دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و سوم، شماره ۵، صفحه ۴۵۴ - ۴۴۲ (آذر و دی ۱۳۹۹)

Iran South Med J 2020; 23(5): 442-454

طراحی، تولید و ارزیابی وایروزوم از ویروس آنفلوانزا ساب تایپ H1N1

آزاده علیشاهی (PhD Candidate)[1*]، محسن زرگر (PhD)[1**]، امیر قائمی (PhD)[2**]، فاطمه فتوحی (PhD)[2]، محمدرضا ذوالفقاری (PhD)[1]

[1] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران
[2] بخش آنفلوانزا و ویروس‌های تنفسی شایع، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۱۲/۲۰- پذیرش مقاله: ۹۹/۴/۱۷)

چکیده

زمینه: در دو دهه گذشته، اولین نسل از وایروزوم‌های آنفلوانزا گسترش پیدا کرد. وایروزوم‌های آنفلوانزا به‌دلیل کاربرد آن‌ها در زمینه‌های مختلف پزشکی به‌عنوان ابزاری نوین در برنامه‌های ساخت واکسن و ایمونوتراپی به حساب می‌آیند. هدف از مطالعه حاضر، ساخت وایروزوم کاتیونیک مشتق شده از ویروس آنفلوانزا با استفاده از دترجنت با قابلیت دیالیز (DCPC) و لیپید کاتیونیک (DOTAP) در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ویروس آنفلوانزا سویه (A/Puerto Rico/8/34(H1N1 در رده سلولی اپیتلیال کلیه سگ سانان تکثیر داده شد. پوشش ویروس آنفلوانزا با استفاده از DCPC به‌عنوان یک دترجنت حل گردید و با استفاده از دیالیز، این دترجنت حذف شده و با افزودن لیپید کاتیونیک DOTAP، وایروزوم کاتیونیک سنتز شد. میزان سمیت سلولی وایروزوم سنتز شده با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و حضور پروتئین‌های هماگلوتنین و نورآمینیداز با استفاده SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. مورفولوژی وایروزوم ساخته شده از طریق میکروسکوپ عبوری بررسی شد.

یافته‌ها: غلظت نهایی وایروزوم ساخته شده، ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. با استفاده از SDS-PAGE، حضور پروتئین‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز تأیید شد. همچنین در مقایسه با گروه کنترل، سایتوتوکسیسیته پس از ۴۸ ساعت از تیمار با غلظت‌های مختلف وایروزوم کاهش معنی‌داری داشت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: استفاده از دترجنت DCPC و همچنین لیپید کاتیونیک DOTAP یک روش مؤثر در بازآرایی پوشش ویروس آنفلوانزا بدون ایجاد تغییرات در گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس می‌باشد. روش به کار رفته در تحقیق حاضر برای تولید وایروزوم، پتانسیل مناسبی در برنامه‌های طراحی واکسن آنفلوانزا در آینده خواهد داشت.

واژگان کلیدی: وایروزوم، ویروس آنفلوانزا، DCPC، لیپید کاتیونیک، کشت سلول

* قم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی قم
** تهران، بخش ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران

Email: zargar@qom-iau.ac.ir, **ORCID: 0000-0002-3108-5655
Email:a_ghaem@pasteur.ac.ir, **ORCID: 0000-0001-7793-2920
***ORCID: 0000-0002-7127-4098**

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

مقدمه

آنفلوانزا به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ ومیر در جهان به‌ویژه در گروه‌های حساس شامل بیماران قلبی، ریوی، کلیوی، دیابتی، زنان باردار، سالمندان و نوزادان به حساب می‌آید (۱). هر ساله واریانت‌های جدیدی از سویه‌های ویروسی آنفلوانزا به‌علت وقوع میزان بالایی از جهش در ریبونوکلئیک اسید ویروسی ظاهر می‌شوند. تغییرات آنتی‌ژنیک به‌عنوان یکی از قوی‌ترین محرک‌های تکامل ویروسی محسوب می‌گردد، این امر مبتنی بر پروسه تکثیر مستعد به خطا می‌باشد. تا اواخر سال ۲۰۱۷ تخمین زده شده است که سالانه آنفلوانزای فصلی با ۲۵۰/۰۰۰ تا ۵۰۰/۰۰۰ مرگ همراه بوده است (۲).

واکسیناسیون به‌عنوان مقرون به صرفه‌ترین و مؤثرترین روش در برابر عفونت‌های ویروس آنفلوانزا محسوب می‌گردد. امروزه طراحی واکسن بر علیه ویروس آنفلوانزا عمدتاً مبتنی بر واکسن‌های غیر فعال بوده، این واکسن‌ها شامل ویروس کامل غیر فعال (WIVs)، یک بخش از ویریون، وایروزوم‌های واجد آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس و یا ساب یونیت‌های آنتی‌ژنیک (پروتئین‌های هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA)) می‌باشند (۶-۳). با توجه به ارزیابی سالیانه واکسن‌های تجاری آنفلوانزا و همچنین کارایی پایین این دسته از واکسن‌ها در افراد مسن (تقریباً ۶۰ درصد)، نیاز به توسعه واکسن‌های نسل نو از اهمیت بالایی برای مقابله با ویروس آنفلوانزا برخوردار است (۷).

در بین استراتژی‌های موجود، روش‌های مبتنی بر وایروزوم نوید توسعه واکسن‌های کارآمدی را در آینده داده است. فرمولاسیون وایروزوم‌ها از سال ۱۹۹۷ به‌طور عمده در کشورهای عضو اتحادیه اروپا مورد استفاده قرار گرفته است. وایروزوم‌ها، وزیکول‌هایی متشکل از پوشش‌های بازسازی شده ویروسی (به‌ویژه ویروس آنفلوانزا) شامل لیپیدهای غشایی و گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس می‌باشند. سطح خارجی این دسته از وزیکول‌ها مشابه با ذرات ویروسی بوده حال آنکه بخش داخلی وایروزوم‌ها خالی و فاقد ماده ژنتیکی است (۸ و ۹). بر این اساس، وایروزوم‌ها به‌عنوان ذرات شبه ویروسی متشکل از پروتئین‌های ویروسی توصیف می‌گردند. با این تفاسیر وایروزوم‌ها قادر به تکثیر نبوده و در طی مراحل تولید، ساختار تکراری را که یادآوری ویروس اصلی است، حفظ می‌نمایند (۱۰). شواهد جدید نشان داده است که وایروزوم‌ها به‌عنوان سیستم‌های حامل و ادجوانت عمل می‌نمایند. عملکرد ادجوانتی این دسته از واکسن‌ها در مقایسه با واکسن‌های دو جزئی و یا ساب یونیت واکسن‌ها (واکسن‌های حاوی اجزاء ویروسی) منجر به القاء آنتی‌بادی‌های خنثی کننده بر علیه گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که گلیکوپروتئین‌های سطحی وایروزوم‌ها بوسیله اجزای سیستم ایمنی از قبیل لنفوسیت‌های B به راحتی شناخته شده و بدین ترتیب در تحریک و بروز پاسخ‌های ایمنی همورال مؤثر می‌باشند. از طرفی به‌علت حضور آنتی‌ژن‌ها در سطح یا داخل وایروزوم‌ها، این دسته از وزیکول‌ها توانایی القاء پاسخ‌های ایمنی سلولار را نیز دارا می‌باشند. از این رو، وایروزوم‌ها کاندیدهایی مناسب در زمینه تولید واکسن محسوب می‌گردند (۸ و ۱۱).

یکی از واکسن‌هایی که امروزه مورد استفاده قرار گرفته اینفلوکسال می‌باشد. اینفلوکسال واکسن سه گانه مبتنی بر وایروزوم است که بسیار ایمونوژنیک بوده و برای تمامی گروه‌های سنی مجاز است. این واکسن تزریقی سه ظرفیتی که ترکیبی از سه وایروزوم مشتق شده از دو ساب تایپ A (H1N1 و H3N2) و ساب تایپ B می‌باشد، از سال ۱۹۹۷ در

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

سوئیس مجوز گرفته و در حال حاضر در چندین کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶-۱۲). سویه‌های آنفلوانزای انتخاب شده به توصیه‌های سالانه سازمان بهداشت جهانی بستگی دارد. شواهد جدید دلالت بر تحمل مناسب این واکسن در کودکان داشته است. پروسه تهیه واکسن اینفلوکسال در برگیرنده تخلیص و غیر فعال‌سازی ویروس آنفلوانزا و فرمولاسیون گلیکوپروتئینی زیر واحدهای آنفلوانزا می‌باشد. در این راستا، بهینه‌سازی دقیق شرایط فرمولاسیون به‌عنوان یکی از نکات کلیدی که به‌طور مستقیم در روند کاربرد مؤثر بالینی اینفلوکسال تأثیرگذار است، مطرح می‌باشد (۱۵ و ۱۶).

با توجه به اهمیتی که وایروزوم در توسعه واکسن دارد، هدف از این مطالعه ساخت وایروزوم آنفلوانزا به‌عنوان کاندیدی مؤثر در برنامه‌های طراحی واکسن می‌باشد. بدین منظور از روش‌های تولید و تأیید وایروزوم‌های کاتیونیک مشتق شده از سویه A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های رده سلولی اپیتلیوم کلیه سگ‌سانان (Madin Darby Canine Kidney cell line, MDCK) که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به همراه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (از شرکت Germany, Gibco) در فلاسک‌های ۱۷۵ سانتی‌متر مربع فیلتردار (SPL Life Science Co., Ltd, Korea) کشت داده شد.

ویروس

ویروس آنفلوآنزای سویه A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) از بخش آنفلوآنزای انستیتو پاستور با تیتر اولیه 10^6 در هر میلی‌لیتر تهیه شد.

تعیین ضریب آلودگی (MOI، Multiplicity Of Infection)

برای به‌دست آوردن یک تیتر مناسب از ویروس، MOI تعیین شد (۱۷). بدین‌منظور، سلول MDCK با ویروس A/Puerto Rico/8/34 H1N1 با MOIهای ۱ تا ۲۰ تلقیح گردید و سرعت تخریب سلول‌ها با یکدیگر مقایسه شد. در این راستا، ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی سلول MDCK به همراه محیط کشت کامل (آنتی بیوتیک و سرم) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ته صاف (SPL Life Science Co., Ltd, Korea) افزوده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تلقیح ویروس با تیتر اولیه 10^6 در هر میلی‌لیتر در ضریب آلودگی ۱تا ۲۰ صورت گرفت. برای هر ضریب آلودگی، ۳ چاهک با شرایط یکسان در نظر گرفته شد.

کشت و جمع آوری ویروس

ویروس آنفلوانزا با ضریب آلودگی بهینه (MOI=6) در کشت تک لایه سلول MDCK تلقیح داده شد و انکوباسیون به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷°C و ۵ درصد CO_2 صورت گرفت. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون و مشاهده علائم سایتوپاتیک، جمع‌آوری ویروس به‌واسطه سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰۰۰ دور بر دقیقه) از محتویات فلاسک‌ها انجام شد.

ساخت وایروزوم

تغلیظ ویروس با استفاده از اولترافیلتراسیون و اولتراسانتریفیوژ

به منظور تغلیظ ویروس تا ۱۰ برابر از اولترافیلتراسیون (Tangential Flow Filtration, TFF) (شرکت Millipore آمریکا) استفاده شد. در این سیستم، پس از مجاور شدن سوسپانسیون ویروسی با فیلتر ۱۰۰ کیلودالتون، ویروس (به‌دلیل اندازه بزرگ‌تر (5×10^3KD) از آن عبور نکرده و طی باز چرخش، تغلیظ و جداسازی ویروس از سایر ذرات نامحلول موجود در محیط صورت گرفت (۱۸ و ۱۹). در ادامه ویروس تغلیظ شده از مرحله اولترافیلتراسیون با ایجاد گرادیانت سوکروز ۱۰ درصد و ۶۰ درصد به مدت ۲ ساعت در دور ۱۰۰/۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اولتراسانتریفیوژ گردید. پس از اتمام مدت زمان اولتراسانتریفیوژ، ویروس تغلیظ شده در بین لایه‌های سوکروز ۱۰ درصد و ۶۰ درصد مشاهده و جداسازی گردید.

حذف سوکروز با استفاده از کاست دیالیز

ویروس تغلیظ شده حاوی مقدار کمی سوکروز می‌باشد. به منظور حذف سوکروز از کاست دیالیز (Thermo Scientific ،USA)(Cut off= 10Kd) استفاده گردید. برای این امر، نمونه ویروسی را وارد کاست دیالیز کرده و به مدت یک شبانه روز در یک لیتر بافر HBS (Hank's buffer solution) در دمای ۴°C بر روی همزن انکوبه شد. پس از اتمام مدت زمان دیالیز، ویروس با استفاده از یک سرنگ استریل از داخل کاست دیالیز خارج گردید.

تخریب پوشش ویروس با استفاده از دترجنت DCPC

به منظور تخریب ساختار ویروس از دترجنت DCPC (Avanti Polar Lipids ،INC ،USA) استفاده شد. برای این منظور، دترجنت DCPC به ویروس تخلیص شده آنفلوانزا افزوده شد و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ صورت گرفت. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، اولتراسانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰/۰۰۰g و دمای ۴°C صورت گرفت. در این مرحله پوشش ویروسی در لوله سانتریفیوژ (Beckman Instruments, USA) تخریب شده و سوپرناتانت که حاوی فسفولیپید و گلیکوپروتئین‌های ویروسی می‌باشد جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۴°C نگهداری شد (۲۰).

افزودن لیپید کاتیونیک (DOTAP)

لیپید کاتیونیک مورد استفاده در این پژوهش DOTAP (Dioleoyl-3-trimethylammonium propane) ساخت شرکت Avanti Polar Lipids آمریکا بود. مقدار ۸۰۸ نانومول فسفات از DOTAP به سوپرناتانت حاوی فسفولیپید و گلیکوپروتئین (به جهت ساخت وایروزوم ٪۳۵ لیپید کاتیونیک) اضافه گردید. برای جلوگیری از اکسید شدن DOTAP، این محلول به‌واسطه جریان گاز نیتروژن خشک شده و سپس به مدت ۲ ساعت در دسیکاتور متصل به پمپ خلاء در شرایط خلاء نگهداری شد. متعاقباً سوپرناتانت حاوی فسفولیپید و گلیکوپروتئین‌های ویروسی به DOTAP خشک شده در ته لوله اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به آرامی تکان داده شد.

بازسازی پوشش ویروس با حذف دترجنت

به منظور حذف دترجنت DCPC از محیط حاوی پوشش ویروسی (به جهت شکل گیری مجدد پوشش)،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

سوپرناتانت حاوی لیپید کاتیونیک دیالیز شد. برای این امر، سوپرناتانت حاوی DOTAP را در کاست دیالیز وارد کرده و کاست به مدت ۲ شبانه روز در ۲ لیتر بافر HBS 1X برروی یک همزن درون یخچال انکوبه گردید. در نهایت پس از اتمام مدت زمان دیالیز، وایروزوم‌های کاتیونیک ویروس آنفلوانزا درون کاست دیالیز مشاهده شد.

آزمون تأییدی ساختار وایروزوم

آزمون هماگلوتیناسیون (Hemagglutination assay ،HA)

یکی از تست‌ها جهت تأیید تشکیل ساختار وایروزوم، آزمون هماگلوتیناسیون می‌باشد (۲۱). با توجه به این نکته که تنها در صورت تشکیل وایروزوم‌های واجد مولکول‌های HA، آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز صورت می‌گیرد، خون مرغ با رقت نیم درصد به منظور انجام تست هماگلوتیناسیون و تأیید ساخت وایروزوم استفاده شد. برای این امر، پس از تهیه رقت‌های سریالی از ویروس شاهد و وایروزوم در پلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل کشت سلول، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون گلبول‌های قرمز با رقت نیم درصد به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و پس از یک ساعت انکوباسیون الگوی هماگلوتیناسیون مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنجش پروتئین تام در ویروس خالص شده (تست Lowry)

برای سنجش کل پروتئین ویروس از تست لوری استفاده گردید (۲۲). در این روش از نمونه استاندارد شامل رقت‌های سریالی Bovine Serum Albumin, BSA (برای هر رقت، دو تکرار) استفاده شد. بدین منظور، در مرحله اول به تمامی رقت‌های استاندارد و نمونه، ۵۰ میکرولیتر سدیم دئوکسی کولات اضافه شد. پس از مدت زمان ۱۰ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر محلول *Trichloroacetic acid*(TCA) را به هر میکروتیوب اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شد. رسوب به‌دست آمده را در ۱ میلی‌لیتر معرف لوری حل کرده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. متعاقباً ۱۰۰ میکرولیتر فولین رقیق شده به هر میکروتیوب اضافه شد و پس از ورتکس، ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. جذب نوری پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون در طول موج ۷۵۰ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد (۲۲ و ۲۳). قابل ذکر است که این تست در دو مرحله (اولین مرحله برای ویروس آنفلوانزای تغلیظ شده پس از اولتراسانتریفیوژ و در نهایت وایروزوم کاتیونیک تشکیل شده در مرحله آخر) انجام گردید.

ارزیابی میزان توکسیسیته وایروزوم کاتیونیک آنفلوانزا

از روش MTT Cell viability Assay جهت بررسی میزان توکسیسیته وایروزوم‌های ساخته شده استفاده شد. برای این منظور، رده سلولی بافت جنینی کلیه انسان (Human embryonic kidney ،HEK) به‌صورت تک لایه در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شد. متعاقباً با ۲۰ میکروگرم وایروزوم کاتیونیک (در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط DMEM) مجاور گردید و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. در نهایت برای بررسی خاصیت توکسیسیتی با افزودن رنگ MTT (۳-(۴ و ۵-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲ و۵ -دی فنیل تترازولیوم برومید) میزان سایتوتوکسیسیته تعیین گردید. از سلول‌های HEK بدون افزودن وایروزوم کاتیونیک نیز به‌عنوان کنترل استفاده شد (۲۴).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (*SDS-PAGE*)

SDS-PAGE تکنیکی برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس توانایی حرکتشان در یک جریان الکتریکی بر مبنای وزن مولکولی‌شان می‌باشد. در این تکنیک، سیستم Laemli جهت جداسازی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این سیستم شامل ژل جدا کننده ۱۲ تا ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد می‌باشد. در این روش از دترجنت آنیونی سدیم دو دسیل سولفات به جهت دناتوره کردن و توزیع یکنواختی از بار منفی بر روی پروتئین‌ها استفاده می‌شود (۲۵). برای این امر پس از افزودن بافر نمونه به نسبت ۱ به ۴ به نمونه‌ها و اسپین نمودن آن‌ها، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. متعاقباً پس از ران نمودن مارکر پروتئینی در چاهک اول، نمونه‌های ویروس آنفلوانزا A/Puerto (H1N1) Rico/8/34 و وایروزوم آنفلوانزا در چاهک‌های دوم و سوم، جریان الکتریکی از طریق اتصال الکترودهای مثبت و منفی تانک به دستگاه تأمین جریان برقرار شد. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو انجام گرفت و پس از رنگ بری، بررسی باندها صورت گرفت.

تصویربرداری از وایروزوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

(Transmission Electron Microscope (TEM)

به‌منظور ارزیابی کیفیت و مورفولوژی وایروزوم ساخته شده در قیاس با ویروس آنفلوانزا و اینکه وایروزوم تولید شده برای بسته‌بندی آنتی‌ژن‌ها کارآمدی لازم را دارد یا نه از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. برای تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی نمونه‌ها به بخش میکروسکوپ الکترونی واقع در دانشگاه علوم پزشکی ایران فرستاده شد و پس از رنگ‌آمیزی با اورانیل استات ۲ درصد، تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری صورت گرفت.

تجربه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ آنالیز آماری داده‌ها انجام شده و نتایج به‌صورت درصد و انحراف معیار گزارش گردید. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از تست ONE WAY ANOVA استفاده شد. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری از نتایج در نظر گرفته شد. این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد قم با کد IR.IAU.QOM.REC .۱۳۹۷ .۰۲۴ به ثبت رسیده است.

یافته‌ها

تعیین ضریب آلودگی بهینه

ارزیابی ضریب‌های آلودگی ۱ تا ۲۰ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون نشان داد که تعیین ضریب آلودگی بهینه وابسته به زمان بوده و در زمان‌های مختلف، علائم سایتوپاتیک (CPE، Cytopathogenic effect) در چاهک‌های مختلف تغییر می‌نماید. به‌عنوان مثال در زمان کم‌تر از ۲۰ ساعت، ضریب آلودگی ۲۰ با به‌عنوان ضریب آلودگی بهینه در نظر گرفته می‌شود. جهت تکمیل سیکل ویروس و کاهش میزان تولید ذرات شبه ویروسی، ضریب آلودگی ۶ با دوره انکوباسیون ۴۸ ساعته انتخاب شد. نمایی از یاخته‌های سالم رده سلولی MDCK در مقابل یاخته‌های آلوده در شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی حضور پروتئین‌های HA و NA با روش SDS-PAGE

جهت بررسی تغییرات احتمالی حضور گلیکوپروتئین‌های سطحی که در فرایند تولید وایروزوم ممکن است ایجاد شود از روش

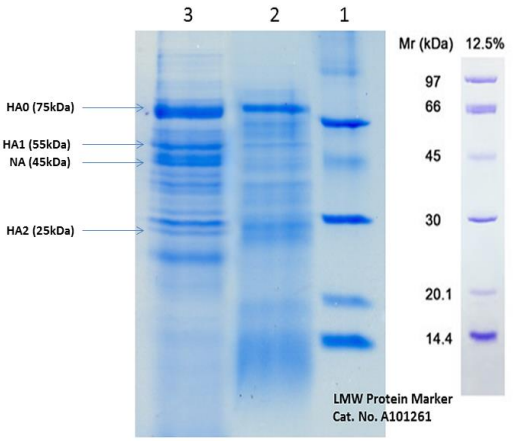
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

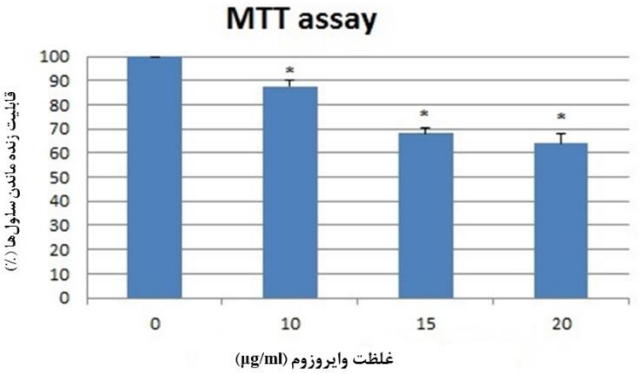
SDS-PAGE استفاده می‌شود. همان‌طور که در شکل مشخص است میزان گلیکوپروتئین‌های سطحی، کارامد بودن پروسه را نشان می‌دهد و از طرفی عدم وجود پروتئین‌های درونی نشان دهنده قابلیت وایروزوم به منظور در برگرفتن آنتی ژن‌ها و مواد مختلف است. در شکل ۲ محتویات پروتئینی ویروس سالم آنفلوانزا و وایروزوم آنفلوانزا ساخته شده نشان داده شده است.

بررسی تأثیر وایروزوم آنفلوانزا بر حیات سلولی به روش MTT assay

به منظور ارزیابی میزان توکسیسیته وایروزوم ساخته شده در غلظت‌های مختلف بر رده سلولی MDCK، تست MTT گذاشته شد. سمیت وایروزوم کاتیونیک، با افزایش غلظت با تغییرات سایتوپاتیک همراه بود. نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است. از طرفی نمایی از یاخته‌های سالم رده سلولی MDCK در مقابل یاخته‌های آلوده در شکل ۱ نشان داده شده است.



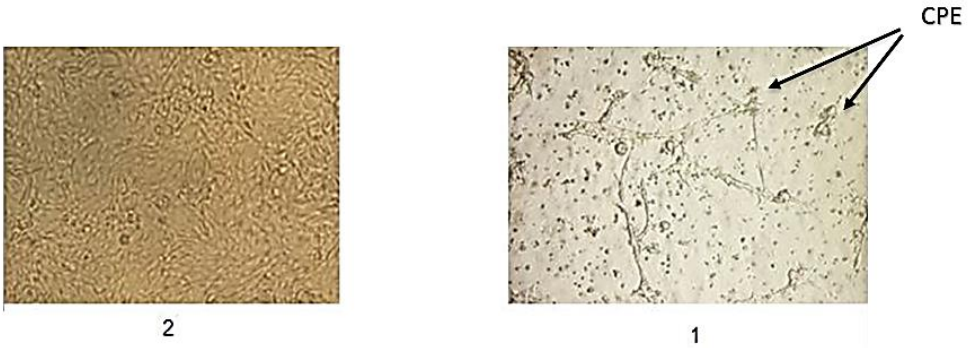
شکل ۱) ارزیابی پروتئین‌های وایروزوم با استفاده از تست SDS-PAGE،
لاین ۱: مارکر پروتئینی، لاین ۲: پروتئین‌های وایروزوم، لاین ۳: پروتئین‌های ویروس آنفلوانزا



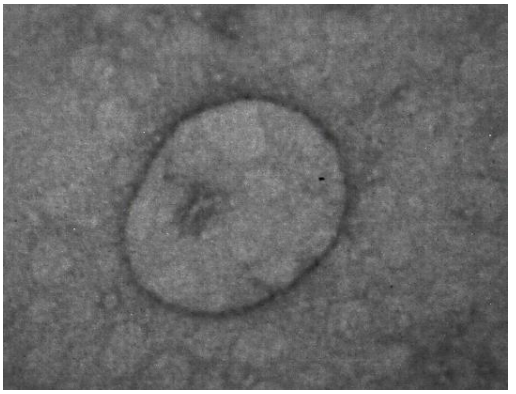
نمودار ۱) سمیت وایروزوم کاتیونیک آنفلوانزا در سلول‌های MDCK در مدت زمان ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل. سمیت سلولی با آزمون MTT سنجیده شد. هر ستون بیانگر میانگین و انحراف معیار در نمونه‌ها می‌باشد (*p<۰/۰۵ در مقایسه با کنترل).

Fig 1) Toxicity of influenza cationic virosomes in MDCK cells over 48 h, compared with control group. Cytotoxicity was assessed by MTT assay. Eech column represents the mean and standard deviation in the samples (P<0.05).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]



شکل ۲) اثرات سایتوپاتیک ناشی از آلودگی رده سلولی MDCK با ویروس آنفلوانزا.
۱) اثرات سایتوپاتیک سلول‌های آلوده به ویروس، ۲) سلول‌های سالم MDCK.



شکل ۳) میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM). این شکل بیانگر مورفولوژی وایروزوم کاتیونیک ساخته شده با مقیاس ۱۰۰ نانومتر می‌باشد.

تعیین غلظت پروتئین تام وایروزوم

نتایج تست لوری بعد از اولترا سانتریفیوژ و در مقایسه با رقت‌های استاندارد BSA در هر میلی‌لیتر از ویروس سالم، نشان داد که ویروس تغلیظ شده آنفلوانزا دارای غلظت پروتئینی در حدود ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. همچنین غلظت نهایی وایروزوم آنفلوانزا ساخته شده ۰/۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر را تخمین زده شد.

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است تراکم کمتر وایروزوم در قیاس با ویروس آنفلوانزا، این ساختار را بمنظور بسته بندی آنتی‌ژن‌ها مناسب می‌سازد. در حقیقت، فقدان ماده ژنتیکی در ساختار وایروزوم و همچنین حجم محتوای پروتئینی کم‌تر نسبت به ویروس، وایروزوم را به‌عنوان کاندیدی مناسب جهت بسته‌بندی آنتی‌ژن‌ها مطرح می‌سازد.

بحث

واکسن‌های فعلی آنفلوانزا که غالباً سطح بالایی از ایمنی اختصاصی گونه را القاء می‌نمایند، قادر به مقابله با پاندمی‌های ویروس آنفلوانزا نمی‌باشند. بنابراین توسعه تکنیک‌های جدید در این زمینه بیش از پیش احساس

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

می‌گردد (۲۳ و ۲۴). در این راستا، وایروزوم‌ها به‌دلیل قابلیت تحریک سیستم ایمنی و نقش ادجوانتی، به‌عنوان ابزاری کارآمد برای توسعه واکسن‌های نسل جدید آنفلوانزا قلمداد می‌شوند. کارآمدی این روش با تجاری سازی وایروزوم‌هایی موسوم به اینفلوکسال مورد تأیید قرارگرفته است (۸ و ۱۲). قابل ذکر است که خواص منحصر به فرد وایروزوم‌ها با حضور پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا در سطح وایروزوم مرتبط می‌باشد؛ چرا که این پروتئین ویروسی نه تنها منجر به استحکام ساختاری و هموژنیسیته وایروزوم‌ها می‌شود بلکه به میزان قابل توجهی در فرار اندوزومی و همچنین خواص ایمونولوژیکی وایروزوم‌ها نیز نقش دارد. این امر منجر به تمایز عمده وایروزوم‌ها نسبت به سایر سیستم‌های لیپوزومی شده است (۱۰ و ۱۲).

بطور کلی لیپوزوم‌ها به‌واسطه محصور کردن داروها به‌عنوان سیستم رهایش دارو برای سرطان و دیگر بیماری‌ها مطرح می‌باشند (۲۵). از جمله معایب لیپوزوم‌ها می‌توان به ۱) پاکسازی سریع آن‌ها از خون، ۲) هزینه بالای تولید، ۲) طول عمر کوتاه، ۳) حلالیت کم و ۴) عملکرد غیر اختصاصی اشاره نمود. از طرفی فسفولیپیدهای تشکیل دهنده لیپوزوم‌ها می‌توانند تحت فرآیندهای اکسیداسیون و یا واکنش‌های هیدرولیزی قرار گیرند، از این رو بیان می‌شود که لیپوزوم‌های متداول ممکن است از لحاظ شیمیایی ناپایدار شوند (۲۶).

در زمینه سیستم تحویل آنتی‌ژن، وایروزوم‌ها دارای خصوصیات مشابه با لیپوزوم‌ها هستند. این خصوصیات عبارتند از: ۱) سیستم‌های وایروزومی می‌توانند جهت تحویل تقریباً تمام انواع مولکول‌های آلی، پروتئین‌ها، پپتیدها، اسیدهای نوکلئیک و داروهای ضدسرطانی به‌کار روند (۱۱)؛ ۲) غشاء لیپیدی وایروزوم‌ها به‌واسطه ایجاد یک سد در اطراف آنتی‌ژن منجر به محافظت آن از محیط و بطبع ایجاد مقاومت در برابر تجزیه آنزیمی می‌شود. در این حالت آنتی‌ژن‌هایی که در داخل وایروزوم‌ها قرار می‌گیرند، بدون تجزیه سریع و با کمترین عوارض جانبی بداخل سلول‌های زنده انتقال می‌یابند (۸ و ۱۰).

۳) به‌علت حضور فسفولیپیدها در ساختار لیپیدی وایروزوم‌ها، این دسته از وزیکول‌ها دارای سمیت ذاتی پایین، انعطاف‌پذیری، زیست سازگار و تجزیه‌پذیری مناسبی می‌باشند (۲۷ و ۲۸). قابل ذکر است که برخلاف لیپوزوم‌ها، وایروزوم‌ها ذرات شبه ویروسی بوده که بدلیل فقدان ماده ژنتیکی خاصیت تکثیر و انتقال بیماری را ندارند؛ ولیکن حضور گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس در بحث هدف قرار دادن و عملکرد اختصاصی حائز اهمیت می‌باشد. این امر وایروزوم‌ها را به‌عنوان کاندیدهایی امیدوارکننده در زمینه سیستم تحویل آنتی‌ژن مبدل ساخته است (۱۱). در سال ۱۹۸۹، پاترنوستر (Paternostre) و همکاران، از Triton X -100 به‌عنوان دترجنت برای حل کردن غشای ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSV) استفاده کرده و گزارش نمودند که قرارگرفتن طولانی مدت پروتئین G این ویروس در معرض این نوع دترجنت می‌تواند منجر به غیرفعال شدن بخشی از آن شود. از طرفی این دترجنت به راحتی حذف نمی‌گردد (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر از اکتیل گلوکوزید (OG) به‌عنوان دترجنت استفاده شد. نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که وایروزوم ساخته شده از آرایش مناسب لیگاندهای آنفلوانزا برخوردار نمی‌باشد (۲۶). در حالی‌که در این مطالعه از DCPC به‌عنوان دترجنت استفاده شد که با توجه به سهولت حذف با روش دیالیز و همچنین بازارایی مناسبی از گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

آنفلوانزا، احتمال بهره‌برداری از نانوپارتیکل‌های ساخته شده به‌عنوان حامل آنتی‌ژن‌ها را ارتقا می‌بخشد. در مطالعه‌ای که یحیی محمدزاده و همکاران، انجام دادند، وایروزوم کاتیونیک مشتق شده از ویروس وزیکولار استوماتیتیس با استفاده از دترجنت DCPC و لیپید کاتیونیک DOTAP به عنوان ابزاری جهت ژن درمانی بر روی رده سلولی SF9 ساخته شد. نتایج حاکی از توانایی انتقال مؤثر ژن گزارشگر فلورسانتی توسط وایروزوم کاتیونیک VSV به سلول‌های هدف بود (۳۰). در مطالعه حاضر نیز به منظور ساخت وایروزوم کاتیونیک، از دترجنت DCPC با قابلیت دیالیز به‌عنوان دترجنت کوتاه زنجیر استفاده گردید؛ چراکه این ماده نسبت به سایر دترجنت‌ها بی‌خطر بوده و با دیالیز به راحتی حذف می‌گردد (۲۶).

نتیجه‌گیری

آرایش مناسب گلیکوپروتئنی‌های سطحی با توجه به نتایج SDS-PAGE ارائه شده در شکل ۲ تأکیدی بر این مطلب است که ساختارهای تشکیل شده از ایمنوژنسیته مناسبی برای تحریک ایمنی نیز برخوردار می‌باشند. از طرفی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که وایروزوم کاتیونیک مشتق شده از ویروس آنفلوانزا واجد گلیکوپروتئین‌های سطحی HA و NA بوده و به‌واسطه سمیت محدود و پروتئین‌های درونی کمتر، پتانسیل نوید بخشی به منظور بکارگیری برای توسعه واکسن‌های کارامد آنفلوانزا در آینده را دارا می‌باشد.

این مقاله حاصل پایان‌نامه دکتری آزاده علیشاهی در گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می‌باشد و تحت حمایت مالی سازمان یا مؤسسه‌ای نمی‌باشد.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی اساتید شرکت کننده در این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد. تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجله پزشکی را دارا بودند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Rabieian P, Zareei N, Abbaszadeh M, et al. Survey of Hematologic Markers of Influenza in Bushehr. Iran South Med J 2016; 19(5): 888-94. (Persian)

2.Paget J, Spreeuwenberg P, Charu V, et al. Global Mortality Associated With Seasonal Influenza Epidemics: New Burden Estimates And Predictors From The Glamor Project. J Glob Health 2019; 9(2): 020421.

3.Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune Responses To Influenza Virus Infection. Virus Res 2011; 162(1-2): 19-30.

4.Müllbacher A, Ada G, Tha Hla R. Gamma-Irradiated Influenza A Virus Can Prime For A Cross-Reactive And Cross-Protective Immune Response Against Influenza A Viruses. Immunol Cell Biol 1988; 66(2): 153-7.

5.Babb R, Chan J, Khairat JE, et al. Gamma-Irradiated Influenza A Virus Provides Adjuvant

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

Activity To A Co-Administered Poorly Immunogenic SFV Vaccine In Mice. Front Immunol 2014; 5: 267.
6.Furuya Y, Regner M, Lobigs M, et al. Effect Of Inactivation Method On The Cross-Protective Immunity Induced By Whole 'Killed'influenza A Viruses And Commercial Vaccine Preparations. J Gen Virol 2010; 91(6): 1450-60.
7.Wilschut J, Mcelhaney J, Palache A. Rapid Reference Influenza. 2nd ed. London: Elsevier Health Sciences, 2006.
8.Babar MM, Sadaf Zaidi N, Kazi AG, et al. Virosomes-Hybrid Drug Delivery Systems. J Antivir Antiretrovir 2013; 5(7): 166-72.
9.Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, et al. Advances And Challenges Of Liposome Assisted Drug Delivery. Front Pharmacol 2015; 6: 286.
10.Jennings GT, Bachmann MF. The Coming Of Age Of Virus-Like Particle Vaccines. Biol Chem 2008; 389(5): 521-36.
11.Kalra N, Dhanya V, Saini V, et al. Virosomes: As A Drug Delivery Carrier. Am J Adv Drug Deliv 2013; 1(1): 29-35.
12.Mischler R, Metcalfe IC. Inflexal® V a Trivalent Virosome Subunit Influenza Vaccine: Production. Vaccine 2002; 20(Suppl 5): B17-23.
13.Moser C, Amacker M, Kammer AR, et al. Influenza Virosomes As A Combined Vaccine Carrier And Adjuvant System For Prophylactic And Therapeutic Immunizations. Expert Rev Vaccines 2007; 6(5): 711-21.
14.Cusi MG. Applications Of Influenza Virosomes As A Delivery System. Hum Vaccin 2006; 2(1): 1-7.
15.Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, et al. The Virosome Concept For Influenza Vaccines. Vaccine 2005; 23(Suppl 1): S26-38.
16.Cryz SJ, Glück R. Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes As A Novel Antigen Delivery System. Dev Biol Stand 1998; 92: 219-23.
17.González-Jara P, Fraile A, Canto T, et al. The Multiplicity Of Infection Of A Plant Virus Varies During Colonization Of Its Eukaryotic Host. J Virol 2009; 83(15): 7487-94.
18.Wickramasinghe S, Kalbfuss B, Zimmermann A, et al. Tangential Flow Microfiltration And Ultrafiltration For Human Influenza A Virus Concentration And Purification. Biotechnol Bioeng 2005; 92(2): 199-208.
19.Kalbfuss B, Genzel Y, Wolff M, et al. Harvesting And Concentration Of Human Influenza A Virus Produced In Serum-Free Mammalian Cell Culture For The Production Of Vaccines. Biotechnol Bioeng 2007; 97(1): 73-85.
20.Killian ML. Hemagglutination Assay For Influenza Virus. In: Spackman E, editors. New York: Humana Press-Animal Influenza Virus, 2014, 3-9.
21.De Jonge J, Leenhouts JM, Holtrop M, et al. Cellular Gene Transfer Mediated By Influenza Virosomes With Encapsulated Plasmid DNA. Biochem J 2007; 405(1): 41-9.
22.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-75.
23.Peterson GL. A Simplification Of The Protein Assay Method Of Lowry Et Al. Which Is More Generally Applicable. Anal Biochem 1977; 83(2): 346-56.
24.Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
25.Laemmli U. Most Commonly Used Discontinuous Buffer System For SDS Electrophoresis. Nature 1970; 227: 680-6.
26.Beg S, Samad A, Nazish I, et al. Colloidal Drug Delivery Systems In Vaccine Delivery. Curr Drug Targets 2013; 14(1): 123-37.
27.Schwendener RA. Liposomes As Vaccine Delivery Systems: A Review Of The Recent Advances. Ther Adv *Vaccines* 2014; 2(6): 159-82.
28.Paternostre M, Viard M, Meyer O, et al. Solubilization And Reconstitution Of Vesicular Stomatitis Virus Envelope Using Octylglucoside. Biophys J 1997; 72(4): 1683-94.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

29.Paternostre MT, Lowy RJ, Blumenthal R. pH-Dependent Fusion Of Reconstituted Vesicular Stomatitis Virus Envelopes With Vero Cells Measurement By Dequenching Of Fluorescence. FEBS Lett 1989; 243(2): 251-8.

30.Mohammadzadeh Y, Gholami S, Rasouli N, et al. Introduction Of Cationic Virosome Derived From Vesicular Stomatitis Virus As A Novel Gene Delivery System For sf9 Cells. J Liposome Res 2017; 27(2): 83-9.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]

Iran South Med J 2020; 23(5): 442-454

Original Article

Design, Production, and Evaluation of Virosomes from H1N1 Influenza Virus

***A. Alishahi** (PhD Candidate)[1*], **M. Zargar** (PhD)[1**], **A. Ghaemi** (PhD)[2**], **F. Fotouhi** (PhD)[2], **MR. Zolfaghari** (PhD)[1]*

[1] *Department of Microbiology, School of Basic Science, Qum Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran*
[2] *Department of Influenza and other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

(Received 10 Mar, 2020 Accepted 7 Jul, 2020)

Abstract

Background: The last two decades witnessed the spread of the first generation of influenza viruses. Influenza virosomes are promising tools in vaccine and immunotherapy programs because of their applications in various medical fields. The aim of the present study was to construct cationic virosomes derived from influenza virus using dialyzable detergent (DCPC) and cationic lipid (DOTAP) *in vitro*.

Materials and Methods: Influenza A / Puerto Rico / 34.8 (H1N1) strain was propagated in MDCK cell line. The influenza virus envelope was dissolved using DCPC as a dialyzable detergent, and finally it was removed by dialysis and the cationic virosome was synthesized through adding cationic lipid (DOTAP). Cytotoxicity and presence of HA and NA proteins were evaluated by cell viability assay (MTT assay) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), respectively. Also, macroscopic and morphology studies of virosomes were performed by transmission electron microscopy (TEM).

Results: The final concentration of virosomes was 1.5 mg/ml. The presence of HA and NA proteins was confirmed by SDS-PAGE. Cell survival was significantly decreased after 48 hours of treatment with different concentrations of cationic virosomes ($P<0.05$).

Conclusion: The use of a detergent (DCPC) and also a cationic lipid (DOTAP) is an effective procedure for reconstruction of influenza virus envelope without any alteration in surface glycoproteins (HA, NA). The methoed used in the present study for producing influenza virosome will be a promising candidate for developing influenza vaccines.

Keywords: Virosome, Influenza Virus, DCPC, Cationic lipid, Cell Culture

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Alishahi A, Zargar M, Ghaemi A, Fotouhi F, Zolfaghari MR. Design, Production, and Evaluation of Virosomes from H1N1 Influenza Virus.. Iran South Med J 2020; 23(5): 442-454

Copyright © 2020, Alishahi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Adrress of correspondings:* Mohsen Zargar; Department of Microbiology, School of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
Amir Ghaemi; Department of Influenza and other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
Email: zargar@qom-iau.ac.ir, **ORCID: 0000-0002-3108-5655
Email:a_ghaem@pasteur.ac.ir, **ORCID: 0000-0001-7793-2920
*ORCID: 0000-0002-7127-4098

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.442]