

# Evaluation of Bax Encoding Plasmid For Increasing Efficacy of DNA Vaccine Plasmid Encoding gB of Herpes Simplex Virus Type 1

M. Parsania, Ph.D.<sup>1</sup>, Z. Mohammad Hassan, Ph.D.<sup>2\*</sup>, T. Bamdad, Ph.D.<sup>1</sup>,  
M. Kheirandish, Ph.D.<sup>3</sup>, M. Nabi Sarbolouki, Ph.D.<sup>4</sup>, M. Hassan Pouriayevali, M.Sc.<sup>1</sup>,  
R. Dorostkar Sari, M.Sc.<sup>1</sup>, M. Mahdavi, M.Sc.<sup>2</sup>, A. Jamali, M.Sc.<sup>1</sup>

1. Virology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University
2. Immunology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University
3. Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center
4. Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran

✉ *Corresponding Address: P.O.Box: 14115-111, Immunology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran*  
*Email: hasan\_zm@modares.ac.ir,*

## Abstract

Received: 15/Dec/2007, Accepted: 10/Mar/2008

**Objective:** Evaluation of Bax encoding plasmid for increasing efficacy of DNA vaccine plasmid encoding gB of Herpes Simplex Virus type 1.

**Materials and Methods:** We compared three different dosages of Bax encoding plasmid (pcbax) including 10, 25 and 50 µg of plasmid DNA. They were co-injected inderadermally with glycoprotein B (gB) of herpes simplex virus (HSV)-1 encoded plasmid (pcgB) in C57BL/6 mice to elicit immune responses to protect against lethal HSV-1 challenge. Immune responses to the antigen were assessed by lymphocyte proliferative responses and cytokine (INF-γ and IL-4) release assays.

**Results:** The study demonstrates that the mice immunized with 25 µg pcbax together with pcgB have more efficient protection than the mice immunized with 10 and 50 µg of pcbax and pcgB. Analysing of cell-mediated responses show that the mice immunized with 25µg pcbax and pcgB induce stronger lymphocyte proliferative responses and higher levels of INF-γ and IL-4 compared to the mice are received 10 and 50 µg of pcbax and pcgB.

**Conclusion:** The data show that co-immunization with 25 µg of pcbax and pcgB increase immune responses compared to 10 and 50 µg of pcbax and pcgB. This can be considered a promising approach for development an efficient DNA vaccine against HSV-1 or other pathogens.

**Keywords:** Bax Protein, DNA Vaccine, gB Protein of Herpes Simplex Virus-1

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 93-100

## بررسی تاثیر همراهی پلاسمید کد کننده Bax در افزایش کارایی DNA واکسن پلاسمید gB ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک

مسعود پارسانیا Ph.D.<sup>۱</sup>، زهیر محمد حسن Ph.D.<sup>۲\*</sup>، طراوت بامداد Ph.D.<sup>۱</sup>، مریم خیراندیش Ph.D.<sup>۳</sup>، محمد نبی سریلوکی Ph.D.<sup>۴</sup>، محمد حسن پوریای ولی M.Sc.<sup>۱</sup>، روح الله درستکار ساری M.Sc.<sup>۱</sup>، مهدی مهدوی M.Sc.<sup>۱</sup>، عباس جمالی M.Sc.<sup>۱</sup>

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ویروس شناسی

۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

۳. مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴. دانشگاه تهران، انستیتو بیوشیمی و بیوفیزیک

\* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

پست الکترونیک: Email: hasan\_zm@modares.ac.ir

### چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۹/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۲

\* **هدف:** بررسی تاثیر همراهی پلاسمید کدکننده Bax در افزایش کارایی DNA واکسن پلاسمید gB ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک

\* **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ۳ دوز از پلاسمید کدکننده Bax (pcbax) شامل مقادیر ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم به همراه پلاسمید کدکننده ژن گلیکوپروتئین B (pcgB) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) به طریق داخل جلدی و به طور هم‌زمان به موش‌های C57BL/6 تزریق شد تا افزایش پاسخ‌های ایمنی و حفاظت حیوانات فوق در مواجهه با ویروس کشنده HSV-1 بررسی شود. پاسخ‌های ایمنی نسبت به آنتی‌ژن فوق با روش‌های پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی و اندازه‌گیری سایتوکاین‌های INF- $\gamma$  و IL-4 ترشح شده بررسی شدند.

\* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد موش‌هایی که ۲۵ میکروگرم pcbax را با pcgB دریافت کرده بودند حفاظت موثرتری نسبت به موش‌هایی که ۵۰ میکروگرم pcbax را با pcgB دریافت کردند، نشان دادند. آنالیز پاسخ‌های ایمنی سلولی نیز نشان داد موش‌هایی که با ۲۵ میکروگرم pcbax و pcgB ایمونیزه شدند پاسخ‌های پرولیفراسیون لنفوسیتی قوی‌تری و نیز سطوح اینترفرون گاما (INF- $\gamma$ ) و اینترلوکین ۴ (IL-4) بیشتری نسبت به موش‌هایی که ۱۰ و ۵۰ میکروگرم pcbax و pcgB دریافت کرده بودند، نشان می‌دهند.

\* **نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهد ایمن‌زایی هم‌زمان pcgB و ۲۵ میکروگرم pcbax منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی نسبت به حالتی است که از ۱۰ و ۵۰ میکروگرم pcbax و pcgB استفاده شود. نتایج فوق می‌تواند امیدی در جهت دستیابی به روشی موثر در ارتقا بخشیدن به واکسن DNA علیه HSV-1 و یا سایر پاتوژن‌ها باشد.

**کلیدواژگان:** پروتئین Bax، واکسن DNA، پروتئین gB هرپس سیمپلکس نوع یک

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۹۳-۱۰۰

### مقدمه

ایمنی‌زایی با واکسن‌های DNA، نوعی استراتژی در زمینه واکسن‌ها است که منجر به راه اندازی پاسخ‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن گذشته توسط پلاسمید، در سلول‌های بدن میزبان شده و نهایتاً با القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی هومورال و سلولار می‌تواند منجر به محافظت میزبان علیه پاتوژن مربوطه گردد (۱-۳). تاکنون راهکارهای مختلفی جهت افزایش خاصیت ایمونوژنیتی واکسن‌های DNA از جمله استفاده از ادجوانت‌های معمولی (۴، ۵) بهینه‌سازی بیان آنتی‌ژن و استفاده از سایتوکاین‌های مختلف و یا مولکول‌های محرک سیستم ایمنی به همراه واکسن، ارائه شده است (۶-۸).

مطالعات گوناگون در زمینه القای اثر آپوپتوزیس در سلول‌های ترانس فکت شده به همراه واکسن‌های DNA به افزایش عرضه آنتی‌ژن و القای پاسخ‌های اختصاصی ناشی از لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (Cytotoxic T lymphocytes: CTLs) منجر شده‌اند (۹، ۱۰).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند مرگ آپوپتوتیک سلول می‌تواند توسط مکانیسم‌های مختلفی صورت گیرد. نوع محصولات

یا فاکتورهای آزاد شده از سلول آپوپتوز شده در چگونگی حذف سلول فوق توسط سیستم ایمنی موثر است. به عنوان مثال در سطح سلول‌های در حال مرگ مارکرهای CD36، CD14، CD91 ظاهر می‌شود. مارکرهای فوق توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen Presenting Cells: APCs) شناسایی و بدین طریق سلول‌های آپوپتوز شده، فاگوسیت و حذف می‌شوند. در صورتی که سلول آپوپتوز شده، محتوی آنتی‌ژن باشد، بعد از تخریب و هضم سلول‌های آپوپتوتیک فوق توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، سلول‌های فوق به ارگان‌های لنفاوی مهاجرت و آنتی‌ژن‌های فوق را به لنفوسیت‌های CD8+ T و CD4+ T عرضه می‌کند و بدین ترتیب واکنش‌های سیستم ایمنی بر علیه آنتی‌ژن فوق راه اندازی می‌شود. مطالعات مختلفی در زمینه افزایش خاصیت ایمونوژنیتی آنتی‌ژن و در زمینه به کارگیری القای آپوپتوز با واکسن‌های DNA وجود دارد (۱۱، ۱۲).

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) در تمام نقاط دنیا شایع است. بسیاری از عفونت‌های ناشی از این ویروس

(pcDNA3-gB) طی کار قبلی، توسط همکاران طرح تهیه شده بود (۲۱). پلاسمید کدکننده Bax (pcDNA3-Bax) به صورت اهدایی از جانب دکتر لیتر (Wolfgang W. Leitner) در اختیار قرار گرفت.

#### دندروزوم

دندروزوم (Den 123) که طی کار قبلی توسط همکاران طرح تهیه شده بود (۱۷)، در غلظت  $10^{-6}$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS تهیه و بعد از فیلتراسیون با فیلتر  $0.22$  میکرون تا موقع استفاده در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### آماده‌سازی مخلوط پلاسمید و دندروزوم و ایمن‌زایی

$50$  میکروگرم از پلاسمیدها قبل از تزریق به نسبت  $1:150$  پلاسمید به دندروزوم با هم مخلوط و  $15$  دقیقه بعد از مخلوط سازی در حجم نهایی  $100$  میکرولیتر در PBS استریل به صورت داخل پوستی (Intradermal) در چهار ناحیه از پشت حیوان تزریق شد.  $10$  تا  $13$  موش در هر گروه مورد تزریق قرار گرفتند. گروه‌های مورد آزمایش به قرار زیر بودند:

گروه pgB: حیوانات این گروه  $50$  میکروگرم pcDNA3-gB به همراه Den123 دریافت کردند.

گروه pgB-Bax10: حیوانات این گروه  $50$  میکروگرم pcDNA3-gB و  $10$  میکروگرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pgB-Bax25: حیوانات این گروه  $50$  میکروگرم pcDNA3-gB و  $25$  میکروگرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pgB-Bax50: حیوانات این گروه  $50$  میکروگرم pcDNA3-gB و  $50$  میکروگرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pBax: حیوانات این گروه  $50$  میکروگرم پلاسمید pcDNA3-Bax را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه pcDNA3: حیوانات این گروه  $50$  میکروگرم پلاسمید pcDNA3 را به همراه دندروزوم دریافت کردند.

گروه Den: حیوانات این گروه مخلوط دندروزوم در PBS را به تنهایی دریافت کردند.

گروه PBS: حیوانات این گروه PBS تنها را دریافت کردند. گروه KOS: حیوانات این گروه HSV-1 سویه KOS را با تیتراژ  $10^6$  pfu (plaque forming unit) دریافت کردند.

تزریقات در سه مرحله و به فواصل دو هفته از یکدیگر به عمل آمد.

#### پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی

دو هفته بعد از آخرین تزریق به عمل آمده، به دنبال نخاعی کردن حیوانات مورد مطالعه، طحال آنها خارج شد و بعد از استخراج سلول‌های طحالی، سوسپانسیون سلولی فوق به منظور حذف گلبول‌های قرمز با بافر لیزکننده  $\text{Tris-NH}_4\text{Cl}$   $0.75$  درصد (pH:7.4) مجاور شد و پس از شست‌وشو با بافر PBS (Phosphate-Buffered Saline) تعداد  $2 \times 10^5$  سلول در میلی‌لیتر (PBS) به چاهک‌های پلیت  $96$  خانه‌ای در محیط RPMI (SIGMA) حاوی  $10$  درصد سرم جنین گاو منتقل شد.

سپس به سلول‌های سه چاهک  $100$  میکرولیتر محیط حاوی  $3$  Multiplicity of Infection (MOI) و ویروس HSV-1 سویه

بدون علامت‌اند و قابل تشخیص نیستند. این ویروس می‌تواند اشکال بالینی مختلفی در انسان ایجاد کند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به تب‌خال، عفونت‌های مخاطی، هریس نوزادان و آنسفالیت اشاره کرد.

به رغم تلاش‌های زیادی که در زمینه ساخت واکنش به جهت پیش‌گیری از عفونت با ویروس فوق صورت گرفته است، اما متأسفانه هنوز واکنش موثری وجود ندارد (۱۳، ۱۴). در بین پروتئین‌های ویروس، ۲ گلیکوپروتئین D و B (gB, gD) ویروس از مهم‌ترین پروتئین‌هایی هستند که در زمینه تحقیقات واکنش علیه ویروس فوق مورد توجه قرار دارند. گزارش‌های متعددی حاکی از القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی هومورال و سلولار به دنبال ایمنی‌زایی با پلاسمیدهای بیان‌کننده پروتئین‌های فوق، وجود دارد (۱۴، ۱۵).

دندروزوم‌ها (Dendrosome) ترکیبات نانوپارتیکل جدیدی هستند که به عنوان تراپرتابرها مطرح‌اند و در مطالعات از آنها برای انتقال پلاسمید به سلول‌های هدف استفاده شده است و نتایج به دست آمده از تحقیقات فوق نشان دهنده افزایش در بازدهی عمل ترانس‌فکشن و انتقال پلاسمید به سلول‌های هدف است (۱۶، ۱۷).

طی تحقیقاتی، در زمینه واکنش‌های DNA از پلاسمید کدکننده Bax به عنوان یک فاکتور پروآپتوتیک استفاده شده است و نشان داده شده که افزایش خاصیت ایمونوژنسیته ویروس‌ها و واکنش‌های فوق بستگی به مقدار پلاسمید کدکننده Bax دارد و پلاسمید فوق در دوز مشخص می‌تواند اثر ادجوانتی خود را اعمال کند (۱۱، ۱۸، ۱۹).

در تحقیق حاضر ۳ دوز از پلاسمید کدکننده Bax ( $10, 25, 50$  میکروگرم) به همراه پلاسمید کدکننده gB ویروس هریس سیمپلکس تیپ یک، در همراهی با دندروزوم به جهت افزایش پاسخ‌های ایمنی در موش‌های C57BL/6 مورد بررسی قرار گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

##### سلول و ویروس‌ها

از سلول Vero جهت تکثیر ویروس‌ها استفاده شد. سلول‌های فوق در محیط (Dulbecco's Minimal Eagle Medium: DMEM) (GIBCO) حاوی  $10$  درصد سرم جنین گاو (GIBCO) کشت داده شدند.

از ویروس وحشی HSV-1، جدا شده از زخم تبخال یک بیمار، به منظور مواجهه (Challenge) حیوانات ایمونیزه شده استفاده شد. این ویروس توسط آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی HSV-1 تایید شده بود (۲۰). از HSV-1 سویه KOS که یک سویه غیربیماری‌زای ویروس است جهت ایمونیزه کردن موش‌های گروه کنترل مثبت استفاده شد. ویروس‌های فوق بعد از تکثیر در سلول‌های Vero تعیین تیتراژ و تا زمان استفاده در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

##### موش‌ها

موش‌های C57BL/6 نر با سن ۶ تا ۷ هفته از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و کارهای انجام شده بر روی حیوانات فوق مطابق با قوانین توصیه شده کار با حیوانات آزمایشگاهی بود.

##### پلاسمیدها

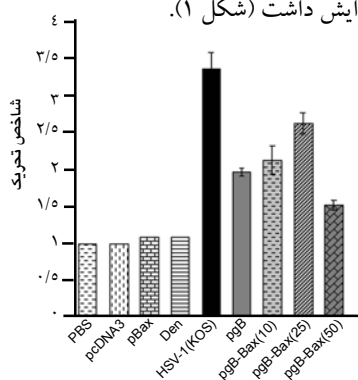
پلاسمید کدکننده gB ویروس هریس سیمپلکس تیپ یک

سایتوکاین‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA Oneway) و با استفاده از تست Tukey انجام شد و ارزیابی مقاومت حیوانات در مواجهه با ویروس با آزمون Meier-Kaplan و با استفاده از تست log rank انجام گرفت. در تمام موارد، معنی‌دار بودن تست‌ها با ارزش  $(p < 0/05)$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی

به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی، پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی دو هفته بعد از آخرین مرحله ایمن‌زایی و به دنبال تحریک آنتی ژنیک در تمام حیوانات مورد مطالعه به انجام رسید. نتایج SI مربوط به تمام گروه‌هایی که پلاسمید pcDNA3-gB بودند (pgB, pgB-Bax50, pgB-Bax25, pgB-Bax10) در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی (Den, pcDNA3, pBax) به طور معنی‌داری افزایش داشت (شکل ۱).



شکل ۱: میانگین شاخص تحریک (SI) در آزمایش پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش MTT مربوط به گروه‌های مختلف مورد مطالعه

اگر چه پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی گروه pgB-Bax25 و pgB-Bax10 نسبت به گروه pgB افزایش نشان می‌دهد اما این اختلاف معنی‌دار نیست. برعکس پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی گروه pcDNA3-Bax50 به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های pgB-Bax25, pgB-Bax10 و pgB کمتر است.

بالاترین سطح پرولیفراسیون لنفوسیتی مربوط به سلول‌های طحالی موش‌های ایمونیزه شده با HSV-1 سویه KOS بود ( $p < 0/001$ ).

KOS که با حرارت غیرفعال شده بود، اضافه شد. به سلول‌های سه چاهک که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بودند، مقدار ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر Phytohemagglutinin-A (PHA) (SIGMA) اضافه شد. آزمایش پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش 3-(4, 5-dimethylthiazal-2-yl)-2, 5d: phenyl-tetrazolium bromide (MTT)

طبق روش توضیح داده شده توسط زیانو و همکارانش (۲۲) انجام شد. شاخص تحریک (Stimulation Index: SI)، از تقسیم کردن OD قرائت شده از چاهک‌های حاوی سلول‌های تحریک شده با ویروس، بر OD قرائت شده از چاهک‌های حاوی سلول‌های بدون تحریک آنتی‌ژنیک به دست می‌آید.

### ارزیابی سایتوکاین‌ها

بعد از استخراج سلول‌های طحالی از طحال حیوانات مورد مطالعه، به ترتیبی که در تست پرولیفراسیون لنفوسیتی توضیح داده شد، تعداد ۵ میلیون سلول طحالی، در حجم نهایی یک میلی‌لیتر محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، تحریک شده با HSV-1 moi3 سویه KOS غیرفعال شده، به طور جداگانه در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت، مایع رویی کشت‌های سلولی جمع‌آوری و با استفاده از کیت الایزا آماده (R&D. Minneapolis, MN, USA) سایتوکاین‌های  $(\text{Interferon-}\gamma: \text{INF-}\gamma)$  و  $(\text{Interleukin-4: IL-4})$  اندازه‌گیری شدند. با تعیین نسبت میانگین مقادیر  $\text{INF-}\gamma$  به IL-4 به طور جداگانه برای هر گروه، وضعیت جهت پاسخ ایمنی سلولی به سمت Th1 یا Th2 مورد بررسی قرار گرفت.

### ارزیابی مقاومت حیوانات در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1

دو هفته بعد از آخرین مرحله ایمن‌زایی، به منظور ارزیابی مقاومت حیوانات ایمن شده، در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1، مقدار  $1 \times 10^6$  سویه وحشی HSV-1 (حداقل دوزی از ویروس که ۱۰۰ درصد در حیوانات غیرایمن خاصیت کشندگی دارد) به طریق داخل صفاقی به حیوانات گروه‌های مختلف تزریق شد و تا دو هفته بعد از تزریق، میزان مرگ و میر و بقای حیوانات فوق مورد بررسی قرار گرفت.

### آنالیز آماری

آنالیز آماری ارزیابی پرولیفراسیون لنفوسیتی و سنجش

جدول ۱: میانگین مقادیر  $\text{INF-}\gamma$  و IL-4 آزاد شده در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی موش‌های مورد مطالعه در تمام گروه‌ها، به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک و میانگین نسبت  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-4}$

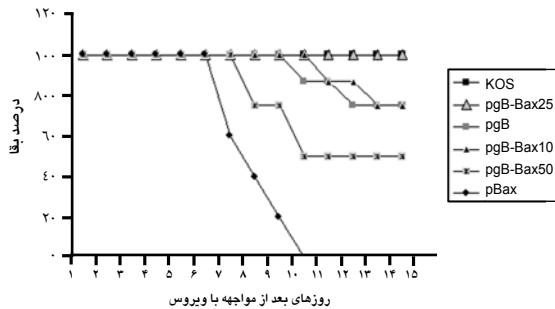
نام گروه	تعداد	میانگین $\text{INF-}\gamma \pm \text{SD}$	میانگین $\text{IL-4} \pm \text{SD}$	میانگین $\text{INF-}\gamma/\text{IL-4}$
PBS	۵	$9/66 \pm 2/2$	$13/58 \pm 0/99$	۰/۷۱
pcDNA3	۵	$9/63 \pm 1/96$	$12/8 \pm 2/38$	۰/۷۵
pBax	۵	$11/07 \pm 2$	$15/38 \pm 2/1$	۰/۷۱
Den	۵	$9/68 \pm 1/78$	$12/1 \pm 3/36$	۰/۸
HSV-1(KOS)	۵	$917/67 \pm 51/77$	$118/38 \pm 10/96$	۷/۷۵
pgB	۵	$10/64 \pm 9/86$	$45/84 \pm 6/07$	۲/۳۲
pgB-Bax10	۵	$118/8 \pm 7/85$	$55/6 \pm 5/68$	۲/۱۳
pgB-Bax25	۵	$130 \pm 7/9$	$114/4 \pm 8/01$	۱/۱۳
pgB-Bax50	۵	$70/4 \pm 7/3$	$48/3 \pm 5/47$	۱/۴۵

هیچ اختلاف معنی‌دار در سطح IL-4 بین حیوانات گروه‌های pgB-Bax50، pgB-Bax10، pgB و وجود نداشت. مقدار IL-4 اندازه‌گیری شده مربوط به گروهی که HSV-1 سویه KOS را دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax50، pgB افزایش نشان می‌دهد (به ترتیب  $p=0/001$ ،  $p<0/001$ ).

همان‌طور که در نتایج جدول ۱ مشخص شده است بالاترین نسبت بین میانگین مقادیر INF- $\gamma$  به IL-4 مربوط به گروهی است که HSV-1 سویه KOS را دریافت کرده بودند و پایین‌ترین مقادیر نسبت فوق، مربوط به گروه‌های کنترل منفی است. در بین گروه‌هایی که پلاسمید gB دریافت کرده بودند، بالاترین نسبت فوق مربوط به گروه pgB بود. از بین ۳ گروهی که پلاسمید کدکننده Bax را به همراه پلاسمید کدکننده gB دریافت کرده بودند، پاسخ ایمنی سلولی در گروه pgB-Bax25 به طور معنی‌داری نسبت به گروه pgB از Th1 به سمت Th2 تمایل نشان می‌دهد.

### مقاومت حیوانات در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1

مقاومت تمام موش‌های مربوط به گروه‌های مختلف در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1، دو هفته بعد از آخرین ایمنی‌زایی و با تزریق  $1 \times 10^6$  pfu ویروس وحشی HSV-1 به طریق داخل صفاقی طی ۱۴ روز، مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بقای موش‌های حیوانات گروه‌های مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: نتایج بقای حیوانات ایمن شده بعد از مواجهه با ویروس وحشی هرپس سیمپلکس تیپ یک

موش‌های گروه‌های KOS و pgB-Bax25 در مواجهه با ویروس فوق ۱۰۰ درصد زنده ماندند و درصد بقای حیوانات گروه‌های pgB و pgB-Bax10 مقدار ۸۰ درصد بود. تمام موش‌های گروه‌های کنترل منفی مثل pcDNA3، PBS (که نتایج آنها نشان داده نشده است) همانند گروه pBax در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 کشته شدند.

مقاومت موش‌های گروه‌های pgB-Bax10 و pgB-Bax50 نسبت به موش‌های گروه pgB-Bax25 در مواجهه با ویروس فوق به طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد ( $p=0/025$ ).

### بحث

Bax یک فاکتور پروآپوپتوتیک و متعلق به خانواده Bcl-2 است. ترانس فکشن سلول‌ها با پلاسمید کدکننده Bax منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده، از طریق مسیر میتوکندریایی در سلول‌های فوق می‌شود (۱۸، ۱۹). به طور کلی یکی از معایب واکنش‌های DNA امکان

### ارزیابی سایتوکاین‌ها

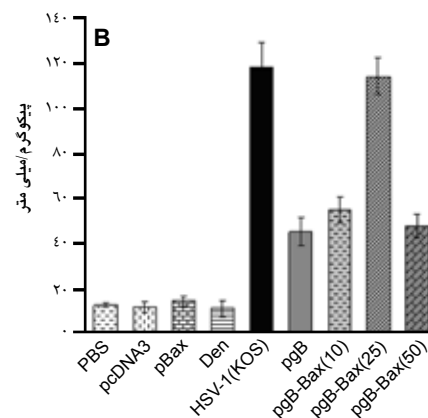
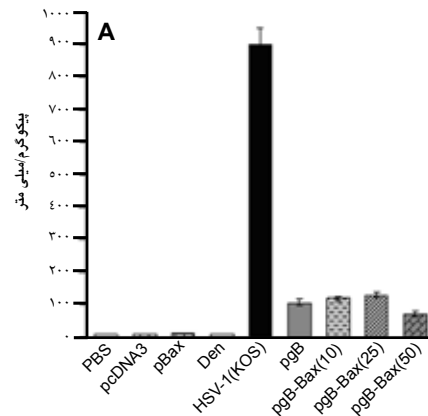
به منظور مشخص کردن جهت پاسخ ایمنی سلولی به سمت Th1 یا Th2 اندازه‌گیری INF- $\gamma$  و IL-4 در مایع رویی حاصل از کشت سلول‌های طحالی حیوانات، بعد از تحریک آنتی‌ژنیک، به صورت *In vitro*، به عمل آمد.

سنجش سایتوکاین‌ها دو هفته بعد از آخرین مرحله ایمنی‌زایی و به دنبال تحریک *In vitro* سلول‌های طحالی حیوانات مورد مطالعه، با ویروس غیرفعال شده HSV-1 سویه KOS به عمل آمد.

همان‌طور که در شکل ۲ و نتایج مندرج در جدول ۱ مشخص شده است تمام گروه‌های موشی که با پلاسمید حاوی gB مورد تزریق قرار گرفته بودند (pgB-Bax10، pgB-Bax25، pgB-Bax50) به طور معنی‌داری منجر به افزایش تولید INF- $\gamma$  نسبت به گروه‌های کنترل منفی (Den، pcDNA3، Bax) شدند. مقدار INF- $\gamma$  در موش‌های گروه pgB-Bax50 به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax25، pgB بود و مقدار INF- $\gamma$  مربوط به گروه pgB-Bax10 در مقایسه با گروه‌های pgB و pgB-Bax25 معنی‌دار نیست.

هیچ اختلاف معنی‌داری در سطح INF- $\gamma$  بین حیوانات مربوط به گروه‌های pgB-Bax10، pgB-Bax25، pgB وجود نداشت. بالاترین سطح INF- $\gamma$  مربوط به گروهی بود که HSV-1 سویه KOS را دریافت کرده بودند.

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است بالاترین سطح IL-4 مربوط به کشت سلول‌های طحالی حیوانات گروه pgB-Bax25 و مقدار آن در مقایسه با نتایج تمام گروه‌ها به طور معنی‌داری بالاتر است ( $p<0/001$ ).



شکل ۲: (A) میانگین مقادیر INF- $\gamma$ ، (B) میانگین مقادیر IL-4 آزاد شده در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی موش‌های مورد مطالعه در تمام گروه‌ها، به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک

کننده آنتی ژن و ارائه آنتی ژن به لنفوسیت های  $CD_4^+$  و  $CD_8^+$  T منجر به راه اندازی پاسخ های سیستم ایمنی هومورال و سلولار قوی نسبت به آنتی ژن می گردد (۱۱، ۱۲).

به کارگیری پلاسمید کدکننده Bax در جهت افزایش پاسخ های سیستم ایمنی در واکنش های DNA تنها وقتی امکان پذیر است که دوز مناسبی از پلاسمید فوق استفاده شود (۱۱). در این مطالعه ما سه دوز ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم از پلاسمید کدکننده Bax را به طور هم زمان با ۵۰ میکروگرم پلاسمید کدکننده gB برای القای پاسخ های ایمنی حفاظت کننده به موش های مورد مطالعه، تزریق کردیم.

نتایج، نشان دهنده کاهش پاسخ ایمنی سلولی و حفاظت در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 در گروه های pgB-Bax10 و pgB-Bax50 نسبت به گروه pgB-Bax25 است. بر اساس مطالبی که اشاره شد این موضوع می تواند به علت آپوپتوز به میزان کمتر در گروه pgB-Bax10 و آپوپتوز به میزان بیشتر در گروه pgB-Bax50 باشد. در حالی که ۲۵ میکروگرم پلاسمید کدکننده Bax به همراه واکنش DNA فوق استفاده شد، بیان آنتی ژن به میزان مناسب، قبل از تشکیل اجسام آپوپتوتیک صورت گرفته و نهایتاً منجر به افزایش خاصیت ایمنونورسیتی و واکنش DNA شد.

در گزارش های اخیر ساساکی و همکارانش نیز ثابت کرده اند که سلول های آپوپتوتیک محتوی آنتی ژن همگلو تینین و نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوآنزا که با استفاده از ژن های موتانت کاسپاز دچار آپوپتوزیس شده بودند، پاسخ ایمنی قوی تری را نسبت به حالتی که از ژن های جهش نیافته استفاده شده، القاء می کنند (۲۳). آنها همچنین مشخص کردند که فعالیت ادجوانتی آپوپتوزیس باید به میزان محدود و مشخصی صورت گیرد. به طوری که کاسپازهایی که به طور نسبی غیرفعال بودند (کد شده توسط کاسپازهای موتانت) به پلاسمید کدکننده آنتی ژن فرصت مناسبی داده تا قبل از اینکه سلول وارد آپوپتوزیس شود، بیان مناسب آنتی ژن در آن صورت پذیرد (۲۸).

### نتیجه گیری

در این مطالعه نیز همانند دیگر مطالعات مشخص شد وقتی از پلاسمید کدکننده Bax در همراهی با واکنش DNA استفاده می شود می بایست دوز مناسب پلاسمید فوق بهینه شود و از آنجایی که از سه دوز پلاسمید فوق استفاده شد لذا توصیه می شود که دوزهای دیگری از پلاسمید کدکننده ژن Bax در همراهی با پلاسمید کدکننده gB و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مورد ارزیابی قرار گیرد تا دوز مناسب برای افزایش بهینه پاسخ های ایمنی سلولار و هومورال اختصاصی علیه آنتی ژن فوق به دست آید.

### تقدیر و تشکر

هزینه مطالعه حاضر از محل بودجه های تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است. مولفان این تحقیق از جناب دکتر لیتر (Leitner.W Wolfgang) به جهت اهدای پلاسمید کدکننده Bax نهایت تشکر را دارند.

تومورزایی آن به دنبال ملحق شدن پلاسمید کدکننده آنتی ژن در کنار ژن های مربوط به پروتئین کوژن ها، در ژنوم سلول میزبان است (۲۵-۲۳). احتمال این مورد در حالتی که واکنش DNA به همراه پلاسمید کدکننده Bax استفاده شود، کمتر است، زیرا سلول های ترانس فکت شده با واکنش DNA چند روز بعد از بیان پروتئین Bax، از بین می روند (۲۲، ۲۵).

استفاده از پلاسمید کدکننده Bax به همراه واکنش های DNA می تواند منجر به افزایش خاصیت ایمنونورسیتی واکنش های فوق گردد. طی تحقیقات مختلف تاثیر مرگ آپوپتوتیک سلول های ترانس فکت شده با واکنش های DNA کار شده و افزایش در القای پاسخ های ایمنی ایجاد شده ناشی از اثر آن نیز نشان داده شده است (۱۱، ۱۲).

کینسی و همکارانش در تحقیقی به طور هم زمان، پلاسمید کدکننده پروتئین gp120 ویروس عامل ایدز (Human Immunodeficiency Virus: HIV) و پلاسمید کدکننده Bax را به طور توأم و به طریق داخل پوستی به موش های C57BL/6 تزریق کردند و افزایش پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال را نشان دادند. در تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که تزریق هم زمان پلاسمید کدکننده Bax و پلاسمید کدکننده gB و ویروس سیمپلکس تیپ یک به روش تزریق داخل پوستی می تواند منجر به القای ایمنی حفاظت کننده موثر در موش C57BL/6 گردد. نتایج ما نشان می دهد سطح IL-4 تولید شده توسط سلول های طحالی حیوانات گروه pgB-Bax25 به دنبال تحریک آنتی ژنیک بالاتر از گروه pgB است. اساریو و همکارانش نیز در مطالعه دیگری نشان دادند که IL-4 نقش مهمی در افزایش ایمنی حفاظت کننده علیه HSV-1 و مقاومت در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 دارد (۲۶).

در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که سلول های طحالی موش های گروه pgB-Bax25 به دنبال تحریک آنتی ژنیک افزایش معنی داری در تولید IL-4 نسبت به گروه pgB که DNA واکنش تنها را دریافت کرده بود، داشتند و از طرفی حیوانات فوق (pgB-Bax25) در مواجهه با ویروس وحشی HSV-1 مقاومت بیشتری نسبت به حیوانات گروه pgB نشان دادند. همانطوری که در بخش نتایج نیز اشاره شد، پاسخ ایمنی سلولی در گروه pgB-Bax25 نیز در مقایسه با گروه pgB به سمت Th2 تمایل دارد، یافته های فوق با یافته های نیمال و همکارانش که از لیگاند Fas برای القای آپوپتوزیس در سلول های ترانس فکت شده با واکنش DNA استفاده کرده بودند، مطابقت دارد (۲۷).

علی رغم شواهد متعددی که طی پژوهش های مختلف به عمل آمده و نشان دهنده ارتباط معنی دار بین القای آپوپتوزیس و افزایش خاصیت ایمنونورسیتی واکنش DNA است (۲۳، ۲۷) بعضی از گزارش ها حاکی از آن است که فعالیت ادجوانتی آپوپتوزیس می بایست بعد از اینکه آنتی ژن واکنش DNA در داخل سلول به میزان مناسب بیان شده، اعمال گردد. بدین ترتیب آنتی ژن بیان شده در حد مناسب در سلول ترانس فکت شده تجمع می یابد و سپس سلول فوق دچار آپوپتوزیس می شود و با فاگوسیت شدن سلول آپوپتوتیک فوق توسط سلول های عرضه

### References

- Lemieux P. Technological advances to increase immunogenicity of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2002; 1: 85-93
- Donnelly, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA

- vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 617-648
- Giese M. DNA-antiviral vaccine: new development and approaches a review. *Virus Genes* 1998; 17: 211-232

4. Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Freidman A, Donnelly JJ, McClements WL, et al. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum phosphate adjuvants. *Vaccine* 1999; 18: 18-28
5. Wang S, Liu X, Fisher K, Smith JG, Chen F, Tobery TW, et al. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminum phosphate. *Vaccine* 2000; 18: 1227-1235
6. Kim JJ, Trivedi NN, Nottingham LK, Morrison L, Tsai A, Hu Y, et al. Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1089-1103
7. Bower JF, Sanders KL, Ross TM. C3d enhances immune responses using low doses of DNA expressing the HIV-1 envelope from codon-optimized gene sequences. *Curr HIV Res* 2005; 3: 191-198
8. Nimal S, McCormick AL, Thomas MS, Heath AW. An interferon gamma gp120 fusion delivered as a DNA vaccine induces enhanced priming. *Vaccine* 2005; 23: 3984-3990
9. Rover P, Vallinoto C, Bondanza A, Corsti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 1998; 161: 4467-4471
10. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-89
11. Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Danger, death and DNA vaccines. *Microbes Infect* 2004; 6: 319-327
12. Leitner WW, Restifo NP. DNA vaccines and apoptosis: to kill or not to kill? *J Clin Invest* 2003; 112: 22-24
13. Bernstein DI, Stanberry LR. Herpes simplex virus vaccines. *Vaccine* 1999; 17: 1681-1689
14. Koelle DM, Corey L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *J Clin Microbiol* 2003; 16: 96-113
15. Flo J, Beatriz Perez A, Tisminetzky S, Baralle F. Superiority of intramuscular route and full length glycoprotein D for DNA vaccination against herpes simplex 2. Enhancement of protection by the co-delivery of the GM-CSF gene. *Vaccine* 2000; 18: 3242-3253
16. 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: 602-614
17. Sarbolouki MN, Sadeghizadeh M, Yaghoobi MM, Karami A, Lohrasbi T. Dendrosomes: A novel family of vehicles for transfection and therapy. *J Chem Tech Biotech* 2000; 75: 919-922
18. Kinsey BM, Marcelli M, Song L, Bhogal BS, Ittmann M, Orson FM. Enhancement of both cellular and humoral responses to genetic immunization by co-administration of an antigen-expressing plasmid and a plasmid encoding the pro-apoptotic protein Bax. *J Gene Med* 2004; 6: 445-454
19. Li X, Marani M, Mannucci R, Kinsey B, Andriani F, Nicoletti I, et al. Overexpression of BCL-X(L) underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1699-1706
20. Soleimanjahi H, Roostae MH, Rasaee MJ, Mahboudi F, Bamdad T. Immunogenicity and efficacy of baculovirus-derived glycoprotein D of herpes simplex virus type-1 in mice. *Arch Razi Ins* 2003; 55: 19-28
21. Bamdad T, Roostae MH, Sadeghizadeh M, Mahboudi F, Kazemnejad A, Soleimanjahi H. Immunogenicity and protective effect of a DNA construct encoding certain neutralizing epitopes of herpes simplex virus type-1 glycoprotein B. *Folia Biol (Praha)* 2005; 51: 109-113
22. Xiao S, Chen H, Fang L, Liu C, Zhang H, Jiang Y, et al. Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. *Vaccine* 2004; 22: 345-351
23. Sasaki S, Amara RR, Oran AE, Smith JM, Robinson HL. Apoptosis-mediated enhancement of DNA-raised immune responses by mutant caspases. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 543-547
24. Robinson HL, Pertmer TM. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. *Adv Virus Res* 2000; 55: 1-74
25. Li X, Marani M, Yu J, Nan B, Roth JA, Kagawa S, et al. Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 186-191
26. Osorio Y, Ghiasi H. Comparison of adjuvant efficacy of herpes simplex virus type 1 recombinant viruses expressing TH1 and TH2 cytokine genes. *J Virol* 2003; 77: 5774-5783
27. Nimal S, Thomas MS, Heath AW. Fusion of

antigen to Fas-ligand in a DNA vaccine enhances immunogenicity. *Vaccine* 2007; 25: 2306-2315  
28. Sasaki S, Amara RR, Yeow WS, Pitha PM,

Robinson HL. Regulation of DNA-raised immune responses by cotransfected interferon regulatory factors. *J Virol* 2002;76: 6652-6659

---