحین درمان ضدویروسی با اینترفرون بازی می‌کند [۹،۸،۳]. ژن مربوط به پروتئین Core ویروس هپاتیت C (HCVcp)، در بین ژنوتیپ‌های مختلف HCV از محافظت شده‌ترین ژن‌هاست؛ همچنین این پروتئین دارای چندین شاخص خوب شناخته شده B-Cell، T-Cell و CTL بوده و نشان داده شده است که حضور CTL های اختصاصی علیه پروتئین Core درحین درمان با INF باعث بهبود سریع‌تر افراد مبتلا می‌شوند [۱۱،۱۰]. به علاوه مشاهده شده است که علی‌رغم حضور چنین CTL هایی علیه HCVcp امکان پیدایش واریانت‌های جهش یافته فرار کننده از CTL برای این پروتئین که قبلا شرح آن برای دیگر آنتی ژن‌های ویروسی مانند NS3 و E2 داده شده است، ایجاد نمی‌گردد [۱۲]. بنابراین HCVcp یک کاندید اولیه برای به کارگرفته شدن در واکسن HCV برای درمان (Therapeutic) و پیشگیری (prophylactic) علیه عفونت HCV است و به همین دلیل مطالعاتی جهت کاربرد این پروتئین (HCVcp) در ساخت واکسن احتمالی علیه این عفونت انجام گردیده است [۱۴،۱۳،۳]؛ هرچند در غیاب آدجوانت‌های مناسب، آنتی‌ژن‌های نوترکیب مانند HCVcp، عموما، پاسخ‌های ایمنی سلولی ضعیف و متمایل به Th_2 القاء می‌نمایند [۱۵]. به علاوه، علی‌رغم بی ضرر بودن آنها، آدجوانت‌هایی مانند ترکیبات آلومینیومی (آلوم) که اخیرا جهت مصرف گسترده در انسان تأیید شده‌اند، به نسبت ضعیف بوده و اغلب نیازمند چندین دوره ایمن سازی به منظور تولید آنتی بادی‌های حفاظتی می‌باشند و البته این آدجوانت‌ها نیز پاسخ سلولی متمایل به Th_2 را نیز ایجاد می‌نمایند [۱۶]؛ بنابراین تحقیقات درمورد آدجوانت‌های سازگار با انسان در ترکیب با آنتی ژن‌های مختلف جهت تهیه واکسن ضرورت دارد. الیگودی اکسی نوکلئوتیدهای (ODNs) در بردارنده سیتوزین-گوانین دی متیله شده (CpG) موتیف‌های دی نوکلئوتید (CpG ODNs) به عنوان گروه جدیدی از آدجوانت‌ها هستند که به واسطه افزایش عرضه پروتئین‌های محلول به وسیله MHC Class I-restricted T cells به طور غیر مستقیم باعث تحریک ایمنی ذاتی و همچنین سلول‌های B و T از طریق واکنش با Toll-like receptor (TL R9) می‌شوند [۱۷]. برخی گزارش‌های جدید مبنی بر ایمن سازی همزمان توسط CpG ODNs به همراه پروتئین‌های نوترکیب NS3 وNS5B از HCV [۲۰-۱۸] و ذرات شبه ویروسی(VLPs) بیان شده در سلول حشره شامل Core/E1/E2 منتشر شده است [۲۲،۲۱]. Montanid (M720) ISA 720 یک ادجوانت نسبتا جدید بوده (Seppic, France) که دارای روغن‌های متابولیزه شده طبیعی و ترکیب تصفیه شده mannide می‌باشد. این آدجوانت به عنوان یک انبار یا محل نگهداری جهت کاهش سرعت رهایش و محافظت آنتی ژن از آنزیم‌های پروتئولیتیک و همچنین بهبود ارائه آنتی ژن به سلول‌های T، عمل می‌نماید. افزایش پاسخ‌های ایمنی به وسیله ترکیبی از M720 و CpG با پروتئین‌های HCV-NS3 و 5B در موش‌های ایمن شده [۱۸] و در مطالعات مربوط به تهیه واکسن مالاریا و نیز بررسی ایمنی‌زایی آنها در حیواناتی مانند موش، خرگوش و میمون گزارش شده است [۲۴،۲۳]. Pluronic F127 (F127)، آدجوانت پیشنهادی دیگری است که یک Copolymer surfactant غیریونی و تثبیت کننده بوده و شکل طبیعی پروتئین‌ها را در غلظت‌های بالا حفاظت می‌کند؛ این ماده به طور وسیعی در صنعت داروسازی جهت فرآورده‌هایی که مصرف انسانی دارند، استفاده می‌شود [۲۵]. اخیرا نشان داده شده است که کاربرد همزمان F127 به همراه CpG نسبت به هم اثرات سینرژیکی داشته و منجر به افزایش پاسخ ایمنی نسبت به سم کزاز (TT) می‌گردد [۲۷،۲۶]. در یک مطالعه، ما بعد از اقدام به بیان و تخلیص HCVcp (amino acids 2-122) در *E.coli* [٤] پتانسیل این آنتی ژن در ایجاد ایمنی زایی و تولید mAbs را بررسی کردیم [٥]. در مطالعه حاضر، ضمن معرفی یک روش تخلیص بسیار موثر برای حداکثر خلوص، بررسی دقیقی بر اثر ادجوانت‌های جدید در میزان ایمنی‌زایی این پروتئین انجام گرفته است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر گواه آن است که HCVcp بیان شده در *E.coli* و تخلیص شده در شرایط طبیعی، به جهت افزایش احتمال ذره سازی [۲۸] می‌تواند بسته به نوع ترکیب آدجوانت، باعث القای سطوح مختلفی از پاسخ‌های Th1/Th2 وCTL در موش‌های BALB/C شود؛ همچنین، یک اپی توپ جدید $CD^{4+}CD^{8+}$CTL اختصاصی HCVcp که در محدوده اسیدهای آمینه ۳۹-۲۷ از پروتئین قرار گرفته در این مطالعه معرفی شده است.

مواد و روش‌ها

تولید، شناسایی، القاء، بهینه سازی و بررسی بیان پروتئین HCVcp :

پلاسمید بیانی pIVEX.2.3 دارای ژن مربوط به ساختار اول (domain I) از پروتئینCore (آمینواسید ۱۲۲-۲ HCVcp)

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

توسط روش‌های استاندارد در مطالعه قبلی ما [٤] ساخته و در باکتری *E.coli* BL21-AI (Invitrogen USA) ترانسفورم شد. پروتئین بیان شده تحت سیستم القاء پروموتور araBAD با کاربرد آرابینوز ۰/۲ درصد بیان شده [۲۹] و به منظور ایمن سازی موش ها، به روش Affinity-Chromatography و با استفاده از ستون NI-NTA-Agarose(Qiagen) (نیکل- نیتریلوتری استیک اسید) و شرایط طبیعی (Native) باکمک ایمیدازول تخلیص گردید و در نهایت با استفاده از ستون‌های PD-10 (Amersham Biosciences, Germany) غلظت بالای ایمیدازول حذف گردید. در پایان، پس از دو بار تخلیص پروتئین با استفاده از اولترافیلتراسیون و از طریق تغلیظ کننده (VIVa Spin Viva Science–Germany) تغلیظ گردید. درجه خلوص، انسجام و وزن مولکولی دقیق پروتئین نوترکیب HCVcp توسط SELDI-TOF اسپکتروفتومتری جرمی با استفاده از NPI Chip Array با توجه به پروتکل شرکت سازنده، مورد بررسی قرار گرفت. داده ها توسط Protein Chip software نسخه 3.2.1 (Chifehergen Biosystem) آنالیز شد و در نهایت بخش پروتئینی با خلوص بالای ۸۵ درصد برای ایمنی سازی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین سطح اندوتوکسین از تست QCL-1000 Chromogen استفاده شد.

ایمنوبلاتینگ:

پس از ارزیابی پروتئین اولیه نوترکیب توسط SDS-PAGE12%، پروتئین مذکور به غشاء نیتروسلولوزی منتقل شده و به وسیله Skimmed milk 3% بلوکه شد. سپس، نوارهای غشاء حاوی پروتئین در آزمایش‌های مختلف توسط بیماران HCV مثبت مخلوط شدند. سرم موش‌های ایمن شده و مونوکلونال آنتی-بادی موشی HCV Core که اپی توپ (21-40 aa) در انتهای N از HCVcp را شناسایی می‌کند، مورد استفاده قرار گرفت (Alexis Biochmical uk). بعد از مراحل متعدد شستشو، نوارها به همراه Anti-human IgG-HRP (فقط در موارد سرم انسانی) و یا Anti-mouse IgG-HRP انکوبه شده و در نهایت با استفاده از سوبسترای DAB مورد ارزیابی قرار گرفتند. سرم‌های انسانی HCV منفی و سرم موش ایمن نشده به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند.

فرمولاسیون ایمونوژن:

محلول اولیه Pluronic F127 (sigma) به صورت 16% (w/w) در PBS سرد شده را در یخ تهیه کرده و نهایتا محلول F127,8% در ترکیب با آنتی ژن (HCVcp) جهت ایمن سازی موش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. HCVcp با Montanide ISA 720 به نسبت ۷:۳ (فاز روغنی به آبی)، با آنتی ژن مخلوط گردید. در مطالعه حاضر CpG ODN 1826 (5' TCC ATG ACGTTC CTG ACG TT 3')مربوط به موش BALB/c مورد استفاده قرار گرفت [۳۰]. برای این منظور CpG به ترکیبات مورد نظر در غلظت ۵۰µg به ازای هر موش اضافه شد. جهت ارزیابی ترکیبات جدید، ایمنی‌زایی آنها به وسیله ترکیب HCVcp و ادجوانت‌های کلاسیک کامل و ناقص فروند (C/IFA) مورد مقایسه قرار گرفتند. ترکیبات مشابهی از ادجوانت‌ها بدون حضور HCVcp و یا جایگزین کردن آن با PBS به عنوان کنترل منفی به کار رفتند. به طور کلی ۹ ترکیب آماده تزریق با فرمولاسیون: Ag+C/IFA, HCVcp (Ag+PBs), Ag+F127,Ag+M720, Ag+CpG و مخلوطی از Ag+F127+CpG و Ag+M720+CpG و در گروه کنترل PBs+F127+CpG, PBs+M720+CpG مورد بررسی قرار گرفت. جهت ترکیب ۳µg از آنتی ژن به همراه آدجوانت‌ها در غلظت‌های یاد شده آنتی ژن– ادجوانت توسط یک سرنگ دو سر مخلوط کننده کاملا مخلوط شده تا در نهایت یک مخلوط سفید شیری رنگ همگن برای تزریق به دست آید.

ایمن سازی موش‌ها:

ده موش ماده BALB/c، ۸-٦ هفته‌ای و با وزن متوسط ۲۰ گرم برای هر گروه به صورت داخل عضلانی در بخش قدامی عضلات درشت نی به وسیله ۱۰۰µl از ایمنوژن ها در هفته های ۰، ۳ و ٦ ایمن سازی شدند [۳۱]. سه هفته بعد از آخرین تزریق، ۵ موش از هر گروه انتخاب و کشته شده و نمونه‌های خون و طحال آن‌ها جمع آوری و بقیه موش‌ها جهت مطالعات دراز مدت تا یک-سال دیگر نگهداری شدند. طبق مطالعات و گزارش‌های قبلی روی موش‌هایی که با HCVcp ایمن شده بودند، ایمنی زایی بوسیله ۳µg از HCVcp، به ازای هر موش با ۲ تزریق یادآور انجام گرفت [١٤].

تست ELISA:

واکنش ایمنی HCVcp نسبت به سرم های انسانی HCV مثبت و پاسخ آنتی بادی موش های ایمن شده با HCVcp به وسیله ELISA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به طور خلاصه، پروتئین تخلیص شده HCVcp به میزان

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

۱ μg/ml به عنوان مولکول پوشاننده در کف پلیت های الیزا (Nunc, Denmark) 96-well polyvinyl chloride plate مورد استفاده قرار گرفت. بعد از شستشو و مراحل بلوکه کردن، چاهک‌ها با سرم های انسانی HCV مثبت رقیق شده و یا سرم‌های موشی(به دست آمده توسط خون‌گیری از شبکه Retro Orbital) پر شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °c انکوبه شدند. بعد از شستشو، آنتی بادی ثانویه Anti Human IgG-HRP یا Goat Anti Mouse IgG-HRP اضافه و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. در نهایت با اضافه نمودن TMB (Tetrametyhl Benzidine, Sigma) و پس از افزودن محلول متوقف کننده در طول موج ٤٥٠nm جذب نوری چاهک‌ها قرائت شد. رقت‌های سرمی مختلف بر اساس آنتی بادی (OD=۰/۵) تعیین شد. تمامی آزمایش‌ها برای حداقل پنج موش و با سه بار تکرار انجام پذیرفت. ایزوتایپ‌ها و زیر کلاس‌های IgG همان‌گونه که در بالا توضیح داده شد با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی IgG_1، $IgG_{2\alpha}$، IgG_{2b}، IgG_3 موشی و نهایتا با به کارگیری Anti Goat IgG-HRP تعیین گردید. در تمامی آزمایش‌ها میزان cut-off به مقدار دو برابر میانگین جذب کنترل منفی (سرم موش‌های ایمن نشده یا سرم‌های منفی انسانی) در نظر گرفته شد و هر نمونه سه بار مورد بررسی قرار گرفت.

پپتیدها:

برای تحریک سلول‌های طحال در شرایط آزمایشگاه، پنج پپتید اختصاصی (specific peptide HCVcp H-2 ^{d} restricted) مربوط به پروتئین Core که وابسته به پاسخ‌های CD^{8+}CTL و شامل ۱۳-۱۰ آمینواسید بودند (P1-P5)، با حداقل ۹۵ درصد خلوص سنتز شدند (Mimotopes, Australia). پپتید P1 (aa ۲۵-۱٦) با توالی NRRPQDVKFP که در مطالعات قبلی به عنوان یک اپی توپ Sub-dominant موشی که با پاسخ ضعیف در CTL و همچنین پپتید P5 با توالی DLMGYIPLVGAPLG که در توالی خارج از محدوده پروتئین مورد ارزیابی (aa ۱۲۲-۲) قرار دارد، به عنوان کنترل منفی استفاده شدند [۳۲]. پپتید P3 (اسید آمینه ٤۸-۳۹) با توالی RRGRRLGVRA که در مطالعات قبلی به عنوان یک آنتی ژن ایمنودومینانت قوی معرفی شده است، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۳۳]. پپتید P2 (aa ۳۹-۲۷) با توالی GCQIVGGVYLLRP و پپتید (P4 aa ۱۱۹-۱۱۰) با توالی TDPRRRSRNL بر اساس نرم افزار HLA peptide binding prediction software، که از طریق آدرس زیر قابل دسترسی است: http://biomos.dert.nih.gov/moio/hla.bind طراحی شد. همه پپتیدها در DMSO و در غلظت ۱۰ mg/ml حل گردیده و به عنوان محلول ذخیره نگهداری شدند.

ارزیابی ترشح سایتوکاین:

میزان آزاد سازی سایتوکاین توسط کیت Murine Cytokine ELISA (Ucytech, Netherland) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین شد. به طور خلاصه، سلول های طحال (Effector cells) موشی به میزان ۲×۱۰^{٦} Cell/ml در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ mM گلوتامین و آنتی بیوتیک در حجم ۲۰۰ μl در غیاب یا در حضور HCVcp (۱۰ μg/ml) در پلیت های استاندارد الیزا کشت داده و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، Co_2 (5%)، ۱۰۰ μl از مایع روی کشت (عاری از سلول) از هر چاهک جمع آوری گردید و تیتر IL-4 و IFN-γ توسط کیت مذکور سنجش گردید.

ارزیابی لنفوسیت‌های T سایتوکسیک در محیط برون تنی:

CTL های اختصاصی HCVcp به وسیله تست Lactate Dehydrogenase (LDH) (promega، Cytotox96) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با اندکی تغییر در روش آزمایش، اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، یک هفته قبل از جداسازی سلول‌های طحال، تزریق‌های یادآور HCVcp روی موش‌ها انجام شد. سپس سلول‌های طحال (Effector cells) موش‌های ایمن شده به مدت ٦-۵ روز در محیط DMEM حاوی FBS ۵ درصد M $۱۰^{-۵}$، 2-ME، و ۵ U/ml Murine IL-2 در حضور یا عدم حضور محرک هر یک از پپتیدهای سنتتیک یا پروتئین‌های HCVcp به میزان ۱۰ μg/ml به طور جداگانه کشت داده شد؛ همچنین، سلول‌های هدف (Target cells) P_{815} (رده سلولی ماستوسیتومای موش BALB/c) با محرک تحریک شده و کشت داده شدند و در نسبت های گوناگون E/T (Effector/Trget)، ۵/۱، ۱۵/۱و ۲۰/۱ در نظر گرفته شدند. در نهایت، در هر آزمایش فعالیت لیتیک (Lytic) به وسیله ٦-۵ ساعت انکوباسیون E/T و سپس اندازه‌گیری تیتر LDH آزاد شده به واسطه سنجش جذب نوری در ٤۹۰ nm محاسبه شد و میانگین آزمایش‌های سه گانه تهیه شد. درصد لیز اختصاصی، طبق فرمول ارائه شده در کیت محاسبه و کنترل‌های تست طبق پیشنهاد کارخانه سازنده در نظر گرفته شده بود. در تمامی آزمایشات میزان

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

رهاسازی خود به خودی LDH، در طی انجام تست، همیشه کمتر از ۵ درصد و بیشترین میزان رهاسازی (لیز در حضور ۱ درصد Triton×۱۰۰) بوده است. جهت ارزیابی نوع سلول‌های CTL از دو نوع آنتی بادی مونوکلونال موشی ضد CD_4^+، CD_8^+ (Dako) استفاده شد.

بررسی آماری:

تفاوت‌های معنی‌دار آماری و تست‌های CTL، میزان ترشح سایتوکاین و تیتر آنتی بادی اختصاصی تولید شده در گروه-های موشی ایمن شده، به وسیله آزمون‌های t (در مورد مقایسه دو گروه) و یا ANOVA (در مورد مقایسه بیشتر از دو گروه) بررسی و ارزیابی شد. در موارد انجام ANOVA گروه دارای اختلاف معنی‌دار با تست تعقیبی توکی مشخص شدند. در تمامی آزمایشات $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

خصوصیات HCVcp بیان شده در *E.coli*:

همان طور که در شکل شماره ۱. الف نشان داده شده است، بیان بالای HCVcp پس از افزودن آرابینوز در سیستم *E.coli* BL21-AI مشاهده گردید که تحت کنترل پروموتور araBAD می‌باشد [۲۹]. با استفاده از آنالیز دانسیتومتری (Lab work software ,UK) باند ۲۱ کیلودالتونی بر روی ژل SDS-PAGE با درجه خلوص ۸۵ درصد مشاهده می‌گردد. محصول به دست آمده برای HCVcp از قسمت قابل حل (سیتوزولیک) باکتری به شکل طبیعی (Native)، حدود ۲/۵ mg/ml بود و شامل کمتر از ۲۵ واحد اندوتوکسین در ۵۰ µg از پروتئین مذکور بوده است. آنالیز انجام شده توسط Western blotting (شکل ۱. ج) و الایزای سرم انسانی HCV مثبت (اطلاعات مربوط نشان داده نشده است) آنتی ژنیسیته مناسب از HCVcp را نشان داد. وزن مولکولی HCVcp (با اسید آمینه های اضافه شامل برچسب هیستیدینی) شکل شماره ۱، ۱۸ KDa محاسبه گردید.

بررسی پاسخ هومورال و سنجش ترشح سایتوکاین در گروه‌های مختلف موش‌های ایمن شده:

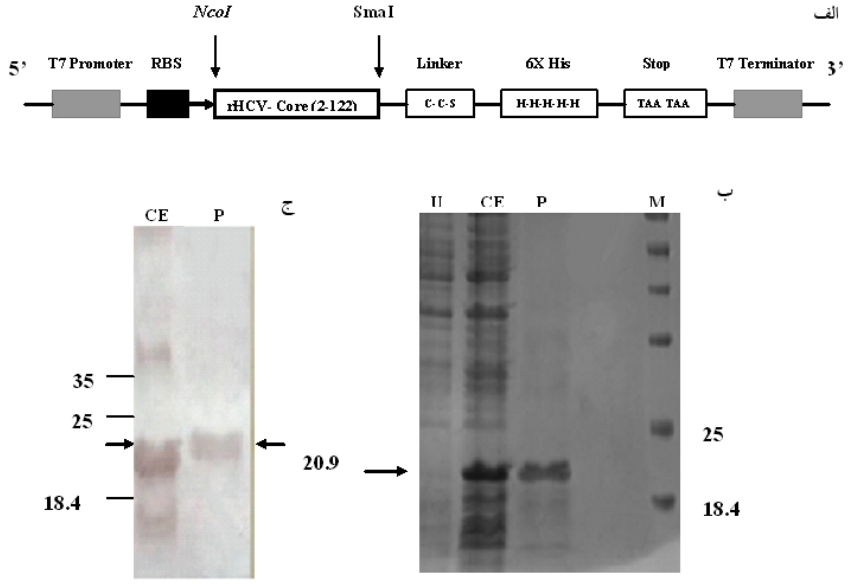
در این مطالعه تمام حیوانات واکسینه شده با فرمولاسیون-های مختلف، پاسخ IgG اختصاصی با تیترهای مختلف را نشان دادند (شکل شماره ۲). ایمن سازی موش‌ها با HCVcp همراه با ادجوانت ها M720+CpG به طور معناداری تیتر بالاتری از نوع IgG اختصاصی را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد. در فرمولاسیون ترکیب فوق، اثرات سینرژیک برای این دو آدجوانت به وضوح قابل مشاهده است. در مقابل، پاسخ‌های اختصاصی آنتی‌بادی در گروه‌های F127، F127+CCpG و C/IFA (شکل شماره ۲) تفاوت معناداری را نشان ندادند؛ هرچند که مقداری پاسخ آنتاگونیستی نیز برای گروه CpG+F127 نیز مشاهده گردید. از آنجایی که تولید سایتوکاین IL-4 با پاسخ IgG_1 مرتبط بوده و تولید سایتوکاین IFN-γ نیز با تولید IgG_{2a} ، IgG_{2b} مرتبط می-باشد، و همان طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است، در ارزیابی ایزوتایپ‌های IgG در تمامی گروه‌ها، IgG_{2a} ایزوتایپ غالب بود (شکل شماره ۲). هر چند گروه M720 به طور معناداری تیترهای بالاتری از IgG_{2a} را نشان دادند، ولی مجموعه شامل M720+CpG اثر آنتاگونیستی ناچیزی روی ایزوتایپ IgG_{2a} داشتند و در مقابل تیتر IgG_{2b} به طور ناچیزی به وسیله این ترکیب آدجوانتی افزایش یافته بود (شکل شماره ۲). در مجموع در موش‌های ایمن شده با F127, F127+CpG,CpG, C/IFA نسبت IgG2a/IgG1 سرم Anti HCV پایین‌تر از ۱ بود (پاسخ جهت دار Th_2). گروه ایمن شده با فرمولاسیون آنتی-ژن HCVcp (Ag+PBS) به تنهایی، فقط باعث ایجاد تیترهای پایین آنتی بادی اختصاصی IgG یا سایتوکاین‌های ترشح شده نسبت به گروه کنترل گردید. همان‌گونه که در شکل شماره ۳ نشان داده شده، ایمنی زایی با فرمولاسیون M720، M720+CpG وHCVcp، C/IFA به صورت معناداری تیترهای بالایی از IFN-γ (~۱۰۰pg/ml) نسبت به سایر گروه‌های آدجوانتی شامل گروه CpG (~۲۰۰pg/ml) و گروه CpG+F127 (~۱۰۰pg/ml) را نشان داد. هیچ پاسخ معناداری از ترشح IFN-γ در موش‌های ایمن شده با فرمولاسیون F127 مشاهده نگردید. بر اساس داده‌ها، اثرات سینرژیک ضعیفی به وسیله فرمولاسیون CpG+M720 مشاهده شد و از طرفی در مقابل اثر آنتاگونیستی F127 در برابر CpG در مورد ترشح سایتوکاینIFN-γ مشاهده گردید (شکل شماره ۳). استثنائا تیتر بالای ترشح سایتوکاین (~۵۰۰ pg/ml) IL-4 فقط برای فرمولاسیون M720 و M720+CPG نشان داده شد (شکل شماره ۳).

پاسخ‌های CTL فرمولاسیون‌های HCVcp با ادجوانت های مختلف:

پاسخ‌های CTL در گروه‌های ایمن شده با فرمولاسیون M720+CpG، M720 و CpG درصد بالایی از لیز اختصاصی سلول‌های هدف (P815) را در نسبت‌های مختلف E/T نشان دادند (شکل شماره ٤). در مقابل در سایر گروه‌های ایمن شده با

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

فرمولاسیون‌های C/IFA، HCVcp، F127، F127+CPG و گروه‌های کنترل، هیچ پاسخ CTL قابل ملاحظه و معناداری مشاهده نشد. هیچ پاسخی در تحریک با پروتئین خالص و یا پپتیدهای کنترل منفی(P1، P4) مشاهده نگردید؛ اما، همان‌گونه که در شکل ٤ مشاهده می‌شود، در تحریک با پپتیدهای ۲ و ۳ پاسخ سلولی اختصاصی CD_8^+T-cell مشاهده گردید. به علاوه، بلوکه کردن CTL با مونوکلونال آنتی‌بادی ضد موشی CD_8^+ نشان داد که سلول‌های موثر (Effector) از نوع $CD_8^+ CD_4^-$ بودند؛ زیرا فقط Anti CD_8^+ و نه مونوکلونال آنتی بادی ضد موشی CD_4^+ سبب افت پاسخ سلولی (CTL) گردید. (شکل‌های شماره ٤. د، ٤. ه). جالب است که پس از گذشت یک‌سال از ایمنی‌زایی موش-ها با فرمولاسیون‌های CPG, M720, M720+CPG پاسخ CTL با محرک‌های پپتیدی P_3 و P_2 همچنان قابل مشاهده بود.

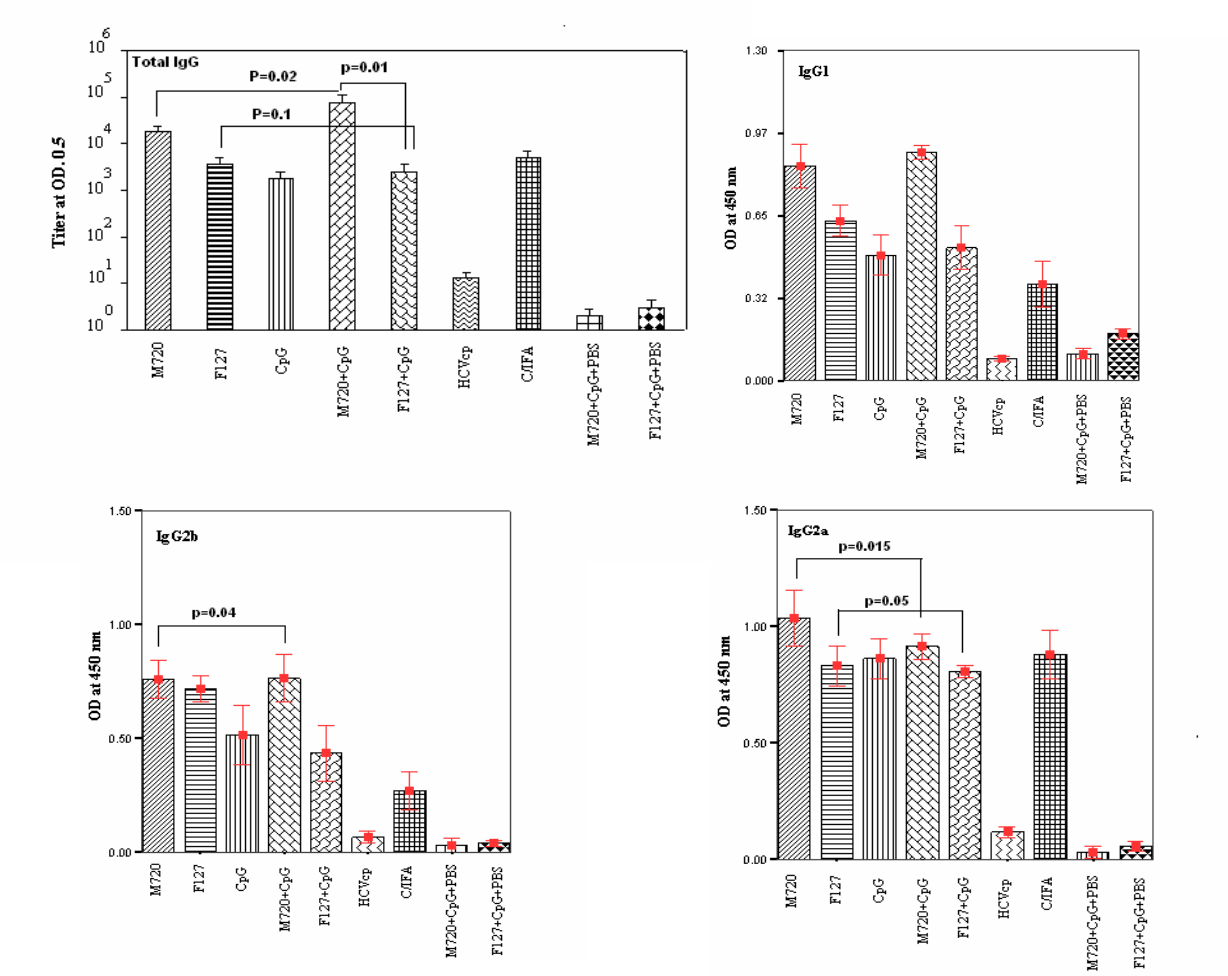


شکل شماره ۱- کلونینگ و بیان HCVcp در *E.coli* -BL21AI (الف) تصویر شماتیک وکتور بیانی pIVEX2.3 شامل ژن HCVcp: RBS سایت اتصال ریبوزوم. ATG که قسمتی از سایت برش *NcoI* می‌باشد، کدون آغازین است. آنالیز بیان پروتئین در قسمت ب به وسیله SDS-PAGE و در قسمت ج با وسترن بلات نشان داده شده است. ستون U مربوط به توده باکتری استخراج شده قبل از القاء به وسیله آرابینوز می‌باشد. ستون CE توده باکتری لیز شده سه ساعت بعد از القاء است. ستون P پروتئین HCVcp تخلیص شده به وسیله موش Native از لیز سلولی. ستون M مارکر پروتئینی در مقیاس کیلودالتون می‌باشد. مونوکلونال آنتی‌بادی بر علیه اپی توپ اسید آمینه ٤٠-٢١ در ناحیه انتهایی آمینی HCVcp استفاده شده است. فلش‌های نشان داده شده در قسمت چپ باندهای پروتئینی سایز KDa ۲۰/۹ از HCVcp را که به وسیله SELDI-TOF اندازه‌گیری و تایید شده، نشان می‌دهد (اختلاف در محل باندهای پروتئینی در ستون‌های CE و P به دلیل الکتروفورز مقادیر بالایی از پروتئین استخراج شده در ژل می‌باشد که به صورت پروتئین دایمر ناحیه KDa ٤٠ فقط در ستون CE نشان داده شده است و در ستون P تخلیص شده دیده نمی‌شود).

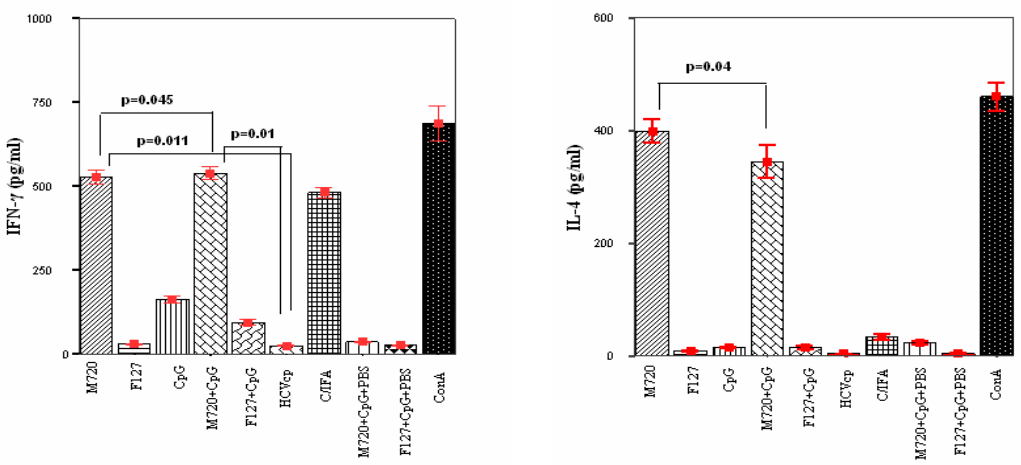
بحث

در مطالعه حاضر ضمن ارائه یک روش بهینه برای بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب Core ویروس هپاتیت C، بررسی ایمنی زائی ترکیب این پروتئین با ادجوانت‌های قابل کاربرد در انسان انجام پذیرفت. محصول به دست آمده برای HCVcp از قسمت قابل حل (سیتوزولیک) در فرم طبیعی (Native) حدود mg/lit ۲/۵ بود. آنالیز انجام شده توسط وسترن بلاتینگ و الیزا بر روی سرم انسانی HCV مثبت بیانگر آنتی ژنیسیتی مناسب HCVcp به دست آمده می‌باشد. مقدار محاسبه شده وزن مولکولی HCVcp تقریبا KDa ۱۸ بود، اما، این پروتئین کوتاه شده کپسید ویروس، حرکت نسبتا کندتری را در SDS-PAGE نشان داد و در حقیقت میزان اندازه گیری شده توسط روش اسپکتروفتومتری SELDI/TOF دقیقا KDa ۲۰/۹ بود. این نتایج با مطالعه قبلی که بر روی HCVcp (۲۰-۱ اسیدآمینه) در سیستم القایی IPTG که در باکتری *E.coli* انجام گرفته (KDa ۲۱) مطابقت دارد [٣٤]. پروتئین کامل کپسید HCV (۱۹۱-۱ اسید آمینه) دارای سه بخش اصلی می باشد؛ بخش هیدروفیلیک (اسیدآمینه‌های ۱۲۰-۱) و بخش‌های هیدروفوبیک باقیمانده بعدی [۳۵].

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

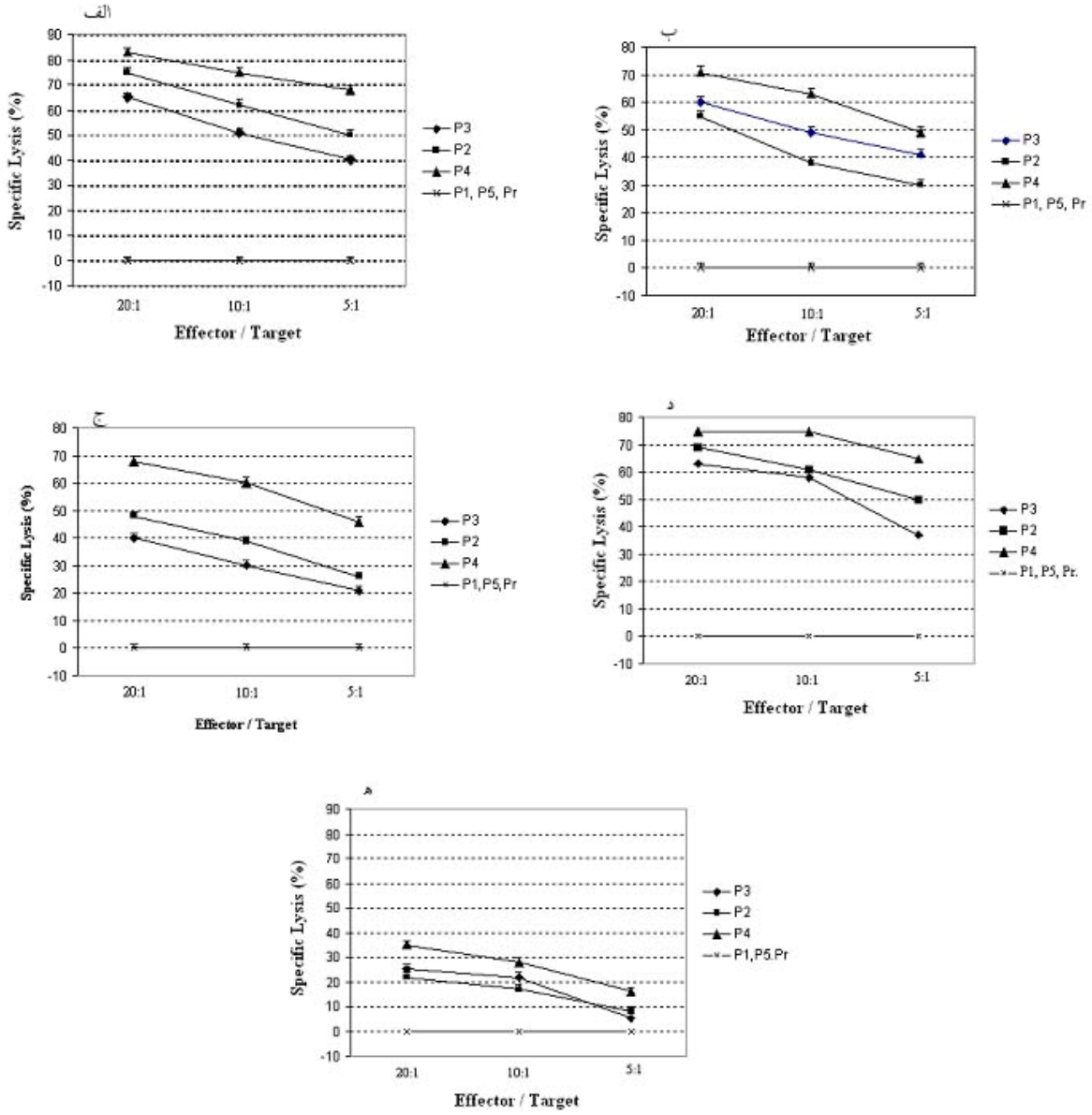


شکل شماره ۲- آنالیز پاسخ های هومورال (Total IgG و ایزوتایپ های اختصاصی) در موش های ایمن شده با فرمولاسیون های مختلف به روش الیزا. در دو گروه کنترل به جای آنتی ژن از PBS در فرمول مربوطه استفاده شده است؛ همچنین، گروه‌های مختلف موشی به صورت حروف اختصاری در محور افقی نمودارها نشان داده شده است (مراجعه به قسمت مواد و روش‌ها). تمامی تست ها بر روی سرم مخلوط شده موش‌ها و به صورت تکرار سه تایی و با در نظر گرفتن SD انجام گردیده است.



شکل شماره ۳- آنالیز ترشح سیتوکاین در موش‌های ایمن شده به وسیله پروتئین HCVcp در فرمول‌های مختلف. سلول‌های طحال موش دو هفته بعد از آخرین تزریق جداسازی و به وسیله (۱۰ μg/ml) از HCVcp یا ConA به (۲ μg/ml) به مدت سه روز تحریک و سپس سطح IL-4 یا IFN-γ مترشحه اندازه گیری شدند. هر فرمول به صورت مخفف در هر ستون عمودی در نمودار نشان داده شده است (در قسمت مواد و روش‌های متن کاملا توضیح داده شده است). هر تست برای ۵ موش و برای سه بار انجام شده است. انحراف از معیار و میانگین و SD در مقیاس pg/ml بیان شده است.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020



شکل شماره ٤- سنجش تست سایتوتکسیک T-لنفوسیت (CTL): فعالیت CTL اختصاصی بر علیه پروتئین HCVcp با استفاده از تست ارزیابی LDH-CTL در سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با فرمولاسیون مختلف متفاوت می‌باشد. سلول‌های طحال به وسیله پروتئین HCVcp یا اپی‌توپ‌های MHC I مولکول $H2^d$ در موش BALB/c (P1-P4) بعد از ٦ روز دوباره تحریک شدند. پپتیدهای P1 و P5 به عنوان نمونه کنترل منفی و P3 به عنوان کنترل مثبت و P2 و P4 برای این مطالعه طراحی شده اند. پاسخ‌های CTL فقط در گروه‌های M720+CpG (الف)، M72 (ب) و CpG (ج) دیده شده است و در سایر گروه‌ها مشاهده نشد. در گروه د فعالیت CTL به وسیله Anti mouse CD4 و در گروه ه فعالیت CTL به وسیله Anti mouse CD8 بلوکه شد که بر فعالیت سلول‌های موثر CTL با فنوتیپ $CD4^-CD8^+$ دلالت دارد (اطلاعات مربوط به تعیین فنوتیپ، فقط در گروه M720+CpG نشان داده شده است).

طبق گزارش‌های قبلی، سلول‌های *E.coli* که ناحیه کامل کپسید (۱۹۱-۱ اسیدآمینه) را بیان کرده بودند، مدت کوتاهی پس از القاء می‌میرند؛ درحالی‌که انواع فاقد ناحیه هیدروفوبیک به طور موفقیت آمیزی در سیستم پروکاریوت بیان می‌شدند [۳٤]. بنابراین در مطالعه حاضر دامین هیدروفیلیک HCVcp (۱۲۲-۱ اسیدآمینه) اولیه به عنوان قطعه مورد نظر برای کلون و بیان انتخاب شد و این قطعه اکثر اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T را در HCVcp شامل می‌شود. به علاوه، چنین حدس زده می‌شود که ناحیه (C – ترمینال) پروتئین کپسید شامل اپی توپ‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی بوده که از فعالیت سلول‌های T، CD_8^+ اختصاصی سلول در CTL effector مولد IFN-γ و یا تزاید سلول‌های لنفوسیتی T ممانعت به عمل می‌آورد [۳۵]. در حقیقت پروتئین HCVcp

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

بدون ناحیه هیدروفوبیک C-ترمینال آن در ایجاد پاسخ آنتی بادی و سلولی قوی‌تر موثر است [۳۶]. ساختار طبیعی ذره‌ای یک آنتی ژن ممکن است فاکتور مهمی در ایمنی زایی آن باشد؛ در خصوص HCVcp نیز توانایی تشکیل ذرات VLP که در اندازه ۳۰ nm می باشد گزارش گردیده [۲۸] و اشاره شده است که ناحیه پروتئین core (۱۹۸-۱ اسیدآمینه) بیان شده در سیستم *E.coli* شکل مناسب و طبیعی HCVcp را که ویژگی مهمی برای شکل گیری ذرات باشد، ایجاد می‌کند؛ در هر حال ممکن است بازآرایی ساختار (refolding) پروتئین پس از انجام تخلیص به روش دناتوره، سبب به هم ریختگی ساختمان پروتئین شود [۳۷]؛ از این رو در این مطالعه یک روش ساده و قابل دسترس برای تخلیص HCVcp به حالت طبیعی (Native) ابداع شد. این روش ممکن است شکل گیری ذره‌ای پروتئین را نیز افزایش دهد. در حقیقت آنالیزهای مقدماتی توسط روش الیزا نشان داد که تعیین آنتی‌بادی‌های Core ویروس هپاتیت C، در سرم‌های انسانی آلوده به ویروس، توسط پروتئین‌های تخلیص شده با روش Native بهتر از پروتئین‌های خالص شده به روش دناتوره می‌باشد (نتایج مربوطه نشان داده نشده است). در خصوص پاسخ‌های هومورال و ترشح سایتوکاین در گروه‌های مختلف موشی ایمن شده با فرمولاسیون‌های مختلف (آدجوانت‌های مختلف)، تیترهای متفاوت از IgG اختصاصی نشان داده شد (شکل شماره ۲). در بین گروه-های مطالعه، گروه ایمن شده با فرمولاسیون دو ادجوانت (CpG + M720) مشخص شد که این دو ادجوانت با هم اثر سینرژیک دارند. در تأیید نتایج تحقیق حاضر، مطالعات انجام شده در گذشته نیز بیانگر آن است که اضافه کردن CpG به ترکیبی از HCV-NS3 یا QuilA [۱۹] یا لیپوزوم [۲۰]، مخلوطی از HCV core harboring VLP و ASIB (ادجوانت‌های مونوفسفوریل لیپید A) [۲۲] و فرمولی از HBsAg با ادجوانت‌هایی مانند آلوم، ادجوانت‌های فروند و MLP [۳۸] و مخلوطی از گلیکوپروتئین هرپس ویروس گاوی با ادجوانت‌هایی بر اساس روغن در آب (O/W) به طور معناداری تیترهای بالاتری از Total IgG را در ایمن سازی موش‌ها نسبت به گروه‌های دیگر که CpG یا آدجوانت به تنهایی به کار رفته بود را موجب شده‌اند [۳۹]. سلول-های T کمکی و سایتوکاین‌هایی مانند IFN-γ و IL-4 که به ترتیب به وسیله سلول‌های Th_1 و Th_2 ترشح می‌شوند، با ایجاد پاسخ‌های IgG مرتبط هستند [۷،۳]؛ در حقیقت IL-4 با پاسخ IgG1 مرتبط بوده، در حالی‌که IFN-γ با تولید IgG2a، IgG2b مرتبط می‌باشد. در تمامی گروه‌های مطالعه ایزوتایپ غالب از نوع IgG2a (پاسخ سلول‌های Th_1) بوده است که بیشترین تیتر مربوط به گروه M720 می‌باشد و این در حالی است که ترکیب شامل M720+CpG اثر آنتاگونیستی ناچیزی بر روی این ایزوتایپ داشته است (شکل شماره ۲). با توجه به اینکه ترکیب HCVcp با M720 و یا M720+CpG بیشترین تیتر ایزوتایپ آنتی بادی IgG_1 و IgG_{2a} در مقایسه با دیگر گروه‌ها را نشان داده‌اند، به نظر می‌رسد که یک پاسخ قوی و متعادل از نوع Th_1 و همچنین Th_2 ایجاد شده است. این نتایج با مطالعاتی که اخیرا روی واکسن‌های ساب یونیت علیه مالاریا انجام شده و در آن پاسخ‌های قوی Th_1 و Th_2 در موش‌ها مشاهده شده بود، مطابقت دارد [۲۳]. همچنین مشاهده شده بود که وقتی در فرمولاسیون ایمنی زایی، M720 حضور دارد به شدت در خرگوش‌ها و میمون‌ها ایمونوژنیک می‌باشد [۲٤]. اشخاص آلوده شده با HCV معمولا آنتی بادی‌های نوع IgG1 بر علیه HCVcp ایجاد می‌نمایند و از آنجایی که تیترهای بالای آنتی بادی ضد Core همزمان با عفونت ویروس HCV باقی می‌ماند، اهمیت این آنتی‌بادی‌های خنثی کننده فعالیت ویروس جای بحث دارد [۱۰،۷،۳]. در مقابل موش‌های ایمن شده با HCVcp، سطوح مشابهی از آنتی بادی‌های IgG1، IgG2b، IgG2a را نشان داده-اند و ارتباطی بین زیر کلاس آنتی‌بادی‌های ضد core در عفونت طبیعی، برای پیشبرد و گسترش یک پاسخ ایمنی هنوز مشخص نشده است. با این همه وجود IgG2a، IgG2b ممکن است باعث پیشرفت ایمنی سلولی بر ضد Core و همچنین فعال نمودن لنفوسیت‌های T کمکی شود که باعث افزایش احتمالی Th_1 می-شوند که از طریق سلول‌های T با منشاء CD_4^+ می‌باشد. در خصوص ترشح سایتوکاین IL-4 ، CpG یک اثر سینرژیکی با M720 و یا اثر آنتاگونیستی با F127 مشاهده شد (شکل شماره ۳). نتایج به دست آمده در خصوص میزان ترشح IL-4 و IFN-γ در گروه‌های M720 وM720+CpG نیز با نتایج ما در خصوص زیر کلاس‌های IgG مطابقت داشته و بیانگر پاسخ‌های قوی و متعادل Th_1 و Th_2 در گروه‌های موشی M720 می باشد. این نتایج به وضوح بیانگر این بود که پاسخ‌های ایمنی مشاهده شده در موش‌ها وابسته به ادجوانت و به صورت اختصاصی برای آنتی-ژن می‌باشد. یافته‌های ما با آنچه قبلا نشان داده شده بود (که پروتئین core شامل ۱۲۰ اسیدآمینه اول به همراه ادجوانت‌های فروند یا آلوم باعث پاسخ‌های هومورال قوی و افزایش ترشح IFN-γ با اثرات ترشحی اندک IL-4 در موش‌های BalB/C می-شدند) مطابقت دارد [۱٤]. اگر چه قبلا نشان داده شده است که F127 با اثر سینرژیک CpG پاسخ ایمنی علیه توکسویید کزاز (TT) را بالا می‌برد [۲٦]؛ اما، این امکان وجود دارد که فقط در

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

ارتباط با افزایش پاسخ‌های هومورال باشد؛ در مقابل نتایج ما نشان می‌دهد که فرمولاسیون F127 با HCVcp نه تنها موجب افـزایش ترشح سایتوکاین نمی‌شود؛ بلکه حتی مقداری اثر آنتاگونیستی بین ترکیب F127 و CpG وجود دارد. قابل ذکر است، یک سال پـس از آخرین ایمنی زایی در موش‌ها، فقط گروه‌هـای ایمـن شـده بـا ترکیبات F127 و CpG+F127 حداقل کـاهش تیتـر آنتـی بـادی اختصاصی IgG را داشته‌انـد. بـه دنبـال تزریـق F127 بـه بـدن، ماتریکس F127 به وسیله خاصیت ژله ای شدن حرارتی معکـوس (Reverse thermal gelation) باعث ایجاد قالـب ژلاتینـی شده (تحت دمای فیزیولوژیک بدن) و بنابراین به عنوان یک منبـع ذخیره کننده و آزاد کننده آهسته آنتی ژن به سیـستم ایمنـی عمـل می‌نماید [۲۷،۲۵]. بنابراین، در این مطالعه پاسخ آنتی بادی با طول عمر طولانی با فرمولاسیون F127، مـی‌توانـد بـه دلیـل خاصـیت حفاظتی و ماتریکس پلورونیک اسید (F127) باشد که آنتـی ژن را در وضعیت طبیعی (Native) حفظ می نماید و یا به علت افزایش طول عمر آنتی بادی مترشحه در مغز استخوان کـه در مطالعـه بـر روی اثر ایمنی‌زایی توکسوئید کزاز به همراه F127 گـزارش شـده است [۲۷،۲۶]. نتایج به دست آمده از تزریق HCVcp به تنهـایی (بدون کاربرد آدجوانت‌ها)، بیانگر این است که آنتـی ژن مـذکور ذاتا ایمنوژن ضعیفی است؛ این نتیجه تأیید کننده مشاهدات قبلـی در خصوص ضعف ایمنی‌زایی HCVcp در غیاب ادجوانت‌هـای مناسب می‌باشد [۱٤]. در این مطالعه همه ترکیبات ادجوانتی به کار رفته به خوبی توسط موش‌های ایمن شده تحمل مـی‌شـدند. طبـق گزارش‌های قبلی، عموما وقتی M720 به تنهایی تزریق مـی‌شـود به خوبی تحمل شده، اما بسته به طبیعت آنتی ژن ترکیب شـده بـا آن، بعضی اثرات نامطلوب ممکن است مشاهده شود که احتیاج به بررسی مجزا برای هر آنتی ژن دارد [٤۰]. نهایتا هـیچ آنتـی بـادی اختصاصی علیه HCVcp و یا ترشح سایتوکاین در نمونه مـوش-های کنترل که با ترکیبات ادجوانت در PBS (بـدون HCVcp) تزریق شده بودند، مشاهده نگردید (شکل‌هـای شـماره ۲ و ۳). در خصوص بررسی پاسخ‌های سایتوتوکسیک (CTL) در گـروه‌هـای M720، M720+CpG و CpG بالاترین درصد لیز اختـصاصی سلول‌های هدف ($P815(H^{2d})$ در نسبت‌های سلول‌های حامـل بـه سلول‌های هدف (Effector: Target) مـشاهده گردیـد (شـکل شماره ٤). پاسخ‌های اختصاصی سلول‌های $T\ CD_8^+$ با استفاده از پپتیدهای P_3 و P_2 که مختص پاسخ‌هـای $CTL\ CD_8^+H^{2d}$ بـود، نشان داده شده است. در مقابل در گروه‌های ایمن شده با آنتی‌ژن و یا بـا پپتیـدهای کنتـرل منفـی (P1، P4) پاسـخ قابـل تـشخیص سایتوتوکسیک (CTL) مشاهده نگردید (این نتایج همچنین نـشان دهنده آن است که سلول‌های طحال ایمن شده با HCVcp به طور اختصاصی با آنتی ژن تحریک می‌شود) و هیچ گونه پاسـخ ایمنـی ناشی از مواد آالوده کننده کشت *E.coli* باعث ایجاد پاسـخ‌هـای اختصاصی نمی‌گردند. همان گونه که در شکل شـماره ٤. د نـشان داده شده است، پاسخ‌های اختصاصی از نوع CD_8^+ می‌باشد و این پاسخ در گروه‌های CpG، M720+CpG و M720 پس از یـک سال از آخرین ایمنی زایی نیز همچنان حفظ شده بود. گزارشـات قبلی نشان داده‌اند که فرمولاسیون (۱۹۱-۱ اسید آمینـه) HCVcp با یک ISCOM غیر کلاسیک [۱۳] و یک ترکیب از پروتئین gag ویروس HIV [٤۱] سبب ایجاد پاسخ‌های قوی سلولی و هومورال همراه با پاسخ‌های Th_1 با طول عمر زیاد و از نوع $T\text{-cell}\ CD_8^+$ در میمون‌های رزوس می‌شود. در کل، القای CTL مستلزم بیـان و عرضه آنتی ژن به صورت درون سلولی است و با واسطه تحریـک MHCI می‌باشد؛ در حالی که آنتی ژن‌هـای پروتئینـی بـا منـشاء خارج سلولی به وسیله MHC II به سـلول‌هـای $Tcell\ CD_4^+$ عرضه می‌گردد [٤۲]. ایمن سازی موش‌ها با فرمـول HCVcp بـه همراه آدجوانت های M720/CpG سبب تحریک سلول‌هـای $T\text{-cell}\ CD_8^+$ اختصاصی بر علیه Core می‌گردد و همچنین باعـث تحریک سلول‌های ترشح کننده آنتی بادی اختصاصی نیز می‌گردد. از این رو مکانیسم‌های عمده در ارائه آنتی‌ژن‌های خـارج سـلولی روی هـر دو مولکـول II و MHC I بـه وسـیله مکانیـسم‌هـای Cross-priming و توالی‌های پپتیدی موثر در عرضـه آنتـی ژن درون سلولی باید استفاده شده باشد [۱۷،۱٦]. کاربرد آدجوانت‌های M720/CpG، همان گونه که برای دیگر سیستم‌های حامل نـشان داه شده، تقویت در عرضه آنتی ژن های داخـل سـلولی را فـراهم می‌نماید [۱٦]. مکانیسم‌های موثر در بقـاء CTL هـای خـاطره ای هنوز روشن نیست؛ اما تصور می‌شود استفاده همزمان از آنتی ژن و آدجوانت، یک فاکتور موثر در این زمینه باشد [۱۷،۱٦]. مکانیـسم-های مسوول ایجاد سلول‌های T خاطره و ایجاد یک پاسـخ قـوی اختصاصی CTL به دنبال ایمنی زایی، یک راهکار بـرای افـزایش پاسخ‌های $Tcell\ CD_8^+$ به منظور پیشگیری و یا درمـان عفونـت HCV اهمیت دارند [۳]. شـکری و همکـاران [۹] نقـش اساسـی سلول‌های T خاطره‌ای از نوع CD_8^+ را در محافظت طولانی مدت در عفونت مزمن HCV، پاک‌سازی ویروس و بهبودی نشان دادند و از نتایج ما چنین استنباط می‌شود که آنتی ژن HCVcp همراه با ادجوانت‌های M720+CpG سلول‌های T اختصاصی علیه Core را جهت پاسخ ایمنی هومورال و سلولی در مـوش‌هـا بـه خـوبی تحریک می‌کند و بنابراین ارزش دارد که بیشتر مورد مطالعه قـرار گیرد و جهت بررسی واکسن HCV در پریمات‌های غیـر انـسانی

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

نیز استفاده گردد؛ چرا که پاسخ‌های سلولی CD_8^+ Tcell و Th_1/Th_2 هر دو در ایجاد ایمنی محافظتی علیه HCV مهم هستند.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر ما برای اولین بار کاربرد سیستم بیانی – القایی آرابینوز در E.coli را جهت تولید HCVcp به عنوان یک روش کاربردی و آسان جهت تولید و تخلیص HCVcp به فرم طبیعی یا Native، ارائه کردیم و اطلاعات مهمی در مورد استفاده از ۳ ادجوانت سازگار با انسان و فرموله با HCVcp ارائه نمودیم. در این مطالعه شواهدی ارائه گردیده که فقط زمانی که HCVcp با M720(+CpG) مخلوط یا فرموله شده باشد، یک پاسخ ایمنی قوی و متعادل همراه با ترشح مقادیر بالای IFN-γ و IL-4 و همچنین آنتی بادی‌های با ایزوتایپ IgG2b، IgG2a، IgG1 به همراه پاسخ CTL های اختصاصی از نوع CD4-CD8+ با طول عمر طولانی‌تر ایجاد می‌نماید و نهایتا یک اپی توپ اختصاصی CTL علیه HCVcp، که شامل اسیدهای آمینه ۳۹-۲۷ از این پروتئین معرفی شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب انستیتو پاستور ایران می باشد. بدین وسیله از زحمات همکاران گرامی سرکار خانم دکتر سیما رافتی، جناب آقایان دکتر محمد علی شکرگزار و دکتر کیهان آزادمنش که با راهنمایی‌های تکنیکی ما را در انجام این پروژه یاری رساندند، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌شود.

References:

[1] Hagedon CH, Rice CM, The Hepatitis C Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 242. Berlin: Springer; 2000.
[2] Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. ***Science*** 1999; 285: 26–30.
[3] Pawlotsky JM. Hepatitis: HCV variability, the immune system and resistance to antiviral drugs. ***Nat Rev Gastroenterol Hepatol*** 2009; 6(7): 383-5.
[4] Aghasadeghi MR, Sadat SM, Amini S, Budkowska A, Roohvand F. Cloning, optimization of expression, purification and evaluation of immunological properties of Hydrophilic section of HCV core protein by AraBad-T7 promoter in E.coli. ***Blood Journal*** 2006, 2(6): 223-31. [in Persian]
[5] Aghasadeghi MR, Sadat SM, Budkowska A, Khabiri AR, Amini S, Bahramali G, et al. Evaluation of a native preparation of HCV core protein (2-122) for potential applications in immunization, diagnosis and mAb production. ***Iranian journal of public health*** 2006; 35(1): 1-10. [in Persian]
[6] Weck K. Molecular methods of hepatitis C genotyping. ***Expert Rev Mol Diagn*** 2005; 5 (4): 507–20.
[7] Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. ***Nature*** 2005; 436(7053): 946–52.
[8] Vertuani S, Bazzaro M, Gualandi G, Micheletti F, Marastoni M, Fortini C, et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. ***Eur J Immunol*** 2002; 32: 144–54.
[9] Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. ***J Exp Med*** 2003; 197(12):1645–55.
[10] Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. ***J Exp Med*** 2000; 191(9): 1499–512.
[11] Christie JM, Chapel H, Chapman RW, Rosenberg WM. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. ***Hepatology*** 1999; 30(4): 1037–44.
[12] Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL, et al. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape varian. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 1995; 92(7): 2755–9.
[13] Polakos NK, Drane D, Cox J, Ng P, Selby MJ, Chien D, et al. Characterization of hepatitis c virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. ***J Immunol*** 2001; 166(5): 3589–98.
[14] Alvarez-Obregon JC, Duenas-Carrera S, Valenzuela C, Grillo JM. A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. ***Vaccine*** 2001; 19(28-29): 3940–6.
[15] Lindblad EB. Aluminium adjuvants—in retrospect and prospect. ***Vaccine*** 2004; 22(27–28): 3658–68.
[16] Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. ***Drug Discov Today*** 2003; 8(20): 934-43.
[17] Corradin G, del Giudice G. Novel Adjuvants for Vaccines. ***Curr Med Chem—Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents*** 2005; 4: 1–7.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020

[18] Sugauchi F, Wang RY, Qiu Q, Jin B, Alter HJ, Shih JW. Vigorous hepatitis C virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses induced by protein immunization in the presence of Montanide ISA720 plus synthetic oligodeoxynucleotides containing immunostimulatory cytosine-guanine dinucleotide motifs. ***J Infect Dis*** 2006; 193(4): 563–72.
[19] Yu H, Babiuk LA, Hurk S. Priming with CpG-enriched plasmid and boosting with protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides and Quil A induces strong cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus NS3. ***J Gen Virol*** 2004; 85(Pt 6): 1533-43.
[20] Jiao X, Yan-Hui Wang R, Qiu Q, Alter HJ, Shin WK. Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by codelivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. ***J GenVirol*** 2004; 85: 1545–53.
[21] Qiao M, Murata K, Davis AR, Jeong SH, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles combined with novel adjuvant systems enhance virus-specific immune responses. ***Hepatology*** 2003; 37(1): 52–9.
[22] Jeong SH, Qiao M, Nascimbeni M, Hu Z, Rehermann B, Murthy K, et al. Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates. ***J Virol*** 2004; 78 (13): 6995–7003.
[23] Sachdeva S, Mohmmed A, Dasaradhi PV, Crabb BS, Katyal A, Malhotra P, et al. Immunogenicity and protective efficacy of Escherichia coli expressed Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1(42) using human compatible adjuvants. ***Vaccine*** 2006; 24(12): 2007–16.
[24] Pan W, Huang D, Zhang Q, Qu L, Zhang D, Zhang X, et al. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro. ***J Immunol*** 2004; 172: 6167–74.
[25] Schmolka IR, A comparison of block copolymer surfactant gels. ***J Am Oil Chem Soc*** 1997; 68(1997): 206–9.
[26] Westerink MA, Smithson SL, Srivastava N, Blonder J, Coeshott C, Rosenthal GJ. ProJuvantTM (Pluronic 127_/chitosan) enhances the immuneresponse to intranasally administered tetanus toxoid. ***Vaccine*** 2002; 20: 711–23.
[27] Coeshott CM, Smithson SL, Verderber E, Samaniego A, Blonder JM, Rosenthal GJ, et al. Pluronic F127-based systemic vaccine delivery systems, Vaccine 2004; 22(19): 2396–405.
[28] Acosta-Rivero N, Rodriguez A, Mussachio A, Poutou J, Falcon V, Torres D, et al. C terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2005; 334: 901–6.
[29]Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J, Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. ***J Bacteriol*** 1995; 177: 4121–30.
[30] Leenars PPAM, Hendriksen CFM, Leeuw WAD, Carat F, Leeuw WA, Carat F, et al. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. ***ATLA*** 1999, 27: 79–102.
[31] Samani TD, Jolles B, Laigle A, Best minimally modified antisense ligonucleotides according to cell nuclease activity. ***Antisense Nucleic Acid Drug Dev*** 2001; 11 (3): 129–36.
[32] Hu GJ, Wang RY-H, Han DS, Alter HJ, Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based immunization. ***Vaccine*** 1999, 17: 3160–70.
[33] Maillard P, Lavergne JP, Sibéril S, Faure G, Roohvand F, Petres S, et al. Fc gamma receptor-like activity of hepatitis C virus core protein. ***J Biol Chem*** 2004; 279: 2430–7.
[34] Dueñas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez JC, Ramos T, Pichardo D, Morales J. Repeated administration of hepatitis C virus core-encoding plasmid to mice does not necessarily increase the immune response generated against this antigen. ***Biotechnol Appl Biochem*** 2001, 33: 47–51.
[35] Anderson HA, Singh RAK, Barry MA. Activation of refractory T cell responses against hepatitis C virus core protein by ablation of interfering hydrophobic comains. ***Mol Ther*** 2006; 13(2): 338–46.
[36] Isaguliants MG, Petrakova NV, Kashuba EV, Suzdaltzeva YG, Belikov SV, Mokhonov VV, et al. Immunization with hepatitis C virus core gene triggers potent T-cell response, but affects CD4+ T-cells. ***Vaccine*** 2004; 22 (13–14): 1656–65.
[37] Mihailova M, Fiedler M, Boos M, Petrovskis I, Sominskaya I, Roggendorf M, et al. Preparation of hepatitis C virus structural and non-structural protein fragments and studies of their immunogenicity. ***Protein Expr Purif*** 2006; 50(1): 43–8.
[38] Weeratna RD, McCluskie MJ, Xu Y, Davis HL, CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. ***Vaccine*** 2000; 18(17): 1755–62.
[39] Ioannou XP, Gomis SM, Karvonen B, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein. ***Vaccine*** 2002; 21(1–2):127–37.
[40] Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, Corradin G, et al. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. ***Infect Immun*** 2005; 73 (12): 8017–26.

[41] Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, et al. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. ***J Exp Med*** 2006; 203(5): 1249–58.
[42] Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. ***Annu Rev Immunol*** 1998; 16: 323–58.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 0:29 +0330 on Saturday February 29th 2020