٩٧٣٦

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی علوم پزشکی

عنوان پایان نامه:

بررسی اثر فیلتره حاصل از نکروز سلول های EL4 در کارایی واکسن DNA واجد ژن بیان کننده gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در موش‌های C57BL/6

نگارش:

روح ا... درستکار ساری

استاد راهنما:

دکتر طراوت بامداد

استاد مشاور:

دکتر مسعود پارسانیا

پاییز ۸۶

۱۳۸۷ /۲/ ۵

۹۷۳۶۰

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **روح اله درستکار ساری** رشته: **ویروس شناسی** گرایش:
تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

سرکار خانم دکتر طراوت بامداد (استاد راهنما)

جناب آقای مسعود پارسانیا (استاد مشاور)

سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی (نماینده تحصیلات‌تکمیلی)

سرکار خانم دکتر حوریه سلیمانجاهی (استادناظر)

سرکار خانم دکتر معصومه توسطی خیری (استادناظر)

آئین نامه پایان نامه (رساله)هاي دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه .چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)هـای تحصـیلی دانشـجویان دانشـگاه تربیـت مـدرس، مبـین بخشـی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقـوق دانشـگاه، دانـش آموختگـان ایـن دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر" دفتر نشـر آثـار علمـی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) ، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتـری نگارنـده در رشـته مدیریت بازرگانی است کـه در سـال ۱۳۷۹ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر کاوه، مشـاوره دکتر کیانی از آن دفاع شده است."

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یـک درصـد شـمارگان کتـاب (در هـر نوبـت چاپ) را به" دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معـرض فروش قرار دهد.

ماده ٤: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مـدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسـارت، دانشـگاه مـی توانـد خسـارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهـد بـه منظـور اسـتیفای حقـوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب دانشجوی رشته مدیریت بازرگانی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی
تاریخ و امضا
۱۳۸۱/۱۰/۱۱

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگي .
تاریخ و امضاء

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

که دعای خیرشان را

همیشه در کنار خویش احساس می کنم.

سپاسگذاری

شکر و سپاس فراوان از خداوند متعال که در پرتو لطف و رحمتش، ابتدا لیاقت خلق شدن را به این حقیر عنایت فرمود، و در ادامه توفیق کسب علم را به بنده ارزانی داشت.

شایسته است که در آغاز از زحمات فراوان استاد راهنمای گرامی، سرکار خانم دکتر طراوت بامداد که هدایت و راهنمایی این پایان نامه را پذیرفته و همواره با شکیبایی مرا در تمامی مراحل انجام این پایان نامه یاری رساندند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از جناب آقای دکتر پارسانیا، مشاور گرانقدر که در تمام مراحل این پایان نامه از مساعدت ها و راهنمایی های ایشان بهره بردم

سرکار خانم دکتر صباحی، مدیریت محترم گروه ویروس شناسی، که مشتاقانه در تمام مراحل این دوره تحصیلی مرا مورد حمایت و لطف خویش قرار دادند

سرکار خانم دکتر سلیمان جاهی که از ارائه هیچ کمکی از آغاز تا پایان این پژوهش، به اینجانب دریغ ننمودند

جناب آقای دکتر روانشاد استاد گرامیم

جناب آقای دکتر حسن مدیر محترم گروه ایمنی شناسی

جناب آقای میر سعید کارشناس محترم گروه ویروس شناسی

و از دوستان خوبم بویژه آقای پوریای ولی، جمالی، خوانساری نژاد، تیموری، شناگری، قنبری و سایر دوستان و عزیزانی که به نوعی مرا در انجام این پژوهش یاری رسانده اند سپاسگذاری و تشکر می نمایم.

چکیده

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) Herpes simplex virus type 1 از جمله ویروسهای شایع در جمعیت های انسانی می باشد که انسان تنها مخزن آن بشمار می رود. این ویروس می‌تواند طیف وسیعی از بیماریها، شامل عفونتهای ناحیه صورت و دهان و عفونت ژنیتال را ایجاد نماید.

مطالعات کلینیکی منتشر شده این مسئله را نشان داده‌اند که درمان‌های ضد ویروسی بر روی نهفتگی و عفونتهای راجعه بعدی ویروس بی تاثیر می‌باشند.

تاکنون تحقیقات متعددی در مورد بهره‌گیری از پلاسمیدها به عنوان ناقل ژنهای کد کننده گلیکوپروتئینهای ایمن‌زا، از ویروس هرپس سیمپلکس انجام گرفته است، که یک نمونه از این نوع واکسن ها، واکسن DNA بیان کننده ژن گلیکوپروتئین B (gB) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک می باشد.

این گلیکوپروتئین یک پروتئین ایمنوژن مهم است که پاسخهای سلولی و هومورال را تحریک می‌کند، بطوری‌که منجر به تولید آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده و القاء لنفوسیتهای T کمکی و T سیتوتوکسیک می‌گردد.

استفاده از واکسنهای DNA جدیدترین شیوه‌ای است که برای واکسیناسیون ارائه شده است. تلقیح پلاسمید حاوی cDNA مربوط به آنتی‌ژن پروتئینی قادر است که پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی طولانی مدتی را برانگیزد.

استراتژیهای مختلفی در جهت افزایش قدرت ایمنی زایی واکسن ها از جمله واکسنهای DNA ارائه شده است. در سالهای اخیر استفاده از دو روش القاء آپوپتوزیس و نکروزیس جهت ایمونوژنسیتی بهتر واکسنها مورد توجه قرار گرفته است.

تحقیقات سالهای اخیر نشان داده هرگاه سلول های دندریتیک (یکی از مهترین سلولهای عرضه‌کننده آنتی-ژن) در معرض سلولهای نکروز شده توموری و یا سوپرناتانت (Supernatant) حاصل از لایزت آنها قرار گیرند، قدرت عرضه کنندگی آنتی ژن توسط سلول‌های دندریتیک به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. این موضوع سبب شده تا استفاده از نکروز و یا سوپرناتانت آن به عنوان یک افزایش دهنده قدرت انواع واکسن ها مورد توجه محققین قرار گیرد.

با توجه به مطالب فوق و نیاز به وجود واکسن موثر و بی‌خطر برای پیشگیری و احتمالا درمان عفونت‌های ناشی از ویروس‌ها و از آنجا که HSV-1 یک مدل مناسب در تحقیقات واکسنهای ویروسی می‌باشد در این پژوهش، ما اقدام به بررسی اثر سوپرناتانت فیلتره از نکروز سلول های EL4 در کارایی واکسن DNA واجد ژن بیان کننده gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در موش‌های C57BL/6 نمودیم. با توجه به این موضوع که ثابت شده زمان تزریق ادجوانت نسبت به واکسن DNA می تواند در هدایت سیستم ایمنی به ایجاد پاسخ سلولی و هومورال موثر باشد، طی این مطالعه سوپرناتانت فیلتر شده سلول نکروزی به سه صورت ٢٤ ساعت قبل، ٢٤ ساعت بعد و بطور همزمان با واکسن DNA حاوی ژن gB به گروههای مورد نظر تزریق گردید. تزریق ها در سه نوبت و با فاصله ١٤ روز انجام شد و ٥ روز پس از تزریق آخر، فعالیت سلول های +CD8 و میزان تولید INFγ و IL4 بررسی گردید.

نتایج حاصله بین گروه دریافت کننده واکسن DNA و ادجوانت مذکور با گروه های کنترل تفاوت معنی داری را نشان دادند که حاکی از افزایش قدرت واکسن توسط سوپرناتانت سلول نکروز شده EL4 می باشد.

واژگان کلیدی: واکسن DNA gB-1، هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ١، نکروز و فلوسایتومتری.

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ——— ۱

فصل دوم: کلیات و مروری بر مطالعات گذشته

۲-۱ ویروس هرپس سیمپلکس ——— ۵

۲-۱-۲. ساختار و نحوه عملکرد ویروس ——— ۶

۲-۱-۳. ساختمان gB ——— ۶

۲-۱-۴. بیماری ——— ۷

۲-۱-۵. درمان ——— ۸

۲-۲. واکسیناسیون ——— ۸

۲-۲-۱. ايمونوبيولوژي واکسنهاي پيشگيري کننده و درماني ——— ۹

۲-۲-۲.واکسنهاي ويريوني غير فعال ——— ۱۱

۲-۲-۳.واکسنهاي زير واحدي ——— ۱۲

۲-۲-۴. ويروسهاي زنده تضعيف شده ژنتيکي ——— ۱۳

۲-۲-۵. واکسنهاي داراي ويروسهاي جهش يافته داراي تکثير محدود و يا ——— ۱۴

۲-۲-۶. واکسنهاي واجد وکتورهاي زنده بيان کننده آنتي ژنهاي ويروس هرپس سيمپلکس ——— ۱۵

۲-۲-۷. واکسن‌هاي DNA ——— ۱۵

۲-۳ سيستم ايمني ——— ۱۹

۲-۳-۱. سلولهای دندریتیک ——— ۱۹

۲-۳-۲. اهميت بالغ شدن مناسب سلولهای دندريتيک ——— ۲۱

۲-۴. نقش نکروز سلولی و سوپرناتانت آنها بر بلوغ DCها ——— ۲۲

۲-۵. فلوسایتومتری ——— ۲۴

۲-۵-۱. کلیات دستگاه فلوسایتومتری ——— ۲۵

۲-۵-۱-۱ منبع نوری ——— ۲۵

عنوان صفحه

۲-۵-۱-۲ محفظه نمونه ۲۵

۲-۵-۱-۳ آشکارسازها ۲۵

۲-۵-۱-۴ سیستم کامپیوتری ۲۷

۲-۵-۲ کاربردهای فلوسایتومتری ۲۹

۲-۵-۳ استفاده از روش فلوسایتومتری بر پایه دو رنگ ۳۱

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ وسایل و دستگاههاي عمومي مورد نياز ۳۳

۳-۲ محيطهاي كشت باكتري ۳۵

۳-۳ محلولها و بافرهاي مورد نياز ۳۵

۳-۴ محلولهاي مورد نياز براي استخراج DNA به روش ليزقلياني ۳۶

۳-۵ طرز تهيه آنتي بيوتيك آمپي سيلين ۳۸

۳-۶ پلاسميده مورد استفاده در اين پژوهش ۳۸

۳-۷ سوشهاي باكتريايي ۴۰

۳-۷-۱ كشت مايع باكتري ۴۰

۳-۷-۲ كشت باكتري بر سطح جامد ۴۰

۳-۷-۳ نگهداري باكتري در حالت انجماد ۴۰

۳-۷-۴ تهيه سلولهاي مستعد باكتري ۴۱

۳-۷-۵ ترانسفورم كردن باكتري ۴۲

۳-۷-۶ گزينش باكتري ترانسفورم شده ۴۲

۳-۸ استخراج پلاسميد در مقياس كم ۴۲

۳-۹ الكتروفورز در ژل آگاروز ۴۳

۳-۱۰ استخراج پلاسميد در مقياس انبوه با روش ليز قلياي ۴۵

۳-۱۱ تعيين غلظت DNA ۴۶

۳-۱۲ كشت سلول ۴۷

عنوان صفحه

۳-۱۲-۱ وسایل آزمایشگاهي مورد نیاز براي کشت سلول ۴۷

۳-۱۲-۲ مواد مورد نیاز براي کشت سلول ۴۹

۳-۱۲-۳ آماده کردن محیطهاي کشت سلول ۴۹

۳-۱۲-۴ تهیه محیط کشت ۵۰

۳-۱۲-۵ افزودن آنتي بیوتیکها ۵۰

۳-۱۲-۶ استریل کردن محیط کشت یاخته ۵۰

۳-۱۲-۷ آماده سازي و افزودن سرم ۵۱

۳-۱۲-۸ روش تهیه PBS بدون کلیسم و منیزیم ۵۱

۳-۱۲-۹ محلول تریپسین - ورسن ۵۲

۳-۱۲-۱۰ نگهداري سلول ها ۵۳

۳-۱۲-۱۱ پاساژ سلول ۵۳

۳-۱۲-۱۲ منشاء سلول هاي مورد استفاده ۵۴

۳-۱۲-۱۳ تهیه کشت سلولي Vero ۵۵

۳-۱۲-۱۴ کشت سلولهای EL4 ۵۶

۳-۱۲-۱۵. القاء نکروز و جداکردن سوپرناتانت سلولهای نکروزی سلول EL4 ۵۶

۳-۱۳ تکثیر ویروسHSV-1 سویه KOS. در سلول Vero ۵۷

۳-۱۴ تعیین عیار ویروس به روش TCID50 ۵۸

۳-۱۵-۱ موش‌هاي C57BL/6 ۶۰

۳-۱۵-۲ تزریق به موش‌هاي C57BL/6 ۶۱

۳-۱۶-۱ برداشت طحال موش به منظور جداسازي و کشت ۶۳

۳-۱۶-۲ استخراج سلول های طحالی ۶۳

۳-۱۷ اندازه گیري قدرت ایمنی با استفاده از فلوسایتومتری ۶۶

۳-۱۷-۱. آلوده سازی کردن سلولهای هدف (EL4) با ویروس ۶۶

۳-۱۷-۲. مجاور نمودن سلولهای عامل و هدف ۶۶

عنوان صفحه

۳-۱۷-۳. مراحل آزمایش ---- ۶۷

۳-۱۷-۴. روش رنگ آمیزی با AADV و Annexin-FITC ---- ۶۷

۳-۱۷-۴-۱.روش کار ---- ۶۸

۳-۱۷-۵. خواندن نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتری ---- ۶۹

۳-۱۸. بررسی اینتر فرون گاما (INF-γ) و اینترلوکین ۴ (IL-4) بروش ELISA ---- ۶۹

۳-۱۸-۱. تحریک مجدد لنفوسیتها در شرایط آزمایشگاه ---- ۷۰

۳-۱۹. تست MTT ---- ۷۰

۳-۱۹-۱ روش انجام تست MTT ---- ۷۱

فصل چهارم: نتایج

۴-۱. نتایج حاصل از انتقال پلاسمید pcgB به درون باکتری ---- ۷۳

۴-۱-۲. استخراج و هضم آنزیمی pcgB ---- ۷۴

۴-۱-۳. استخراج پلاسمید در مقیاس انبوه ---- ۷۴

۴-۱-۴. نتایج حاصل از تعیین درجه خلوص پلاسمید ---- ۷۴

۴-۲. نتیجه حاصل از کشت سلول Vero ---- ۷۵

۴-۲-۱. نتیجه حاصل از تکثیر HSV-1 و سویه KOS در کشت سلولی Vero ---- ۷۵

۴-۳. تعیین عیار عفونت زایی ویروس (TCID50) ---- ۷۵

۴-۴. نتایج حاصل از فلوسایتومتری ---- ۷۸

۴-۵. نتایج حاصل از ارزیابی IL-4 و INFγ در کشت ---- ۸۲

۴-۶. نتایج حاصل از ارزیابی MTT ---- ۸۷

فصل چهارم بحث و جمع بندی ---- ۹۱

منابع ---- ۱۰۳

فصل اول

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) Herpes simplex virus type 1 از اعضا خانواده هرپس ویریده می‌باشد که طیف وسیعی از جانداران را آلوده می‌کند. کپسید ویروس ساختار ایکوساهیدرال دارد و توسط تگومنت و پوشینه احاطه شده است و از جمله ویروسهای شایع در جمعیت های انسانی می باشد و انسان تنها مخزن آن بشمار می رود. HSV-1 در اثر تماس مستقیم از یک شخص به شخص دیگر منتقل شده و عامل بسیاری از ضایعات مخاطی در ناحیه دهان، بینی و پوست و ایجاد عفونتهای شدید و منتشر، کراتیت و آنسفالیت در کودکان و همچنین افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند می باشد. عفونت اولیه با این ویروس معمولاً در سنین کودکی رخ می دهد و به طور کلی اکثر افراد تا سن بلوغ با این ویروس آلوده خواهند شد. از ویژگی مهم این ویروس، نهفتگی و ایجاد عفونت پایدار در بدن می باشد. پس از ایجاد عفونت اولیه، ویروس در گانگلیون تری ژرمینال[1] به صورت نهفته در می آید و سپس در اثر عوامل مختلف

[1] - Trigeminal

مثل تب، سرما، فشارهای عصبی و غیره فعال شده و از طریق اعصاب مجدداً خود را به سطح اپیتلیال رسانده و ایجاد عفونت راجعه می کند. شدت و نیز مدت زمان عفونت اولیه با ویروس را می توان با استفاده از داروهای ضد ویروسی کاهش داد اما داروهای ضد ویروسی نتنها هیچ تاثیری در برقراری عفونت نهفته توسط HSV-1 را ندارد، بلکه تاثیری بر کاهش دفعات عود مجدد ویروس را نیز ندارند[۱]، به همین جهت ساخت واکسنی که پیشگیری کننده باشد ضرورت پیدا می کند.
علیرغم تلاشهای زیاد محققین ،هنوز هیچ واکسن موثریکه بتواند ایمنی محافظت کننده در مقابل عفونتهای هرپس تیپ ۱ ایجاد نماید، تولید نشده است[٦،٥].

مطالعات نشان داده است که برای مقابله با عفونت HSV، فعال شدن سیستم ایمنی هومورال و سلولی نیاز می باشد. چون در طی عفونت آنتی بادیهای خنثی کننده فقط قادر به غیر فعال کردن پارتیکلهای ویروسی آزاد هستند و.قدرت مهار عوامل عفونتزای داخل سلولی را ندارند، لذا تحریک ایمنی سلولی هدف اصلی کنترل عفونتهای HSV می باشد[۷]. علاوه بر کنترل عفونت در سطوح مخاطی، واکسن باید بتواند از همانند سازی فعال ویروس جلوگیری نماید و باعث کاهش عیار عفونی ویروس و پیرو آن ، تعدیل عفونتهای اولیه و کاهش عودهای مکرر بدون علائم را ممکن سازد[۸].

واکسنهایی که تا بحال در مورد ویروس هرپس سیمپلکس تهیه شده است شامل واکسنهای متشکل از ویریونهای غیر فعال شده، واکسنهای ساب یونیت، واکسنهای متشکل از ویروسهای تخفیف حدت یافته ژنتیکی، واکسنهای متشکل از وکتورهای زنده بیان کننده ژنهای ویروس و واکسنهای DNA می باشند.

مطالعات مختلفی در این خصوص با استفاده از ژنهای کد کننده گلیکوپروتئینهای مختلف ویروس هرپس سیمپلکس، انجام شده است که با راه اندازی پاسخهای سلولی و هومورال توانسته اند حیوانات ایمونیزه شده را در هنگام مواجهه با ویروس وحشی محافظت کنند[۱۲،۱۱]. مطالعات مختلف نشان می دهد که دو گلیکوپروتئین B و D ویروس هرپس سیمپلکس از جمله اهداف اصلی سیستم ایمنی هومورال و سلولی می باشند و به همین جهت انتخاب مناسبی برای واکسنهای DNA و یا واکسنهای ساب یونیت می باشند

[۱۳،۱٤]. برای تولید واکسنهای اسید نوکلئیکی نیاز به قطعه ژنومی است که حاوی بیشترین شاخصهای آنتی ژنیک در سطح خود باشدو به عنوان هدف سیستم ایمنی بدن میزبان محسوب گردد.

گلیکوپروتئین B (gB) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، یکی از حفاظت شده ترین پروتئینهای این ویروس می باشد و نقش مهمی در عفونت زایی ویروس دارد، این گلیکوپروتئین یک پروتئین ایمونوژن مهم است که پاسخهای سلولی وهومورال را تحریک می کند، بطوری که منجر به تولید آنتی بادیهای خنثی کننده و القاء سلولهای T کمکی و سلولهای T سیتوتوکسیک می گردد[۱٦،۱۵].

در تحقیقات مشخص شده است که gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، آنتی ژن عمده مورد هدف سلولهای T سیتوتوکسیک در بیشتر موارد می باشد و اسید آمینه های ٤۹۸ تا ۵۰۵ این پروتئین یکی از اپی توپهای ایمونودامینانت آن به شمار می رود، بطوری که تا حدود ۹۰٪ از سلولهای +CD8 اختصاصی HSV-1 که از موشهای C57BL/6 بدست آمده است، برای این شاخص آنتی ژنیک دارای اختصاصیت می باشند [۱۸،۱۷]. ایمن زایی با بهره گیری از واکسنهای DNA می تواند منجر به راه اندازی پاسخ ایمنی سلولی و گردد، همچنین از مزایای دیگر این نوع واکسنها می توان به کم خطری، پتانسیل ایمن زایی قوی، عدم ایجاد عفونت نهفته در انسان و امکان تولید سریع و ارزان آنها اشاره کرد[۱۰،۹]. با توجه به مکانیسم عملکردی واکسنهای DNA به نظر می رسد که یکی از مهمترین راهکارها برای افزایش ایمنی زایی این واکسنها تحریک مهاجرت سلول های شروع کننده آغاز کننده پاسخ ایمنی و کمک در ارائه بهتر آنتی ژن به سلول های T باشد.

سلول های دندریتیک از جمله سلول های ایمنی می باشند که نقش موثری در راه اندازی پاسخ ایمنی و در نتیجه قدرت محافظتی واکسن ها بعهده دارند.

راههای مختلفی برای جذب و القاء بلوغ سلول های دندریتیک وجود دارد که از بین آنها میتوان از CpG متیله نشده، LPS، اجزاء باکتریها و ویروسها و... نام برد، که اغلب آنها به علت خطرات احتمالی، برای انسان کاربرد ندارد[۲۰،۲۱،۲۲].

و اما در سال‌های اخیر دو روش القاء آپوپتوزیس و نکروزی جهت افزایش قدرت عرضه‌کنندگی سلول های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و ایمونوژنسیتی بهتر واکسن ها مورد توجه قرار گرفته است[۲۳،۲٤،۲۵،۲٦].

مطالعات نشان داده که سلول های دندریتیک وقتی در معرض سلولهای توموری نکروز شده و یا سوپرناتانت فیلتر شده این سلولها قرار می‌گیرند، علاوه برآنکه بخوبی بالغ شده و به یک عرضه کننده آنتی ژن قدرتمند به لنفوسیتهای +TCD4 تبدیل می‌شوند، همچنین مجاورت با سلولهای توموری نکروز شده و یا سوپرناتانت فیلتر شده این سلولها سبب افزایش قدرت عرضه کنندگی آنتی ژن توسط سلول های دندریتیک به سلولهای +TCD8 نیز می گردد[۲۷،۲٤]. همچنین در مطالعات اثر زمان بندی ادجوانت ها نسبت به واکسن های DNA در نوع پاسخ ایمنی ایجاد شده (سلولی و یا هومورال) نشان داده شده است.

با توجه به مطالب فوق و نیاز به وجود واکسن موثر و بی‌خطر برای پیشگیری و احتمالا درمان عفونت‌های ناشی از ویروس‌ها و از آنجا که HSV-1 یک مدل مناسب در تحقیقات واکسنهای ویروسی می‌باشد و از طرفی با توجه به اینکه ایجاد نکروز مطلق(بدون ایجاد آپوپتوز) در محیط بدن موجود زنده[1] امری مشکل و تهاجمی (Aggressive) است، تصمیم گرفته شد تا پلاسمید بیان کننده ژن گلیکوپروتئین B ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک را به همراه سوپرناتانت سلولهای نکروز شده EL4 ، در فواصل زمانی مختلف به موش‌های C57BL/6 تلقیح شود و میزان قدرت ایمنی زایی این گروه را نسبت به گروه کنترل مورد بررسی قرار گیرد.

[1] - Invivo

فصل دوم

کلیات و مروی بر مطالعات گذشته

۲-۱. ویروس هرپس سیمپلکس

هرپس سیمپلکس ویروس (HSV'S) اولین هرپس ویروس های انسانی بودند که شناسایی شدند و از جمله ویروس هایی هستند که مطالعات گسترده ای روی آنها صورت گرفته است[۱]. این ویروس ها عضوی از خانواده هرپس ویریده می باشند.

اعضای این خانواده ویروسی به سه زیر خانواده آلفا، بتا و گاما تقسیم بندی می شوند.

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، در دسته آلفا ویروسها جای می گیرد. آلفا هرپس ویروسها به سرعت تکثیر شده و ویروسهای سایتولیتیکی هستند که باعث تشکیل عفونتهای مخفی در نرونها می گردند[۱].

۲-۱-۲. ساختار و نحوه عملکرد ویروس

ژنوم ویروس که یک DNA دورشته ای خطی است، در درون یک کپسید ایکوزاهدرال با ۱۶۲ کپسومر قرار گرفته است و نوکلئوکپسید توسط یک ماده بی شکل به نام تگومنت احاطه می گردد[۱].

بر روی تگومنت انولوپ قرار دارد که دوازده گلیکوپروتئین مختلف (B-N) در آن شناسایی شده است.

ژنوم ویروس حداقل ۸٤ نوع پلی پپتید مختلف را رمز دهی می کند که تعدادی از این پروتئین ها مسئول چندین عمل مختلف برای ویروس می باشند[۱]. از میان این پروتئین ها، تعدادی در چرخه تکثیر ویروس نقش مهمتری دارند. لذا از اهداف ضدویروسی از جمله واکسیناسیون به شمار می روند که مهمترین آنها گلیکوپروتئین های سطح انولوپ خصوصا گلیکوپروتئین های D و B (gB,gD) می باشند.

ویروس توسط تعدادی از گلیکوپروتئین های خود به گیرنده های سطح سلول متصل شده و با ادغام انولپ با غشای یاخته، به آن وارد می شود و به طرف هسته حرکت می نماید.

DNA ویروس از طریق منافذ هسته به درون هسته وارد شده و در طی سه مرحله نسخه برداری که به فوری(α)، اولیه(β) و تاخیری (γ) معروف هستند، پروتئین های ویروس را رمزدهی می نمایند.

۲-۱-۳. ساختمان gB

گلیکوپروتئین B، محصول UL27 ژنوم HSV می باشد. gB از نظر توالی یکی از پروتئین های حفاظت شده ویروس محسوب می شود.

این پروتئین در HSV-2 و ویروس های اپشتین- بار، واریسلا زوستر و سیتومگال انسانی نیز با درصد همولوژی بالا وجود دارد. gB پروتئینی است درون غشایی با ۹۰٤ اسیدآمینه که ۲۹-۳۰ اسیدآمینه ابتدایی آن که توالی علامتی می باشد، پس از رسیدن پروتئین به سطح غشاء از آن جدا می شود.

٦۹٦ اسیدآمینه از انتهای آمینی gB بخش آب دوست خارج سیتوپلاسمی، ٦۹ اسیدآمینه بخش درون غشایی و ۱۰۹ اسیدآمینه بقیه، بخش داخل سیتوپلاسمی پروتئین را تشکیل می دهند. gB واجد شش محل N گلیکوزیلاسیون می باشد. شکل بالغ gB در سطح غشاء به صورت دیمر است که توسط پنج باند دی سولفید به یکدیگر متصل شده اند. وزن مولکولی این گلیکوپروتئین معادل ۱۰۳ دالتون می باشد[۲].

۲-۱-٤. بیماری

عفونتهای ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس ها به دو صورت اولیه و یا بصورت عودکننده مطرح می شوند. عفونت اولیه HSV معمولا بدون علامت بالینی اند، اما در صورت بروز علائم، شدیدتر از عفونتهای عودکننده ظاهر می شوند[۱]. HSV-1 می تواند سبب بیماری گلو و دهان، بیماری تناسلی، عفونتهای نوزادی، کراتیت هرپسی، عفونتهای پوستی و عفونت سیستم عصبی مرکزی گردد.

افرادیکه با سیستم ایمنی کارآمد بدون نقص در معرض HSV قرار می‌گیرند در واقع مراحل بی‌خطر عفونت اولیه و راجعه را تجربه می‌کنند. اما در افراد با نقص ایمنی الگوهای گسترش عفونت کاملاً متفاوت است. خطر عفونت غیر لیتیک HSV در طی حاملگی، عفونت زوستری شکل HSV در گیرندگان پیوند عضو، پنومونیهای HSV و پیچیدگیهای دیگر در بیماران ایدزی افزایش می‌یابد. انسفالیت تک گیر HSV همراه با