ارزیابی پاسخ های ایمنی القاء شده علیه تجویز هم زمان پروتئین نوترکیب NP ویروس آنفلوانزا H1N1 و یاور هموکینین-۱ در موش های BALB/c

مهدی مهری[۱]، فریدا بهزادیان[۱]، شهلا شاهسوندی*[۲]، سینا سلیمانی[۳]

۱) مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲) گروه ژنتیک مولکولی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳) گروه ویروس شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۹

چکیده

مقدمه: شیوع همه گیری های بیماری آنفلوانزا و انتقال مستقیم سویه های نوپدید ویروس پرندگان به انسان، ضرورت بهبود برنامه های ایمن سازی علیه این بیماری را برجسته نموده است. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی اثر یاور زیستی هموکینین-۱ (HK-1) بر افزایش پاسخ ایمنی القاء شده با واکسن نوترکیب آنفلوانزا بر پایه پروتئین NP ویروس آنفلوانزا H1N1 می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تعداد چهل سر موش ماده BALB/c با سن شش هفته در دو گروه کنترل(هر گروه پنج سر) و سه گروه تیمار(هر گروه ده سر) تقسیم بندی شدند. گروه های کنترل شامل دریافت کننده سرم فیزیولوژی و دریافت کننده یاور الیگونوکلئوتیدی HK-1، و گروه های تیمار شامل دریافت کننده دو نوبت پروتئین نوترکیب NP، دریافت کننده یک نوبت NP همراه با HK-1، و دریافت کننده دو نوبت NP و HK-1 بودند. بر اساس گروه بندی ها، تزریق نمونه به میزان ۰/۱ ml در عضله چهار سر ران موش انجام شد. گروه های تیمار نسبت حجمی یک به ده پروتئین NP به HK-1 را دریافت کردند. نمونه های سرم پیش از واکسیناسیون های اولیه و یادآور، و در فواصل زمانی معین جمع آوری شد. پاسخ های ایمنی با آزمایش های الایزا و تزاید لنفوسیتی ارزیابی شد.

یافته های پژوهش: افزایش عیار آنتی بادی در گردش علیه آنفلوانزا در موش های ایمن شده با واکسن نوترکیب بر پایه NP که یاور HK-1 را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه های کنترل چشمگیر($P<0.05$) بود. پیامد واکسیناسیون یادآور تغییری در پاسخ ایمنی هومورال علیه آنفلوانزا مشاهده نشد. در پاسخ به پروتئین NP ویروس، لنفوسیت های موش های دریافت کننده NP همراه با HK-1 همانند گروه دریافت کننده NP به تنهایی، تزاید یافتند.

بحث و نتیجه گیری: این دستاورد نشان می دهد که HK-1 قابلیت افزایش پاسخ ایمنی هومورال اختصاصی حاصل از واکسن نوترکیب آنفلوانزا بر پایه NP را دارد. افزودن این یاور اثر شایان توجهی بر افزایش شاخص تحریک پذیری لنفوسیتی ندارد.

واژه های کلیدی: آنفلوانزا، واکسن نوترکیب، پروتئین NP، یاور HK-1

* نویسنده مسئول: گروه ژنتیک مولکولی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

مقدمه

بیماری آنفلوانزا به وسیله ویروس های دارای RNA از خانواده ارتومیکسو ویریده ایجاد می شود و طیف وسیعی از جانوران، شامل پرندگان، پستانداران و انسان را مبتلا می کند. آلودگی میزبان انسانی با ویروس های آنفلوانزا، پاسخ های بالینی متفاوت از عفونت بدون علامت تا پنومونی ویروسی اولیه و پنومونی ویروسی کشنده(عفونت هم زمان ویروسی و باکتریایی) در کودکان و بزرگسالان را در بر می گیرد که به سن و خصوصیات جسمانی میزبان بستگی دارد(۱). افزون بر این آنفلوانزا عامل همه گیری های سالانه و هم چنین پاندمی هایی است که در طول تاریخ تکرار شده اند(۲). در دهه اخیر به دلیل افزایش رخداد آنفلوانزا در جمعیت های انسانی به ویژه انتقال مستقیم ویروس از پرندگان به انسان، بررسی های بسیاری در زمینه کنترل و پیشگیری از این بیماری صورت گرفته است(۳،۴). ماهیت خاص ویروس های آنفلوانزا سبب شده است تا واکسن های پروتئینی به عنوان نسل سوم واکسن ها و کاندید تولید واکسن جامع علیه ویروس های آنفلوانزا مورد توجه خاصی قرار گیرند. در این شیوه تولید واکسن، آن دسته از پروتئین های حفظ شده ویروس آنفلوانزا که دارای تغییرات کمتری بوده و خاصیت آنتی ژنی بیشتری دارند را در سامانه های یوکاریوتی مانند باکولوویروس بیان کرد. در حقیقت این نوع واکسن یک رویکرد نوآورانه برای طراحی و توسعه واکسن بر پایه مناطق حفظ شده دارای پتانسیل القاء ایمنی است(۸-۵). نوکلئوپروتئین (NP) ویروس که ساختاری کاملاً حفظ شده داشته و به عنوان آنتی ژن داخلی نقش مهمی در القا پاسخ های ایمنی دارد کاندیدای مناسبی برای القاء ایمنی در برابر آنفلوانزا می باشد(۱۲-۹). NP یک پلی پپتید چند عملکردی است و به عنوان یک رابط کلیدی بین ویروس و سلول میزبان عمل می کند. این پروتئین توانایی میانکنش با گستره ای از ماکرومولکول های ویروسی و سلولی شامل RNA، خود مولکول NP، دو زیر واحد RNA پلیمراز ویروس و پروتئین ماتریکس ویروس را دارد. میانکنش های NP-NP نقش اصلی در حفظ ساختار ریبونوکلئوپروتئین را ایفا می کنند و طی برهم کنش با پلی پپتیدهای سلولی شامل اکتین، اجزای ورود و خروج هسته ای، و RNA هلیکاز هسته ای سبب تسهیل ورود ریبونوکلئوپروتئین از سیتوپلاسم به داخل هسته در اوایل چرخه تکثیر ویروس می شوند(۱۳).

برخی قابلیت های واکسن پروتئینی عبارتند از خاصیت آنتی ژنی بالا، ایجاد آنتی بادی مشابه با عامل بیماری زا، توانایی القاء ایمنی سلولی، توان ایمن سازی علیه چندین سویه مختلف و امکان غلبه بر عوامل با تغییرات آنتی ژنی، عدم بازگشت توان بیماری زایی، ایجاد مقاومت پایدار و حافظه ایمنی طولانی مدت(۴،۱۴). اما این واکسن ها به تنهایی در القای پاسخ های ایمنی کارایی مناسبی ندارند. برای فعال سازی سلول های ارایه کننده آنتی ژن و برانگیخته شدن هر چه بیشتر پاسخ هومورال اختصاصی، استفاده از یک یاور(adjuvant) مناسب و بدون اثرات جانبی برای تقویت پتاسیل القای ایمنی در کنار عامل ایمونوژن ضروری است(۱۵). یاورهای رایج اغلب ترکیبات نمکی یا روغن های معدنی هستند که علی رغم مزایایی که دارند به دلیل سنتتیک بودن، ممکن است برای بافت یا دستگاه خاصی از بدن سمی باشند، و یا با آنتی ژن های بافتی میزبان واکنش های متقاطع نشان دهند. در سال های اخیر، پروتئین های محرک سامانه ایمنی به دلیل نقش داشتن در تکثیر و تمایز سلول های B، تغییر ایزوتیپی، و بلوغ تمایل آنتی بادی ها یاورهای در دست مطالعه برای افزایش ایمنی بخشی واکسن ها هستند(۱۶،۱۷). همو کینین-۱ (HK-1) آخرین عضو شناخته شده خانواده پروتئینی تاچی کینین است که در تکامل سلول های T نقش دارد و به عنوان یک القاء کننده فاکتور رشد در تکثیر و تمایز سلول های B و تولید آنتی بادی معرفی می شود(۱۸،۱۹). در این پژوهش پتانسیل واکسن پروتئینی آنفلوانزا بر پایه NP همراه با یاور الیگونوکلئوتیدی HK-1 در افزایش پاسخ های ایمنی علیه ویروس H1N1 در موش آزمایشگاهی BALB/c مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج و با مشارکت دانشگاه صنعتی مالک اشتر در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ انجام شد.

تهیه پروتئین نوترکیب NP ویروس آنفلوانزا H1N1: پروتئین نوترکیب NP ویروس H1N1 مورد استفاده در سیستم پروکاریوت pET28a بیان و با استفاده از ستون کروماتوگرافی خالص شده است(۲۰). برای ایمن سازی موش های مورد آزمایش، غلظت این پروتئین برابر با ۰/۸ µg/µl در نظر گرفته شد.

سنتز یاور الیگونوکلئوتیدی HK-1: در پژوهش های پیشین(۲۱،۲۴) RNA بافت ریه موش استخراج شده و قطعه ژنی HK-1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طی واکنش RT-PCR به طول ۲۳۱ bp تکثیر شده بود. سپس این قطعه در وکتور بیانی pcDNA3.1 به روش شوک حرارتی کلون شده و پلاسمید حاصل به عنوان یاور در مطالعات ایمن سازی مورد استفاده قرار گرفته بود. در این پژوهش به جای استفاده از پلاسمید، توالی HK-1 به گونه ای طراحی و سنتز شد که متشکل از نوکلئوتیدهای رمزگذار برای موتیف حفظ شده Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-phe-Tyr-Gly-Leu-Met و دارای پتانسیل تمایز سلول‌های B و تولید آنتی بادی باشد. غلظت HK-1 در ایمن سازی موش ها برابر با ۱۰ µg/µl در نظر گرفته شد.

ایمن سازی موش های مورد مطالعه: تعداد چهل سر موش ماده BALB/c (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج) با سن شش هفته و میانگین وزنی بیست گرم طی دو نوبت آزمایش در گروه های کنترل و تیمار دسته‌بندی شدند. موارد اخلاقی نگهداری موش ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به هنگام تزریق و خون گیری به طور کامل رعایت شد. پیش از هر نوبت خون گیری موش ها توزین می شدند. گروه های مورد آزمایش عبارت بودند از:

گروه کنترل منفی: بدون دریافت هیچ نوع ماده تزریقی(۵ سر)

گروه کنترل یاور: دریافت فقط یاور HK-1 (۵ سر)

گروه تیمار A: دریافت فقط پروتئین نوترکیب NP در دو نوبت(دو هفته پس از دریافت اولیه)(۱۰ سر)

گروه تیمار B: دریافت پروتئین نوترکیب NP همراه با یاور مولکولی HK-1 (۱۰ سر)

گروه تیمار C: دریافت پروتئین نوترکیب NP همراه با یاور مولکولی HK-1 و دریافت یادآور آن دو هفته پس از واکسیناسیون اولیه(۱۰ سر).

بر اساس گروه بندی ها، تزریق نمونه به میزان ۰/۱ ml در عضله چهار سر ران موش انجام شد. برای گروه های تیمار B و C، پروتئین و یاور به نسبت حجمی ۱:۱۰ پیش از تزریق مخلوط می شدند.

ارزیابی ایمنی هومورال: در روز هفتم از چشم موش های هر گروه نمونه خون گرفته شده و سرم آن ها برای بررسی عیار آنتی بادی اختصاصی علیه ویروس آنفلوانزا در آزمایش الایزا جدا شد. در روز چهاردهم موش های تیمار شده گروه های A و C یک نوبت تزریق یادآور مربوطه را دریافت کردند. در فواصل معین و نیز پیش از تزریق یادآور، از چشم موش های هر گروه خون گرفته شده و پس از تهیه سرم، پاسخ ایمنی هومورال با اندازه گیری میزان عیار آنتی بادی علیه NP ویروس آنفلوانزا و استفاده از کیت تجاری الایزا(ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species) ارزیابی شد. به اختصار از رقت ۱:۱۰۰ سرم های رقیق شده در بافر بلوک کننده، به ترتیب در هر دو گوده متوالی ستون های ۱۲-۱ ریخته شد. سرم کنترل منفی در گوده A1 و A2، و سرم کنترل مثبت در گوده های A3 و A4 ریخته شد و پلیت مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از سه بار شستشو، آنتی بادی کنژوگه Anti-NP-HRP به هر گوده افزوده شده و پلیت به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. گوده ها شسته شده سپس محلول سوبسترا به هر گوده اضافه شده و پلیت مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از افزودن بافر متوقف کننده به هر گوده، جذب نوری با دستگاه خوانش گر الایزا ثبت شد. عیار آنتی بادی بر مبنای فرمول پیشنهادی شرکت سازنده محاسبه شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

ارزیابی تزاید لنفوسیت های طحال: دو ماه پس از دومین تزریق، در شرایط استریل طحال سه موش از هر گروه خارج شده و زیر لامینار فلو با PBS استریل شستشو داده شد. با استفاده از دو سرنگ استریل، ۱۰ ml محیط کشت DMEM از دو طرف به درون طحال تزریق شد تا تمامی سلول های آن خارج شود و سوسپانسیون تک سلولی در محیط کشت به دست آید. برای حذف گلبول های قرمز، محلول آمونیوم کلراید ۰/۹ درصد در بافر تریس (pH=۷/۲) اضافه شده سپس سلول های زنده شمارش شدند. تعداد لنفوسیت ها در هر گروه به ۱×۱۰^{۶} سلول در هر میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی محیط، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و ۲۵ mM بافر HEPES رسانده شد. لنفوسیت ها با ۰/۱۴۵ µg پروتئین نوترکیب NP و میتوژن فیتوهماگلوتینین(PHA) در غلظت نهایی ۵ mg/ml تحریک شده سپس مقدار ۱۰۰ µl از آن ها در گوده های یک میکروپلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد. برای هر گروه از لنفوسیت ها، شش گوده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و با ۱۰۰ µl محیط DMEM، حجم نهایی آن ها به ۲۰۰µl رسانده شد. پس از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد دارای ۵ درصد CO_2، ۲۰µl از معرف MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl-blue) با غلظت ۵ g/l به هر گوده اضافه و میکروپلیت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از آن مایع رویی هر گوده با دقت تخلیه شد و کریستال های فورمازان تشکیل شده با اضافه کردن ۱۵۰ µl دی متیل سولفوکساید به هر گوده حل شدند. پس از ۱۵ دقیقه قرار دادن میکروپلیت در دمای آزمایشگاه میزان جذب هر گوده در طول موج ۶۳۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر تعیین شده و میانگین±انحراف معیار(Mean±SD) برای سه بار آزمایش محاسبه شد. شاخص تحریک(Stimulation Index; SI) به صورت نسبت میانگین OD گوده های حاوی سلول های تحریک شده با آنتی ژن تزریق شده به متوسط OD گوده های حاوی سلول با محیط (کنترل منفی) محاسبه شد.

ارزیابی آماری: پردازش آماری با استفاده از نرم افزار SPSS vol.22 انجام شد. داده های به دست آمده از گروه های مختلف در دو نوبت ایمن سازی از نظر نرمال بودن با آزمون ناپارامتری Kolmgorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه دو به دو از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. سطح معنی دار با اختلاف کمتر از ۰/۰۵ در نظرگرفته شد.

یافته های پژوهش

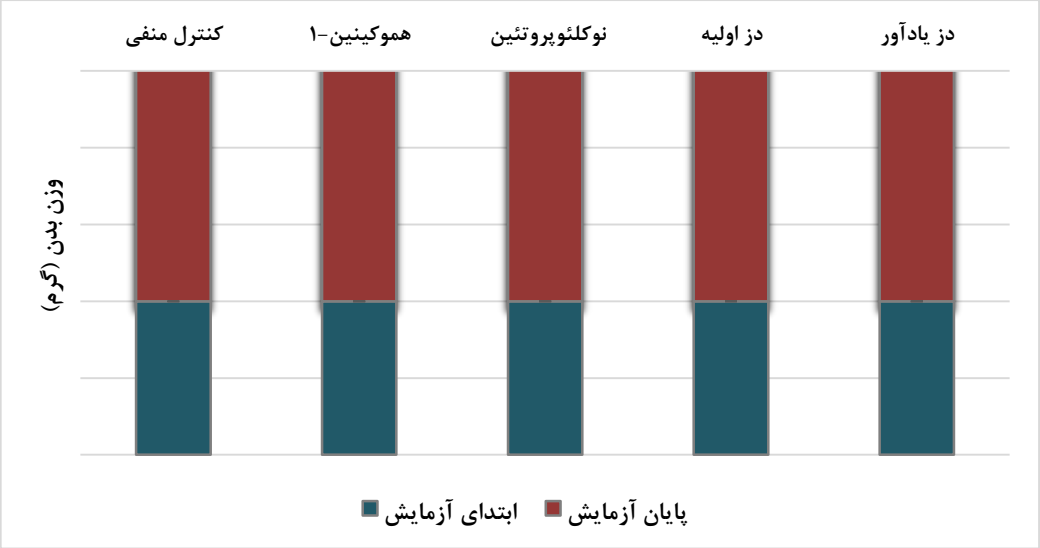
وزن گیری موش های BALB/c در دوره آزمایش: میانگین وزن موش ها در تمامی گروه های کنترل و تیمار تفاوت معنی داری($P<0.05$) نداشت و در بازه زمانی آزمایش از میانگین ۲۰ گرم به میانگین ۴۰/۵ گرم رسید(نمودار شماره ۱). بدین ترتیب هیچ یک از ترکیبات پروتئین نوترکیب NP ویروس آنفلوانزا و یاور HK-1 اثر سویی بر روی حیوان نداشتند.

ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال: نتایج آزمایش الایزا نمونه های سرم در دو نوبت ایمن سازی گروه ها، نشان می دهد که موش های BALB/c گروه های کنترل منفی و کنترل یاور فاقد عیار آنتی بادی علیه آنفلوانزا بودند. کمترین میزان عیار آنتی بادی اختصاصی علیه آنفلوانزا در گروه تیمار A که فقط پروتئین نوترکیب NP را در دو نوبت دریافت کرده بود در مقایسه با گروه های تیمار که یاور را دریافت کرده بودند مشاهده شد(نمودار شماره ۲). در این گروه اگر چه تزریق این پروتئین سبب القاء آنتی بادی می شود اما از نظر ایمن سازی این مقدار به عنوان عیار حفاظتی علیه ویروس در نظر گرفته نمی شود. این افزایش در عیار آنتی بادی پس از تزریق یادآور پروتئین NP مشاهده شد و در روزهای پایانی دوره آزمایش از میزان آن کاسته شد. موش های تیمار شده با پروتئین نوترکیب و یاور HK-1 دارای عیار های به مراتب بالاتر و نیز یکنواختی در عیار در طول دوره آزمایش بودند. میانگین عیار آنتی بادی حفاظتی در موش های تیمار شده گروه C که تزریق یادآور پروتئین NP همراه با HK-1 را دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری($P<0.05$) با موش هایی که یک نوبت تزریق مشابه را دریافت کرده بودند نداشت.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

ارزیابی پاسخ تکثیر و تزاید لنفوسیتی: تغییر رنگ در اثر تشکیل کریستال های فرمازان تیره ناشی از احیای MTT توسط آنزیم های میتوکندریایی لنفوسیت در دو گروه ایمن شده با پروتئین NP همراه با یاور HK-1 مشاهده شد. این تغییر از زرد تا صورتی به بنفش پر رنگ در نتیجه تحریک و تزاید لنفوسیت ها توسط آنتی ژن و میتوژن است. داده های شاخص تحریک ناشی از تاثیر این پروتئین همراه با یاور بر لنفوسیت های جدا شده از موش های مورد آزمایش در شکل شماره ۳ آورده شده است. در مقایسه با میتوژن، پروتئین نوترکیب NP پس از دو بار تزریق قادر به القاء این پاسخ در موش های مورد مطالعه می باشد(۴/۰۲). این شاخص اگر چه در تزریق توام یاور HK-1 در دو نوبت ایمن سازی نسبت به این پروتئین به تنهایی، افزایش می یابد(به ترتیب ۴/۴۴ و ۴/۸۲) اما از نظر آماری معنی داری($P<0.05$) نیست.



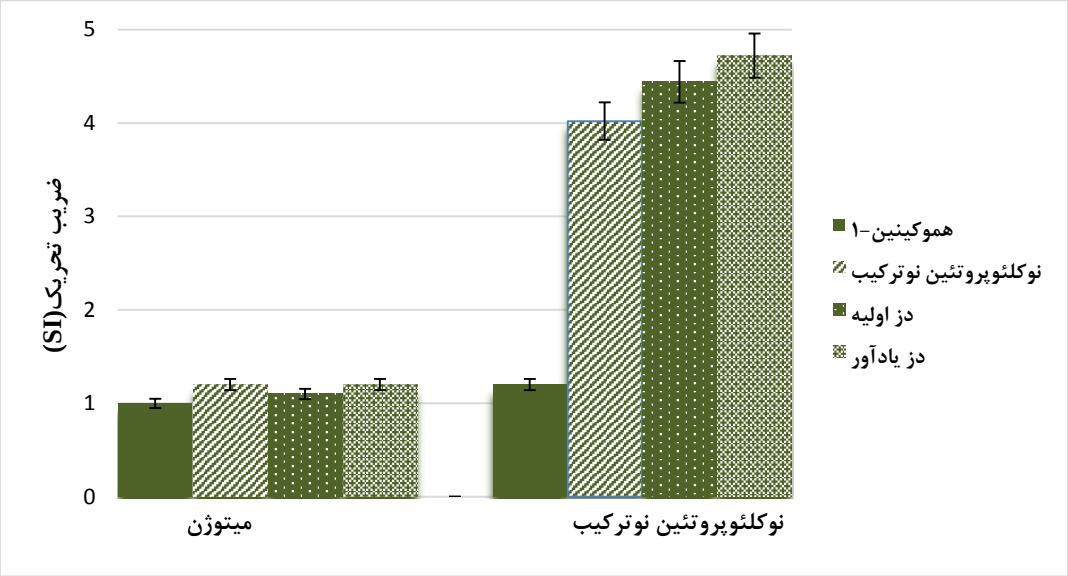
نمودار شماره ۱. وزن گیری گروه های مختلف موش های BALB/c در دوره ایمن سازی با نوکلئوپروتئین نوترکیب ویروس آنفلوانزا و یاور هموکینین-۱. تفاوت معنی داری($P<0.05$) بین گروه های آزمایش مشاهده نشد.



نمودار شماره ۲. القاء پاسخ ایمنی هومورال در موش های ایمن شده با نوکلئوپروتئین نوترکیب ویروس آنفلوانزا و یاور هموکینین-۱. یکنواختی افزایش عیار آنتی بادی اختصاصی در طول دوره آزمایش برای هر دو گروه تیمار که پروتئین و یاور را در دز اولیه و دز یادآور دریافت کرده بودند مشاهده شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]



نمودار شماره ۳. مقایسه ضریب تحریک (SI) گروه های موش‌های ایمن شده با هر یک از نوکلئوپروتئین نوترکیب ویروس آنفلوانزا و یاور هموکینین-۱، و ترکیب هر دو در دو دز اولیه و یادآور. تزاید لنفوسیت های T در موش های دریافت کننده پروتئین به تنهایی ایجاد می شود و یاور اثر شایان توجهی بر روی آن ندارد.

بحث و نتیجه گیری

این پژوهش با هدف ارزیابی اثر یاور زیستی HK-1 بر پاسخ های ایمنی القاء شده علیه پروتئین نوترکیب NP ویروس آنفلوانزا H1N1 در موش های آزمایشگاهی BALB/c انجام شد. استراتژی اصلی در تولید واکسن آنفلوانزا استفاده از ویروس کامل غیرفعال است. به دلیل بروز جهش های نقطه ای در ژنوم ویروس و تغییرات آنتی ژنی، این واکسن ها کارایی کمتری به هنگام اپیدمی های آنفلوانزا دارند. بنا بر این، طراحی و توسعه یک واکسن جامع که بتواند همپوشانی موثر و ایمنی بلند مدت علیه ویروس های غالب و در گردش آنفلوانزا ایجاد کند به اولویت پژوهشی تبدیل شده است(۲۲). توالی ژن رمزگذار NP دارای بیشترین مناطق حفاظت شده بین ویروس های مختلف آنفلوانزا است به طوری که توالی اسید آمینه آن بین ویروس های آنفلوانزای تیپ A بیش از ۹۰ درصد هومولوژی دارد. این پروتئین دارای نرخ جهش بسیار پایینی است و به عنوان یک ایمنوژن برای ساخت واکسن پروتئینی مطرح می باشد(۱۱،۱۳). بیان پروتئین NP مسیر فعال سازی NF-κB را القاء می کند که مهم ترین فاکتور رونویسی سامانه ایمنی است و پیامد آن رونویسی از بسیاری پروتئین های اثرگذار بر ایمنی ذاتی امکان پذیر می شود. مسیر اصلی شناسایی سیتوزولی ژنوم ویروس آنفلوانزا سبب فعال شدن مسیر TANK Binding kinase-1 (STING-TBK1) می شود که در سلول های دندرینیک حتی بدون فعال شدن پذیرنده های سلولی مانند TLR ها اینترفرون تولید می کند. این مسیر در شبکه آندوپلاسمی توان فعال کردن NF-KB و IRF3 را دارد. فعال شدن این فاکتورهای رونویسی به بیان ژن های اینترفرون نوع I منجر می شود(۷،۲۳). واکسن های نوترکیب با فعال کردن این مسیر، سبب می شوند سلول های T آمادگی پذیرش هر گونه آنتی ژن خارجی را داشته باشند و طی یک واکنش سریع سیستم ایمنی ذاتی را در مدت زمان کوتاهی فعال می کنند(۱۴). این واکسن ها محرک تولید آنتی بادی های خنثی کننده هستند که برای ایجاد حفاظت علیه یک بیماری مورد نیازند، با این وجود برای بهینه شدن روند ایمنی زایی و القاء پاسخ هومورال می بایست تعداد دفعات دریافت پروتئین را بیشتر کرد و یا از یاور استفاده نمود. در مطالعات پیشین، توان HK-1 در افزایش پاسخ های ایمنی هومورال علیه ویروس آنفلوانزا به صورت واکسن نانوذره آنفلوانزا بر پایه کیتوزان و نیز DNA واکسن بر پایه HA2

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

ویروس، در موش و طیور مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج حاکی از این است که پتانسیل القاء پاسخ ایمنی هومورال اختصاصی علیه ویروس آنفلوانزا در حضور HK-1 افزایش می یابد(۲۲،۲۴،۲۵). در این پژوهش، داده های آزمایش الایزا نشان داد تزریق پروتئین نوترکیب NP به تنهایی نمی تواند پاسخ هومورال حفاظتی در موش ها را القاء نماید. در مقایسه، تزریق یک نوبت این پروتئین همراه با یاور سبب افزایش عیار آنتی بادی علیه ویروس در گروه های موش تحت آزمایش شد. بنا بر این استفاده از یاور برای افزایش توان ایمنی زایی پروتئین نوترکیب NP ویروس ضروری است. این ترکیبات سبب ذخیره در محل تزریق برای آزادسازی تدریجی آنتی ژن، افزایش ظرفیت عـــمل آوری و ارائه بهتر آنتی ژن توسط مولکول های MHC II با اتصال به غشاء سلولی یا تغییر در پپتیدهای سطحی مولکول MHC و تحریک بیشتر سلول های B، افزایش ترشح فعال آنتی بادی و پاسخ های مربوط به ســـلول هـــــای T CD8+ می شوند(۱۷). پس از تزریق نوبت دوم، میزان عیار در گروه تیماری که دز یادآور را دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری با گروه تیمار با یک نوبت تزریق یادآور نداشت. این افزایش زیاد سطح آنتی بادی در یک نوبت ایمن سازی می تواند ناشی از کنش HK-1 بر افزایش جذب آنتی ژن توسط سلول های دندریتیک و فراهم کردن ذخیره پایدار از آن باشد. در نتیجه بیان مولکول های محرک پاسخ های ایمنی یا مولکول های MHC افزایش یافته و پاســخ ایـــمنی بهـــبود می یابد(۱۷،۲۶). از طرف دیگر HK-1 از چندین مسیر انتقال پیام داخلی اینترفرون نوع I را فعال می‌کند. این نوع اینترفرون با فعال سازی سلول های دندریتیک و نیز افزایش ترشح فاکتورهای محرک مانند IL-21 که سبب تکثیر و تمایز و پایداری سلول های B و تولید آنتی بادی، و تکثـــیر لنفوسیت های T فولیکولاری می شوند؛ تنظیم کنـــنده ســلول های مرتبط با سیستم های ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی است. این سلول ها با عرضه آنتی ژن بر روی سطح سلول، به طور مستقیم پیش برنده بیان گیرنده های سلول B هستند که نتیجه آن برهم کنش های متـــوالی با سلول های T کمکی برای شروع ترشح آنتی بادی و فعال کـــردن ایمنی هـــــومورال در واکنش علیه آنتی ژن های پروتئینی است(۱۹).

در دهه های اخیر یاورهـای جدیـد بـا ایـن رویکـرد طراحی می شوند که خود یک القاء کننده پاسخ ایمنـی باشند و ایمنی را در مسیر تحریک هـر دو نـوع ایمنـی هومورال و ایمنی سـلولی پـیش برنـد(۱۶). در بیمـاری آنفلوانزا، نقش ایمنی سلولی پاک سازی عفونت اسـت و به نظـر مـی رسـد سـلول هـای T سیتوتوکسـیک بـا متلاشی نمودن سلول های آلوده به ویـروس بـر رونـد بهبودی اثـر مثبـت مـی گـــــذارند(۲۷). بـا اسـتفاده الگوریتم های بیوانفورماتیکی و مدل سازی مقایسه ای، توانایی HK-1 بر سازه های کایمری اپی توپی چند زیر واحد ویروس آنفلوانزا برای تحریک پاسخ هـای ایمنـی هومورال و سلولی در فضای مجازی ارزیابی شده است. داده ها بیانگر دارا بودن ظرفیت تحریک سیستم ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا توسط این مولکول می باشد(۲۸). در این پژوهش، امکان القاء ایمنی سلولی پس از تزریق پروتئین نوترکیب NP همراه با HK-1 به مـوش هـای BALB/c در آزمـایش تکثیـر و تزایـد لنفوسـیت هـا ارزیـابی شـد. چـون میتـوژن هـا جمعیـت وسـیعی از لنفوسیت ها را تحریک می کنند پاســخ تکثیـری بـه آن ها اختصاصی نیست و قوی تر از پاسخ به آنتـی ژن می باشد. ضریب تکثیر در پروتئین نوترکیب NP بسیار اختصاصی بوده و فقط لنـــفوســـیت هـایی تحریـک می شوند که این پروتئین را شناسایی می‌کنند. مـــیزان SI > ۲ نشان دهـــــنده تـــحریک مناسب ناشـی از سازه های پیشنهادی می باشد. بر این اسـاس، ضـریب تکثیر گروه های تیمار نشـان مـی دهـد کـه پـروتئین نوترکیب NP به تنهایی قادر به القاء پاسخ ایمنی ناشی از لنفوسیت های T هست. این امر دور از انتظار نیسـت زیـرا پاسـخ لنفوسـیت هـای T سیتوتوکسـیک علیـه پروتئین های داخلی NP و M ایجاد می شود، اما یـاور HK-1 اثر فزاینده ای بـر روی آن نـدارد. در مطالعـات پیشین اثر فزاینده HK-1 بر سـطح آنتـی بـادی هـای اختصاصی علیه DNA واکسن HA2 ویروس آنفلـوانزا پرندگان و نیز نـانو واکسـن تهیـه شـده از کـل پیکـره ویروس بر پایه کیتوزان گزارش شده بود. ایـن مطالعـه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

تاییدکننده اثر این مولکول به عنوان یاور الیگونوکلئوتیدی بر فعال شدن پاسخ ایمنی هومورال در واکنش علیه آنتی ژن پروتئین داخلی NP ویروس آنفلوانزا انسانی H1N1 و افزایش سطح آنتی بادی های اختصاصی علیه آن است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی مالک اشتر با کد مصوب ۵۰۴۰ می باشد. از همکاری های موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی برای انجام این مطالعه سپاسگزاری می شود.

کد اخلاق: RSVRI.REC.98.010

References

1. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. Annu Rev Pathol 2008; 3:499-522. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316.

2. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. Emer Infec Dis2006; 12:9-10. doi: 10.3201/eid1201.051254.

3. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nature Rev Microb2011; 9:590-603. doi: 10.1038/nrmicro2613.

4. Lambert LC, Fauci AS. Influenza vaccines for the future. N Engl J Med2010; 363:2036-44. doi: 10.1038/nrmicro2613.

5.Doherty PC, Turner SJ, Webby RG, Thomas PG. Influenza and the challenge for immunology. Nature Immunol2006; 7:449-55.

6. Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. Clin Microbiol Rev2013; 26:476-92. doi: 10.1128/CMR.00097-12.

7. Soema PC, Kompier R, Amorij JP. Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies Eur J Pharm Biopharm2015; 94:251-63. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.05.023.

8.Munoz ET, Deem MW. Epitope analysis for influenza vaccine design. Vaccine2005; 23: 1144-8.

9.Li Z, Gabbard JD, Mooney A, Gao X, Chen Z, et al. Single-dose vaccination of a recombinant parainfluenza virus 5 expressing NP from H5N1 virus provides broad immunity against influenza A viruses. J Virol 2013; 87: 5985-93. doi: 10.1128/JVI.00120-13.

10.Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, Piskareva LM, Zakharova LG, et al. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. Arch Virol 2006; 151:921-31.

11. Epstein SL, Kong WP, Misplon JA, Lo CY, Tumpey TM, Xu L, Nabel GJ. Protection against multiple influenza a subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. Vaccine2005; 23:5404-10.

12. Zheng M ,Luo J, Chen Z. Development of universal influenza vaccines based on influenza virus M and NP genes. Infection. 2014; 42:251-62. doi:10.1007/s15010-013-0546-4.

13. Portela AN, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. J Gen Virol 2002; 83:723-34.

14.Sedova ES, Shcherbinin DN, Migunov AI, Smirnov Al, Logunov Dl, et al. Recombinant influenza vaccines. Acta Naturae 2012; 4: 17-27.

15. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. Front Immunol 2013; 4:114. doi: 10.3389/fimmu.2013.00114.

16.Tovey MG, Lallemand C. Adjuvant activity of cytokines. Methods Mol Biol 2010; 626:287-309.

17. Fox CB, Kramer RM, Barnes L, Dowling QM, Vedvick TS. Working together interactions between vaccine antigens and adjuvants. Ther Adv Vac 2013; 1:7-20. doi: 10.1177/2051013613480144.

18. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. Nat Immunol2000; 1:392-07.

19. Wang W, Li Q, Zhang J, Wu H, Yin Y, Ge Q. Hemokinin-1 activates the MAPK pathway and enhances B cell proliferation and antibody production. J Immunol 2010;

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

184:3590-07. doi: 10.4049/jimmunol.0901278.
20.Alikhani M, Behzadian F, Mehrbod P, Khosravinode F, Shokouhitarghi H, et al. Polyclonal antibody against recombinant nucleoprotein of the influenza A virus H1N1 production and purification**.** Iran J Virol 2017; 11:36-42.
21.Sadeghi K, Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Mahravani H, Fazel H. [Hemokinin-1 molecular adjuvant: an approach to enhance the efficacy of influenza vaccine]. J Arak Uni Med Sci 2015; 17:62-09. (Persian)
22. Ahmadi M, Shahsavandi S. Challenges and perspectives towards the development of more effective influenza vaccine. Iran J Virol 2017; 11: 33-40.
23. Shahsavandi S, Ebrahimi MM. Influenza. 1 th ed. Jehade Daneshgahi Tehran Publication. 2013;P.32-09.
24. Dehghan A, Shahsavandi S, Jabalameli L. Improvement efficacy of influenza nanovaccine in combination with hemokinin-1 molecular adjuvant. Avi J Med Biotech 2018; 10: 212-7.
25.Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Samiee MR. [Promotion the immunogenicity of chitosan nanoparticle based influenza vaccine using hemokinin-1]. J Arak Uni Med Sci2018; 21: 1-11. (Persian)
26. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. Curr Opin Immunol 2009; 21:23-29. doi: 10.1016/j.coi.2009.01.004.
27. Lagruta NL, Turner SJ . T cell mediated immunity to influenza mechanisms of viral control. Trends Immunol 2014; 35:396-402. doi: 10.1016/j.it.2014.06.004.
28. Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Sadeghi K, Mahravani H. Design of a heterosubtypic epitope based peptide vaccine fused with hemokinin-1 against influenza viruses. Virol Sin2015; 30:200-07. doi.org/10.1007/s12250-014-3504-0.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]

Evaluation of Immune Responses Induced by Co-administration of Recombinant NP-based Influenza H1N1 Vaccine and Hemokinin-1 Adjuvant in BALB/c Mice

Mehri M[1], Behzadian F[1], Shahsavandi S[2], Soleimani S[3]*

(Received: 2019 May 6 Accepted: 2019 October 1)

Abstract

Introduction: The prevalence of influenza epidemics and direct transmission of the emerged avian virus strains to humans have highlighted the necessity of improving the management programs against this disease. The aim of this study was to evaluate the biological adjuvant effect of hemokinin-1 (HK-1) on enhancing the immune response induced by the recombinant influenza vaccine based on the Nucleoprotein protein (NP) of the H1N1 influenza virus.

Materials & Methods: In this experimental study, a total of 40 six-week-old female BALB/c mice were divided into two control groups (5 mice per group) and three treatment groups (10 mice per group). The control groups received normal saline and HK-1 oligonucleotide adjuvant. On the other hand, the treatment groups received NP recombinant protein (twice), NP protein with HK-1 (once), as well as NP protein with HK-1 (twice). Based on the grouping, 0.1 ml of each sample was injected into the quadriceps femoris muscle of the mice. The treatment groups received a 1:10 (v/v) ratio of the NP protein and HK-1. The serum samples were collected prior to primary and reminder vaccinations in defined intervals. The immune responses were analyzed using enzyme-linked immunosorbent and lymphocyte proliferation assays. *Ethics code:* RSVRI.REC.98.010

Findings: The rise of the anti-influenza antibody in immunized mice with recombinant NP-based vaccine received HK-1 adjuvant was significant, compared to that in the control group ($P<0.05$). The results of the vaccination reminder did not indicate any changes in the humoral immune response against influenza. In response to the viral NP protein, the lymphocytes in mice receiving NP protein with HK-1 were proliferated the same as the group received NP alone.

Discussion & Conclusions: According to the results, HK-1 has the potential to increase specific humoral antibody response following vaccination with a recombinant NP-based influenza vaccine. The addition of this adjuvant does not have a significant effect on increasing the lymphocyte stimulation index.

Keywords: Influenza, Hemokinin-1 Adjuvant, Nucleoprotein, Recombinant vaccine

1. University Complex of Chemistry and Chemical Engeneering, Malek Ashtar University, Tehran, Iran
2 .Dept of Molecular Genetics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran
3. Dept of Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran
**Corresponding author Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.44]