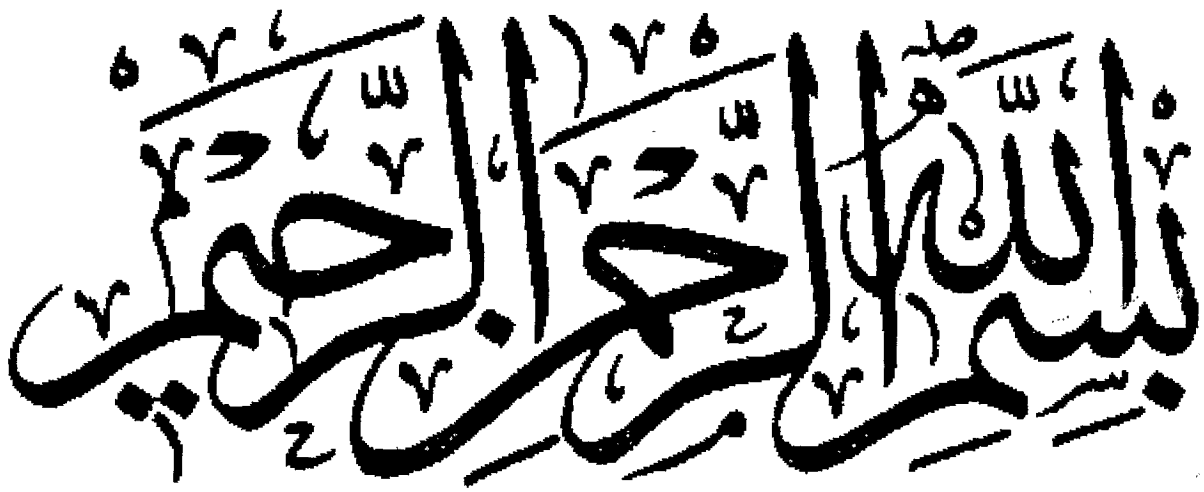
٤٥٢٠



١١٤٧٤٩

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه :

ارزیابی پاسخ ایمنی علیه ویروس HSV-1 با استفاده از نانووکتور فاژ رشته ای حاوی ژن گلیکوپروتئین gD در موش BALB/c

نگارش :

حمیدرضا هاشمی

استاد راهنما :

سرکار خانم دکتر طراوت بامداد

مشاور:

عباس جمالی

پاییز ۱۳۸۷

۱۳۸۸/۴/۱

۱۱۴۷۳۶

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای حمید رضا هاشمی 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:

دکترطراوت بامداد (استاد راهنما)

آقای عباس جمالی (استاد مشاور)

دکتر طلعت مختاری آزاد (استاد ناظر)

دکتر حوریه سلیمانجاهی (استاد ناظر)

دکتر فرزانه صباحی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

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

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این 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 نشر آثار علمی" 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 دکتری نگارنده در رشته ..... است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ..... و مشاوره ..... از آن دفاع شده است."

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

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

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق 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 ..... مقطع ..... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی

تاریخ و امضا

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 خانوادگی .
تاریخ و امضاء ۸۷/۱۱/۱۲

تقدیم به

خواهرم زهرا ،

او که لبریز از

محبت ، پاکی و دلسوزی بود .

تقدیر و تشکر

خداوند حکیم را سپاس می گویم که در سایه امید به او توفیق و توانایی انجام این تحقیق هر چند کوچک و ناچیز را یافتم و امیدوارم گامی کوچک در جهت پیشرفت علم ویروس شناسی برداشته باشم .

بیش از هر چیز خود را مدیون زحمات بی دریغ استاد راهنمای گرامی سرکار خانم دکتر طراوت بامداد که در طول پایان نامه از همکاری و راهنمایی های خردمندانه ایشان بهره مند شدم می دانم .

شایسته است از مشاور و دوست عزیزم آقای دکتر عباس جمالی که در طول انجام این تحقیق با آموزش های خویش روشنگر راه بنده بودند قدردانی کنم .

لازم می دانم از آقای دکتر Erik Wiersma که فاژ کمکی M13Ko7 را به عنوان هدیه ای ارزشمند از کانادا برای اینجانب ارسال کردند تشکر و قدردانی کنم و امیدوارم در آینده شایستگی تحقیق در جوار ایشان را داشته باشم . همچنین از سرکار خانم دکتر سلیمانجاهی که پلاسمید pcDNA3-gD را در اختیار بنده قرار دادند سپاسگذاری می کنم .

همچنین از همکاری صادقانه و صمیمانه خانم ها سمیه پویان فرد و معصومه گرگیان محمدی که با صبر و بردباری خویش در انجام این تحقیق مرا یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم .

از برادر بزرگوارم جناب آقای دکتر آل بویه که در رویارویی با مشکلات کار از هیچ کمکی در مورد اینجانب دریغ نکردند از صمیم قلب سپاسگذار بوده و امیدوارم بتوانم گوشه ای از لطف ایشان را جبران کنم .

همچنین بر خود واجب می دانم از استاد محترم سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی مدیر محترم گروه ویروس شناسی که در طول انجام این تحقیق با رویی گشاده از اینجانب استقبال کردند قدردانی کنم .

چکیده

باکتریوفاژها اولین بار یک دهه پیش از کشف پنی سیلین با موفقیت برای درمان عفونت های باکتریایی به کار رفتند . ولی این موفقیت ها کوتاه بوده و به دلیل عدم اطلاع کافی از بیولوژی فاژها در آن زمان با شکست مواجه شدند . امروزه به دلیل شناخت بیشتر از بیولوژی مولکولی فاژها و نیز ظهور باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ،دوباره دانشمندان به استفاده از فاژها برای درمان عفونت های باکتریایی روی آورده اند . همچنین یک تجربه ۸۰ ساله از استفاده بالینی فاژها در کشورهای شوروی سابق و شرق اروپا وجود دارد و این پشتیبان خوبی برای بی خطر بودن استفاده بالینی آن ها در انسان است . از مزایای فاژها که باعث توجه به آن ها به عنوان ابزارهای انتقال ژن شده است می توان به دستکاری ژنتیکی آسان، تولید آسان و انبوه با هزینه کم و نیز پایداری آن ها در مقابل شرایط بد محیطی نظیر خشکی و دما اشاره کرد . اخیرا نشان داده شده است که ذرات فاژ لامبدا که حاوی ژن HBsAg تحت کنترل پروموتر CMV هستند، پس از تزریق داخل عضلانی به موش و خرگوش باعث تحریک تولید آنتی بادی علیه این آنتی ژن می شوند . هر دو مکانیسم فاگوسیتوز و ماکروپینوسیتوز را در جذب فاژها پس از تلقیح به میزبان دخیل می دانند. دراین پژوهش ابتدا فاژمید pcDNA3-gD به کمک فاژ کمکی M13KO7 به صورت پارتیکل های فاژی package شده و پس از تیتراسیون به موش هایBALB/c تزریق شد . سعی بر این بوده است که از نانوپارتیکل های فاژهای رشته ای برای اولین بار به عنوان واکسن بر علیه HSV-1 استفاده شود و به دنبال تزریق به موش های BALB/c هر دو بازوی ایمنی هومورال و سلولی ارزیابی شوند . به علاوه مقایسه ای با ایمنی زایی حاصل از تزریق واکسنDNA مربوطه صورت گرفت . بدین منظور پارتیکل های فاژی حاصل از pcDNA3-gD با سه تیتر مختلف به موش ها به شکل داخل جلدی تزریق شده و ایمنی زایی آن ها با واکسن پلاسمیدی مقایسه گردید . همچنین دو گروه موش به عنوان شاهد پلاسمید و پارتیکل های فاژی pcDNA3 را دریافت کردند .پس از سه تزریق داخل جلدی به موش ها ایمنی هومورال و سلولی به ترتیب با تست های خنثی سازی ویروس و CTL assay مورد ارزیابی قرار گرفت . نتایج نشان داد که فاژهای رشته ای در تحریک پاسخ ایمنی هومورال موثرتر از ایمنی سلولی هستند . به علاوه یک حالت دوز-پاسخ درتزریق دوزهای مختلف واکسن فاژی مشاهده گردید . با این حال مطالعات بیشتری لازم است تا مکانیسم جذب فاژها به درون سلول و به دنبال آن بیان ژن ها مشخص گردد .

واژگان کلیدی : واکسن DNA، واکسن فاژی، فاژمید، فاژ کمکیM13KO7 ، فاژهای رشته ای، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ۱

فهرست مطالب

صفحه عنوان

فصل اول : مقدمه ۱

فصل دوم :کلیات و مروری بر مطالعات گذشته ۷

۲-۱ طبقه بندی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک ۷

۲-۲ ساختار ویروس ۷

۲-۳ پروتئین های ویروس ۷

۲-۳-۱ ویژگی گلیکوپروتئین D(gD) ۸

۲-۳-۲ ویژگی سایر گلیکوپروتئین های ویروس ۸

۲-۴ چرخه تکثیر ویروس ۹

۲-۵ نهفتگی ویروس ۱۰

۲-۶ بیماریزایی ۱۰

۲-۷ اپیدمیولوژی ۱۱

۲-۸ تشخیص آزمایشگاهی ۱۲

۲-۹ پاسخ ایمنی میزبان در عفونت های ناشی از HSV ۱۳

۲-۱۰ کنترل عفونت های HSV ۱۵

۲-۱۰-۱ پیشگیری ۱۵

۲-۱۰-۲ درمان ۱۵

۲-۱۰-۳ واکسیناسیون ۱۶
۲-۱۰-۳-۱ واکسن های ویریون غیرفعال شده ۱۷
۲-۱۰-۳-۲ واکسن های ساب یونیت ۱۷
۲-۱۰-۳-۳ واکسن های ژنتیکی تخفیف حدت یافته ۱۸
۲-۱۰-۳-۴ واکسن های مشتق از وکتورهای زنده بیان کننده ژن های ویروسی ۱۹
۲-۱۰-۳-۵ واکسن های DNA ۲۰
۲-۱۱ اصول واکسن های DNA ۲۱
۲-۱۱-۱ مزایای واکسن های DNA ۲۲
۲-۱۱-۲ معایب واکسن های DNA ۲۳
۲-۱۱-۳ مکانیسم های القا پاسخ های ایمنی در واکسن های DNA ۲۴
۲-۱۲ روش های افزایش کارایی واکسن های DNA ۲۶
۲-۱۲-۱ استفاده از روش هایی که منجر به بیان بیشتر آنتی ژن می گردد ۲۶
۲-۱۲-۲ سیستم های تحویل دهنده ۲۷
۲-۱۲-۳ استفاده از روش هایی که منجر به افزایش ایمونوژنیسیته واکسن های DNA می شوند ۲۹
۲-۱۲-۳-۱ استفاده از پروتئین های ادغام شده ۳۰
۲-۱۲-۳-۲ اضافه نمودن مولکول های محرک سیستم ایمنی ۳۰
۲-۱۰-۳-۶ واکسن های فاژی ۳۰
۱- بیان آنتی ژن به دنبال واکسیناسیون با فاژها ۳۳
۲- مزایای استفاده از حامل های فاژی برای واکسن های DNA ۳۴

۳- خاصیت ادجوانتی فاژها ۳۵
۴- ساختار و بیولوژی فاژهای رشته ای ۳۵
۵- چرخه تکثیر فاژ M13 ..... ۳۷
۶- اثرات تکثیر فاژ M13 بر روی سلول های باکتری ۳۷
۷- وکتورهای فاژM13 ..... ۳۷
۸- ویژگی های فاژ کمکی M13KO7 ..... ۳۸
۹- مزایای استفاده از وکتورهای فاژ رشته ای به عنوان حامل واکسن DNA ۳۹
فصل سوم : مواد و روش ها ۴۰
۳-۱ وسایل و دستگاه های عمومی موردنیاز برای تکثیر فاژ کمکی M13KO7 و تخلیص آن ۴۱
۳-۲ محیط های کشت باکتری ۴۲
۳-۳ محلول ها و بافرهای مورد نیاز ۴۴
۳-۴ محلول های مورد نیاز برای استخراج DNA به روش لیز قلیایی ۴۵
۳-۵ طرز تهیه آنتی بیوتیک آمپی سیلین ۴۷
۳-۶ طرز تهیه آنتی بیوتیک کانامایسین ۴۷
۳-۷ تهیه محلول PEG-NaCl به منظور رسوب دادن فاژها از سوپرناتانت کشت باکتری ۴۸
۳-۸ پلاسمیدها و فاژهای مورد استفاده در این پژوهش ۴۸
۳-۹ مراحل لازم برای تکثیر و تخلیص فاژ کمکی M13KO7 ..... ۵۰
۳-۹-۱ کشت باکتری بر روی محیط حداقل M9 ..... ۵۰
۳-۹-۲ تکثیر فاژ کمکی M13KO7 ..... ۵۰

۳-۹-۳ تهیه رقت های لگاریتمی از فاژ کمکیM13KO7 ..... ۵۱
۳-۹-۴ تخلیص فاژ کمکی M13KO7 به روش Plaque Purification ۵۱
۳-۹-۵ تکثیر انبوه فاژ کمکی M13KO7 ..... ۵۳
۳-۱۰مراحل لازم برای تولید پارتیکل های فاژی از فاژمیدهای pcDNA3و pcDNA3-gD ۵۳
۳-۱۰-۱تهیه سلول مستعد باکتری ۵۳
۳-۱۰-۲ ترانسفورم کردن باکتری یا انتقال پلاسمید به درون سلول باکتری ۵۵
۳-۱۰-۳ تولید پازتیکل های فاژی از فاژمیدهای pcDNA3 وpcDNA3-gD ۵۵
۳-۱۰-۴ استخراج پلاسمید در مقیاس انبوه با روش لیز قلیایی ۵۷
۳-۱۰-۵ تعیین غلظت DNA ۵۸
۳-۱۰-۶ تعیین تیتر فاژ معادل غلظت واکسن DNA ۵۹
۳-۱۱ کشت یاخته ۶۰
۳-۱۱-۱ وسایل آزمایشگاهی مورد نیاز برای کشت یاخته ۶۰
۳-۱۱-۲ مواد مورد نیاز برای کشت یاخته ۶۱
۳-۱۱-۳ شستشوی وسایل مورد نیاز برای کشت یاخته ۶۲
۳-۱۱-۴ آماده کردن محیط های کشت یاخته ۶۲
۳-۱۱-۵ تهیه محیط کشت ۶۳
۳-۱۱-۶ افزودن آنتی بیوتیک ها ۶۳
۳-۱۱-۷ استریل کردن محیط کشت یاخته ۶۳
۳-۱۱-۸ آماده سازی و افزودن سرم ۶۴

۳-۱۱-۹ روش تهیه PBS بدون کلسیم و منیزیوم ۶۴
۳-۱۱-۱۰ محلول تریپسین-ورسن ۶۵
۳-۱۱-۱۱ نگهداری یاخته ها ۶۵
۳-۱۱-۱۲ پاساژ یاخته ها ۶۵
۳-۱۱-۱۳ انجماد یاخته ها ۶۶
۳-۱۱-۱۴ پاساژ یاخته های منجمد ۶۶
۳-۱۱-۱۵ منشا یاخته های مورد استفاده ۶۷
۳-۱۱-۱۶ تهیه کشت سلولی HeLa ۶۷
۳-۱۲ تکثیر ویروس HSV-1 سویه KOS در سلول HeLa ۶۸
۳-۱۳ تعیین عیار ویروس به روش TCID50 ..... ۶۸
۳-۱۴ کار با حیوانات آزمایشگاهی ۷۰
۳-۱۴-۱ موش های BALB/c ۷۰
۳-۱۴-۲ تزریق به موش های BALB/c ۷۱
۳-۱۵ آزمایش خنثی سازی ویروس (VNT) ۷۲
۳-۱۶ سنجش ایمنی سلولی به روش CTL assay ۷۵
۳-۱۶-۱برداشت طحال موش به منظور جداسازی و کشت از لنفوسیت های آن ۷۵
۳-۱۶-۲ تهیه کشت اولیه از لنفوسیت های طحال ۷۵
۳-۱۷-۱ اندازه گیری فعالیت ایمنی سلولی با استفاده از کیت الیزای گرانزیم B ۷۸
۳-۱۷-۱-۱ آلوده سازی سلول های هدف WEHI-164 با ویروس ۸۰

۳-۱۷-۱-۲ مجاور نمودن سلول های عامل و هدف ۸۰

۳-۱۷-۱-۳ انجام تست الایزا ۸۱

۳-۱۸ آنالیز آماری ۸۲

فصل چهارم : نتایج ۸۳

۴-۱نتیجه حاصل از تکثیر و تخلیص فاژ کمکی به روش Plaque Purification ۸۴

۴-۲ تعیین تیتر فاژ معادل غلظت واکسن DNA ۸۴

۴-۳ نتایج تکثیر فاژمید با استفاده از سه MOI مختلف فاژ کمکی M13KO7 ..... ۸۵

۴-۴ نتیجه حاصل از کشت سلول HeLa ۸۵

۴-۵ نتیجه حاصل از تکثیر HSV-1 سویه KOS در کشت سلولی HeLa ۸۶

۴-۶ نتیجه حاصل از اندازه گیری عیار HSV-1 تکثیر یافته به روش تعیین تیتر عفونی ویروس درسلول (TCID50) ۸۷

۴-۷ نتایج حاصل از آزمون VNT ۸۸

۴-۸ نتایج حاصل از CTL assay ۹۱

فصل پنجم : بحث و جمع بندی ۹۵

منابع ۱۰۲

فصل اول

مقدمه

باکتریوفاژها یا به اختصار فاژها ویروس های باکتریایی هستند که که اولین بار به وسیله Frederick Twort درسال ۱۹۱۵ و به دنبال آن توسط Felix dHerelle در سال ۱۹۱۷ شناسایی شدند . فاژها به رسپتور خود در سطح سلول میزبان خود متصل شده و DNA خود را به درون سلول میزبان تزریق می کنند که ممکن است به درون ژنوم میزبان درج شده (لیزوژنی) یا این که برای ساخت ذرات فاژی جدید استفاده شده و در نهایت با لیز سلول میزبان فاژهای جدید از آن آزاد شوند . ژنوم فاژها ممکن است از نوع DNA (تک رشته ای یا دورشته ای)و یا RNA باشد . این ویروس ها به دلیل بی تاثیر بودن بر روی سلول های یوکاریوتی و آسان بودن تیتراسیون برای سال های متمادی به منظور بررسی برهمکنش سیستم ایمنی با آنتی ژن های ذره ای به کار می رفتند[۱]. از دیگر کاربردهای فاژها می توان به درمان عفونت های باکتریایی اشاره کرد که باکتریوفاژها اولین بار یک دهه پیش از کشف پنی سیلین با موفقیت برای درمان عفونت های باکتریایی به کار رفتند . ولی این موفقیت ها کوتاه بوده و به دلیل عدم اطلاع کافی از بیولوژی فاژها در آن زمان با شکست مواجه شدند . امروزه به دلیل شناخت بیشتر از بیولوژی مولکولی فاژها و نیز ظهور باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک دوباره دانشمندان به استفاده از فاژها برای درمان عفونت های باکتریایی روی آورده اند . همچنین یک تجربه ۸۰ ساله از استفاده بالینی فاژها در کشورهای شوروی سابق و شرق اروپا وجود دارد و این پشتیبان خوبی برای بی خطر بودن استفاده بالینی آن ها در انسان است[۲] . از مزایای فاژها که باعث توجه به آن ها به عنوان ابزارهای انتقال ژن شده است می توان به دستکاری ژنتیکی آسان، تولید آسان و انبوه با هزینه کم و نیز پایداری آن ها در مقابل شرایط بد محیطی نظیر خشکی و دما اشاره کرد . از دیگر کاربردهای رایج فاژها به ویژه فاژهای رشته ای می توان به تکنولوژی phage display اشاره کرد که در آن یک کتابخانه پپتیدی تصادفی به صورت فیوژن با پروتئین های سطحی پوشش فاژ تهیه شده و می توان به کمک غربالگری از میان این کتابخانه لیگاند اختصاصی یک رسپتور یا ScFv ضد یک پپتید را جداسازی کرد . همچنین از این فن آوری در تولید واکسن های پپتیدی استفاده زیادی شده است[۱] .

از جمله استفاده های نوین از فاژها می توان به تولید واکسن های فاژی اشاره کرد . اساس تولید این واکسن ها کلون کردن ژن بیان کننده یک آنتی ژن در ژنوم فاژ است که به دنبال آن نانوپارتیکل های نوترکیب فاژی حامل ژن مورد نظر به میزبان تزریق می شوند . این نوع واکسن ها اولین بار بر اساس وکتورهای فاژ لامبدا تهیه شدند به گونه ای که نشان داده شد اگر ذرات فاژ لامبدا که حاوی ژن HBsAg هستند به موش یا خرگوش تزریق شوند به دنبال آن بیان ژن صورت گرفته و آنتی بادی بر علیه این آنتی ژن تولید می شود[۳] . در واکسن های DNA ژن کد کننده آنتی ژن مورد نظر در یک وکتور پلاسمیدی کلون شده و پلاسمید نوترکیب حاصل به عنوان واکسن به میزبان تزریق می شود . اگرچه تولید واکسن های DNA ساده تر از فاژها است ولی این واکسن ها معایبی دارند که از آن جمله می توان به تخریب توسط نوکلئازهای بدن میزبان اشاره کرد . از مزایای واکسن های فاژی نسبت به واکسن های DNA می توان به موارد زیر اشاره کرد :

۱- فاژها مقاومت قابل توجهی در برابر شرایط بد محیطی نظیر خشکی دمای بالا و PH اسیدی از خود نشان می دهند و لذا نگهداری آن ها آسان بوده و می توان از طریق خوراکی نیز آن را تجویز کرد .

۲- به دلیل ماهیت ذره ای خود پس از تزریق به خوبی توسط سلول های عرضه کننده آنتی ژن و احتمالا سلول های دیگر از طریق پینوسیتوز و فاگوسیتوز جذب می شوند .

۳- پوشش پروتئینی فاژ از DNA در مقابل آنزیم های DNase میزبان محافظت کرده و لذا ممکن است کارایی واکسن را افزایش دهد .

۴- با وجود این که پس از تزریق اول ممکن است تیتر بالایی از آنتی بادی در بدن میزبان بر علیه پروتئین های پوشش فاژ تولید شده و ذرات فاژی در تزریق های بعدی سریعتر از گردش خون پاکسازی شوند ولی این امر مانع افزایش تیتر آنتی بادی پس از تزریق دوزهای یادآور نمی گردد . به نظر می رسد که کمپلکس های ایمنی حاصل بهتر از خود فاژها توسط سلول های عرضه کننده آنتی ژن گرفته می شوند .[۴]

۵- فاژها برای سلول های یوکاریوتی بیماریزا نیستند و لذا واکسن های فاژی خطری برای میزبان ندارند .

۶- به راحتی می توان آن ها را در سلول باکتری به میزان زیاد و در زمان اندک تولید کرد . به علاوه فرآیند تخلیص آن ها نیز در مقایسه با واکسن هایDNA ساده تر و کم هزینه تر است .

۷- قابلیت پذیرش قطعات بزرگ DNA را داشته و لذا می توان ژن های مربوط به چند آنتی ژن مختلف را در یک واکسن فاژی قرار داد.

از جمله مزایای فاژهای رشته ای نسبت به فاژ لامبدا که اساس انجام این پژوهش بود می توان به موارد زیر اشاره کرد :

۱- فاژهای رشته ای سلول باکتری را لیز نکرده و لذا تیتر بالایی از ویروس می توان به دست آورد .

۲- در مقایسه با فاژ لامبدا قطعات بزرگتری از DNA را می توان در فاژهای رشته ای کلون کرد چون بسته به طول ژنوم فیلامنت های کوتاه یا طویل تری نیز تولید خواهند شد .

۳- به دلیل عدم تخریب سلول های باکتری می توان به راحتی ذرات فاژ را از سوپرناتانت کشت باکتری رسوب داده و تخلیص کرد به گونه ای که حداقل آلودگی با لاشه باکتری ها و ژنوم آن ها وجود خواهد داشت .[۵]

دراین پژوهش سعی بر این بوده است که برای اولین بار از نانوپارتیکل های فاژهای رشته ای به عنوان واکسن استفاده شود و به دنبال تزریق به موش های BALB/c هر دو بازوی ایمنی هومورال و سلولی ارزیابی شوند . به علاوه مقایسه ای با ایمنی زایی حاصل از تزریق واکسنDNA مربوطه صورت گرفت . مدل مورد استفاده بدین منظور ژن gD مربوط به ویروس HSV-1 بود که قبلا ایمنی زایی آن به شکل واکسن DNA در مطالعات متعدد به اثبات رسیده است. لذا اولین مرحله در این مسیر تولید موفقیت آمیز پارتیکل های فاژی از پلاسمید pcDNA3 و pcDNA3-gD می باشد . پس از تیتر کردن فاژمید pcDNA3-gD به روش CFU

assayلازم بود تیتر استانداردی برای تزریق به موش ها محاسبه شده و به موش های BALB/c در گروه های مختلف تزریق گردید و هدف از استاندارد کردن غلظت واکسن فاژی ، مقایسه ایمنی زایی آن با واکسن DNA بود. در پایان ایمنی هورال و سلولی گروه ها ارزیابی شده و از لحاظ آماری آنالیز گردید . به نظر می رسد که واکسن فاژی مورد استفاده در این پژوهش ایمنی هومورال را بهتر از ایمنی سلولی تحریک کرده است . در تحقیقات گذشته بر روی واکسن های فاژی فقط ایمنی هومورال بررسی شده و ایمنی سلولی مورد ارزیابی قرار نگرفته بود لذا میزان کارایی واکسن های فاژی چه لامبدا و چه فاژهای رشته ای نیاز به تایید بیشتری دارد که امید است در تحقیقات بعدی بیشتر مورد توجه و ارزیابی قرار بگیرد .

فصل دوم

کلیات و مروری بر مطالعات گذشته