اثرات محافظتی DNA واکسن کد کننده ژن گلیکوپروتئین D-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بر میزان نهفتگی ویروس در گانگلیون تریژمینال

Protective Effects of DNA Vaccine Encoding Glycoprotein D-1 of Herpes Simplex Virus Type 1 on Latency Rate in Trigeminal Ganglia

امیر قائمی[۱]، حوریه سلیمانجاهی[۲]

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۲. گروه ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

Amir Ghaemi[1], Hoorieh Soleimanjahi[2]

1. Department of Biotechnology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
2. Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

اطلاعات مقاله
دریافت: ۲۷ آبان ۱۳۹۱
پذیرش: ۳۰ آذر ۱۳۹۱

کلید واژه:
هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۱،
DNA واکسن،
گانگلیون تری ژمینال.

چکیده

مقدمه انسفالیت هرپس سیمپلکس یک بیماری نادر اما بسیار جدی می باشد که توسط ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ (HSV-1) ایجاد می گردد. بدنبال عفونت اولیه با ویروس HSV-1، نهفتگی ویروس درگانگلیون تریژمینال ایجاد می گردد. بنابراین پیشگیری از عفونت اولیه ویروس و همینطور تثبیت نهفتگی از اساسی ترین ویژگی‌های توسعه واکسن برای عفونت فوق محسوب می‌گردد. مواد و روش ها در این مطالعه بر آن شدیم تا کارایی DNA واکسن بیان کننده ژن گلیکوپروتئین D-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در برابر چالش کشنده چشمی با TCID 5 × 10 5 (HSV-1) ویروس وحشی را درجهت مقابله با نهفتگی ویروس و نسبت مرگ و میر در مقایسه با گروههای کنترل مورد بررسی قرار دهیم. یافته‌ها نتایج مطالعه نشان دهنده اثرات محافظتی واکسن DNA کد کننده ژن D-1 ویروس بر روی میزان نهفتگی و نسبت مرگ و میر موشهای واکسینه می باشد. نتیجه‌گیری در مجموع این مطالعه نشان داد که ایمن سازی با واکسن DNA بیان کننده گلیکوپروتئین D ویروس یک روش نوید بخش به منظور القای ایمنی محافظتی و در برابر چالش چشمی با ویروس کشنده می باشد.

Article info:
Received: 17 Nov. 2012
Accepted: 20 Dec. 2012

Key words:
Herpes Simplex Virus Type-1,
DNA Vaccine,
Trigeminal Ganglion.

ABSTRACT

Introduction Herpes simplex encephalitis (HSE) is a rare but very serious disorder caused by herpes simplex type 1 virus (HSV-1). Following primary HSV-1 infection, viral latency develops in the trigeminal ganglia (TG). Therefore, prevention from primary HSV -1 infection and subsequent latency establishment is an important feature for vaccine development. Materials & Methods We evaluate efficacy of DNA vaccine encoding Glycoprotein D-1 (gD-1) gene of HSV-1 against lethal ocularly challenge of TCID 5 × 10 ^{5} plaque-forming units (pfu) per eye of wild HSV-1 versus negative control groups. Results The data demonstrated protective effects of DNA vaccine encoding Herpes simplex virus Glycoprotein D gene on latency rate in TG and mortality rate. Conclusion These results indicated that immunization with g D-1 DNA vaccine is a promising approach for eliciting a protective immunity against a HSV-1 lethal ocular challenge.

• نویسنده مسئول:
امیر قائمی
آدرس الکترونیکی: ghaem_amir@yahoo.com

* Corresponding Author:
Amir Ghaemi
E-mail: ghaem_amir@yahoo.com

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۱ عامل طیف وسیعی از بیماریها شامل عفونت ژنیتال، عفونت‌های ناحیه صورت و دهان و عفونتهای سیستم اعصاب مرکزی بحساب می آید. این ویروس نه تنها توانایی تولید عفونت اولیه را دارا می‌باشد بلکه قادر است در گانگلیون‌های عصبی نهفته شده و تحت شرایط خاصی دوباره فعال شود و ایجاد عفونت کند. مطالعات انجام شده نشان داده که یکبار آلودگی هم گاهی سبب عفونت نهفته و راجعه ویروس می‌شود. شدت و طول دوره بیشتر عفونت‌های علامت دار اولیه می‌تواند بوسیله شروع سریع درمان‌های ضد ویروسی کاهش یابد. مطالعات کلینیکی منتشر شده این مسئله را نشان داده‌اند که درمان‌های ضدویروسی بر روی نهفتگی و عفونت‌های راجعه بعدی بی‌تاثیر می‌باشند (۱).

هر چند گزارش‌هایی در مورد نهفتگی ویروس هرپس در اعضای مختلف وجود دارد ولی متداول ترین محل برای نهفتگی، گانگلیونهای عصبی می باشند. عفونت قسمتهای مختلف سر و صورت منجر به نهفتگی در گانگلیون تری ژمینال می شود. ژنوم ویروس از سایر گانگلیونها نظیر گانگلیون دورسال و گانگلیون عقده ای عصب دهم جمجمه ای هم در انسان و هم در حیوان جدا شده است، اما میزان آن در مقایسه با گانگلیون تری ژمینال کمتر می باشد (۲). اهداف طراحی واکسن هرپس در مقایسه با واکسن سایر عوامل بیماریزا متفاوت می‌باشد زیرا نگرانی ها فقط محدود به پیشگیری از عفونت اولیه نمی‌باشد، بلکه پیش گیری از عفونت نهفته و کنترل عفونتهای راجعه نیز حائز اهمیت می‌باشد (۳، ۴). DNA واکسن بعنوان یکی از روشهای موثر برای القای ایمنی در مطالعات مختلف معرفی شده است. در بین ژنهای کاندید ویروس هرپس، ژن گلیکوپروتئین D ویروس دارای بالاترین درجه القای ایمنی در مقایسه با سایر ژنها معرفی شده است (۵، ۶). در این مقاله، ما اقدام به مطالعه میزان نهفتگی بدنبال تزریق واکسن ژنتیکی و سپس چالش با ویروس وحشی در مدل موشی BALB/c کردیم.

مواد و روش ها

در فاز نخست، پلاسمید pCDNA3.1(Invitrogen) بیان‌کننده حاوی ژن گلیکوپروتئین gD-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ۱ تحت پروموتور سیتومگالو ویروس تهیه گردید و با روش‌های هضم انزیمی، صحت ژن موردنظر موردتایید قرار گرفت. برای تهیه واکسن، پلاسمید حاوی ژن گلیکوپروتئین gD ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در ابتدا در میزبان باکتریایی E.coli DH5α مستعد شده (Competent) منتقل شدند. سپس هر یک از این پلاسمیدها در مقیاس زیاد توسط کیت‌های استخراج پلاسمید تهیه و تخلیص گردید. در فاز حیوانی مطالعه، موش‌های BALB/c حساس ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. یک گروه از موش‌های خریداری شده با پلاسمید حاوی ژن گلیکوپروتئین gD ویروس تلقیح شدند که به هر موش ۹۰ میکروگرم از این پلاسمید بصورت داخل عضلانی تزریق شد. به گروه دوم از موش‌ها $۱۰^{۵} \times ۵$ TCID (50% Tissue Culture Infective Dose) از HSV-1 سویه استاندارد KOS بعنوان کنترل مثبت بصورت داخل صفاقی تزریق شد.

دو گروه نیز بعنوان کنترل منفی در این مطالعه در نظر گرفته شدند. یک گروه ۱۰۰ میکرولیتر PBS و گروه دوم ۹۰ میکروگرم pCDNA3 فاقد ژن دریافت کردند. تزریق‌های دوم به فاصله ۲۱ روز انجام شد. همه گروه‌های تزریق شده بیست و یک روز بعد از تزریق دوم، در هر دو چشم با $2\ MLD_{50}$ (50% Mouse lethal Dose) از ویروس وحشی چالش شدند. ویروس مذکور از نمونه های بالینی، جداسازی شده و بر روی لاین سلولی Vero در مقیاس بالا تکثیر و خالص سازی شدند. (تصویر شماره ۱). ۲۸ روز پس از چالش با ویروس وحشی، گانگلیون تری ژمینال موشها جدا و استخراج DNA ویروسی از آنها صورت گرفت. میزان نهفتگی توسط روش PCR و با پرایمرهای اختصاصی برای ژن تایمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک با طول ۳۹۸ جفت باز و بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند (تصویر ۲).

توالی پرایمرهای ژن مذکور به این ترتیب می باشد:

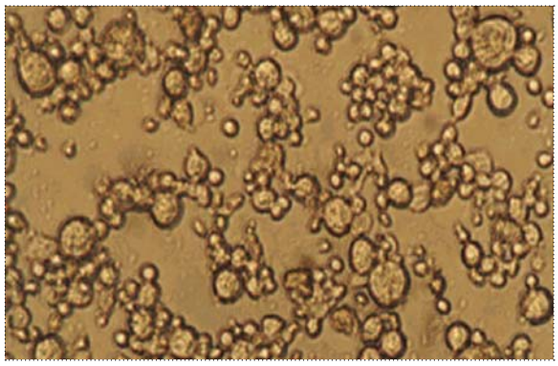
TKF: 5` CTTAACAGCG TCAACAGCGT 3`

TKR: 5` TTGTGTGGTGTAGATGTTCGC 3`

موشهای مورد چالش قرار گرفته توسط ویروس وحشی تا ۲۸ روز از نظر میزان مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند.

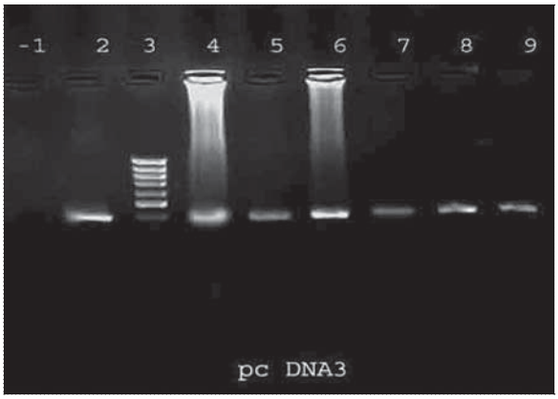
یافته ها

نتایج بررسی مرگ و میر نشان‌دهنده قابلیت واکسن حاوی ژن گلیکوپروتئین D ویروس و همینطور سویه استاندارد ویروس در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی برای محافظت از مرگ و میر ویروس می‌باشد. نتایج این بخش نشان‌دهنده کارایی مناسب واکسن ژنتیکی برای القای محافظت و بقای موش‌های مورد چالش در قیاس با گروه‌های کنترل می‌باشد، هر چند که گروه کنترل مثبت نشان دهنده بقای کامل موش‌های گروه بود. همچنین نتایج تکثیر تایمیدین کیناز با طول ۳۹۸ جفت باز با روش PCR بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده از گانگلیون‌های تری ژیمینال نشان‌دهنده کارایی نسبی DNA واکسن مورد استفاده برای محافظت از نهفتگی در گانگلیون‌های تری ژمینال موش‌های مورد چالش می‌باشد. هر چند ویروس استاندارد بهترین محافظت در مقابل ایجاد نهفتگی را اعمال نمود ($Khi\ 2,\ p = ۰/۰۵$، جدول ۱). نتایج آزمون بقا و بررسی نهفتگی بر این مسئله دلالت دارند که واکسن ژنتیکی با القای ایمنی مناسب سد مناسبی در راه ورود و تکثیر ویروس ایجاد می نماید.



تصویر ۱. نتیجه حاصل از تکثیر HSV-1 در سلولهای Vero

شفای خاتم



تصویر ۲. نتایج حاصل از PCR برروی نمونه های گانگلیون در موش‌های گروه pcDNA3: لاین شماره ۱ کنترل منفی و لاین ۳ DNA استاندارد ویروس و بقیه نمونه‌های گانگلیونی هستند که حاوی ژن TK بودند، همه موش‌های گروه pCD-NA3 نتایج مثبت را نشان می دهند.

شفای خاتم

جدول ۱. نتایج PCR بر روی نمونه های استخراج شده از گانگلیون تری ژمینال و میزان مرگ و میر موشهای واکسینه شده.

گروه	تعداد موش ها	میزان بقا بعد از ۲۸ روز	مثبت PCR موارد
pCDNA3 - gD-1	۱۰	۹	۵
HSV-1 KOS	۱۰	۱۰	۰
pCDNA3	۱۰	۳	۱۰
PBS	۱۰	۱	۱۰

شفای خاتم

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده نقش محافظت کنندگی ژن گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در پیش گیری از نهفتگی ویروس در گانگلیون تری ژمینال می باشد. در مطالعات قبل، محققین قابلیت القای ایمنی این واکسن را مورد بررسی و تایید قرار داده بودند. بنابراین بنظر می رسد که بدلیل نقش القاکنندگی واکسن ژنتیکی حاوی ژن گلیکوپروتئین ویروس در تحریک ایمنی، پاسخهای لازم در پیش گیری از نهفتگی ویروس حائز اهمیت باشند (۹-۷). از سویی دیگر مقایسه نتایج مرگ و میر در گروه های مختلف، اثرات معنی دار واکسن ژنتیکی و ویروس استاندارد در قیاس با کنترلهای منفی مورد تایید قرار می دهد. با این وجود، بدلیل خطرات ناشی از استفاده ویروسهای زنده امکان بکار گیری چنین واکسنهایی بسیار محدود می باشد. بنابراین بنظر می رسد که ژن گلیکوپروتئین D ویروس که اصلی ترین گلیکوپروتئین ویروس بحساب می آید، کاندیدای مناسبی برای توسعه واکسنهایی باشد که در نهایت باعث کاهش نهفتگی ویروس می گردند. پس می توان انتظار داشت بکار گیری سیستم‌های واکسن موثرتر ضمن القای ایمنی مناسب تر و کارآتر در پیشگیری از نهفتگی ویروس هرپس می تواند نقش مهمی ایفا نماید.

منابع

1. Roizman B, Sears AE. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. Annul Rev Microbiol. 1987; 41: 543-571.

2. Feldman LT, Ellison CC, Voytek L, Krause PY, Margolis TP. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. Proc. Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 978-983.

3. Lin WR, Jennings R, Smith TL, Wozniak MA, Itzhaki RF. Vaccination prevents latent HSV-1 infection of mouse brain. Neurobiol of Aging. 2001; 2: 699-703.

4. Ramakrishan R, Fink DJ, Jiang G, Desai P, Glorioso JC, Levine M. Competitive quantitative PCR analysis of herpes simplex virus type 1 DNA and latency associated transcript RNA in latently infected cells of the rat brain. J Virol. 1994; 68: 1864-1873

5. Strasser JE, Arnold RL, Pachuk C, Higgins TJ, Bernstein DI. Herpes simplex virus DNA vaccine efficacy: effect of glycoprotein D plasmid constructs. J Infect Dis. 2000; 182: 1304-1310.

6. Stanbery LR, Cunningham AL, Mindel A, Scott LL, Spruance SL, Aok FY. Prospect for control of herpes simplex virus diseases through immunization. Clin Infect Dis. 2000; 30: 549-599.

7. Manickan E, Rouse RJD, Yu Z, Wire WS, Rouse BT. Genetic immunization against herpes simplex virus: protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. J Immunol. 1995; 155: 259-265.

8. Frye TD, Chiou HC, Hull BE, Bigley NJ. The efficacy of a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein D in decreasing ocular disease severity following corneal HSV-1 challenge. Arch Virol. 2002; 147: 1747-1759.

9. Baghian A, Chouljeko VN, Dauvergne O, Newman MJ, Baghian S, Kousoulask G. Protective immunity against lethal HSV-1 challenges in mice by nucleic acid- Based immunization with herpes simplex virus-1 genes specifying glycoproteins gB and gD. J Med Microbiol. 2002; 51: 350-357.