



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

## اشباح باکتریایی یک سیستم تحویل موثر برای واکسن های DNA می باشد.

### چکیده

اجرای توده ای واکسن های DNA با الزام دوزهای پلاسمید بالا و ایمونوژنیسیته ضعیف به تأخیر می افتد. ما ظرفیت اشباح *Mannheimia haemolytica* را به عنوان یک سیستم تحویل برای واکسن DNA ارزیابی کردیم. مطالعات *in vitro* نشان داد که اشباح باکتریایی بارگیری شده با یک پلاسمید که حامل ژن کدگذاری کننده پروتئین فلورسانت سبز (pEGFP-N1) می باشد به طور موثری توسط APC جذب می شود، که به موجب آن منجر به میزانهای ترافست بالا (52 الی 60 درصد) می گردد. مطالعات واکسن نشان داد که تحویل با واسطه اشباح توسط درون پوستی یا مسیر *i.m.* یک پلاسمید بیان یوکاریوتی حاوی ژن کدگذاری کننده برای بتا گالاکتوزیداز تحت کنترل پروموتور ژن اولیه فوری CMV یا  $\text{pCMV}\beta$  پاسخ های ایمنی سلولی و همورال خاص Ag کارآمدتری ( $\text{CD4}^+, \text{CD8}^+$ ) را نسبت به DNA بی پوشش در موش های BALB/c تحریک می کند. استفاده از اشباح نیز به مودوله سازی پاسخ Th اصلی از یک Th1/Th2 مخلوط به یک الگوی Th2 غالبتر امکان می دهد. ایمنی سازی داخل وریدی با سلولهای دندریتی بارگذاری شده *ex vivo* با اشباح حاوی  $\text{pCMV}\beta$  نیز منجر به روشن سازی پاسخ های خاص بتاگالاکتوزیداز گردید. این امر حاکی از آنست که سلولهای دندریتی یک نقش مهمی را در شبیه سازی پاسخ های ایمنی ایفا می کند هنگامی که اشباح باکتریایی به شکل یک سیستم تحویل DNA استفاده می شود. اشباح باکتریایی نه تنها سازه واکسن DNA را به APC هدف قرار می دهند، بلکه یک سیگنال خطر قوی فراهم می کنند که به شکل یک ادجوانت طبیعی عمل می کند و به موجب آن بلوغ کارآمدی و فعالسازی سلولهای دندریتی را تحریک می کند. با این حساب، اشباح باکتریایی تشکیل یک صفحه مشترک تکنولوژی نویدبخش را برای پیدایش واکسن های DNA کارآمدتر می دهند.

### مقدمه

واکسیناسیون نوکلئیک اسید به شکل یک تکنولوژی قدرتمند ظهور یافته است که می تواند برای ایجاد واکسن های پروفیلاکتیک یا درمانی بکار بسته شود. ژنهای کدگذاری کننده Ag های واکسن به یک پلاسمید بیان

یوکاریوتی کلون شده که عموماً با تزریق i.m. یا از طریق بمباران پوستی بیولیستیک با یک اسلحه ژنی تجویز می‌شود. سپس سیستم بیوسنتز سلول واکسینه مسئول در داخل بدن بیان ژن متناظر است. حضور نقوش ایمنی در DNA بیشتر به استخراج از پاسخ ایمنی کمک می‌کند. با این حال، اجرای روتین از این روش در انسان هنوز هم به نظر نمی‌رسد به امکان‌پذیر است. که عمدتاً به دلیل ایمنی‌زایی بد و نیاز به دوزهای پلاسمید بسیار بالا می‌باشد. کارایی پایین واکسیناسیون DNA برهنه سنتی می‌تواند به دلیل دست کم تا اندازه‌ای این حقیقت باشد که APC به طور اختصاصی مورد هدف واقع نشده و Ag کدگذاری شده در زمینه یک سیگنال خطر کافی تحویل داده نشده است.

اشباح باکتریایی یک سکوی مشترک تکنولوژی واکسیناسیون غیرزنده تازه است که براساس بیان شرطی ژن لیز کننده E از باکتریوفاژ PhiX174 در گرم منفی هاست. این امر منجر به تشکیل یک تونل گذرنده از پوشش سلولی باکتری (شکل 1D) با توجه به فشار اسمزی داخلی بالا، محتوای سیتوپلاسم است از طریق تونل (شکل را ببینید 1D) اخراج، و در نتیجه پوشش سلول باکتری خالی می‌باشد. اشباح باکتریایی حفظ تمام ویژگی‌های مورفولوژیکی، ساختاری، و آنتی ژن از دیواره سلولی و می‌تواند به عنوان نامزد واکسن به خودی استفاده می‌شود. روش دیگر، می‌توان آنها را به عنوان یک سیستم تحویل برای پروتئین‌ها، که هر دو بیان و قبل از لیز لنگر به پاکت و یا پس از آن لود استفاده قرار گیرد. اشباح باکتریایی می‌تواند سلول‌های APC و اندوتلیال عروق هدف قرار دهند. اجزای پاکت ممکن است یک سیگنال خطر از طریق فعال سازی گیرنده‌های تشخیص الگو ارائه، در نتیجه اقدام ادجوانت به عنوان طبیعی است. اما اثرات اندوتوکسیک LPS آزاد مشاهده نشده چون LPS با پوشش‌های اشباح مرتبط است.

در این مطالعه ما به ارزیابی ظرفیت اشباح *Mannheimia haemolytica* به شکل سیستم تحویل واکسن‌های DNA پرداختیم. در مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد، برای اولین بار، که اشباح هستند موثر توسط APC گرفته، در نتیجه منجر به بازده انتقال بالا است. شبیح واسطه تحویل DNA منجر به استخراج از پاسخ‌های ایمنی کارآمدتر از استفاده از DNA برهنه، اجازه می‌دهد همچنین مدولاسیون از پاسخ ایمنی به دست آمده از یک مخلوط وابسته به Th1 / Th2 در الگوی پاسخ غالب Th2 می‌باشد. ایمن سازی داخل وریدی با سلول‌های دندریتیک (DC) در شرایط آزمایشگاهی با اشباح پلاسمید حاوی لود همچنین در استخراج از پاسخ

های ایمنی خاص ایمنی هومورال و سلولی است. علاوه بر این در مطالعات *in vitro* نشان داد که اشباح باکتریایی ترویج بلوغ کارآمد و فعال شدن DC است. با این حساب اشباح باکتریایی به شکل ادجوانت های طبیعی عمل می کنند که متشکل از یک تکنولوژی نویدبخش برای ایجاد واکنش های DNA می باشد.

## مواد و روشها

### تولید و بارگذاری اشباح *M. haemolytica*

اشباح باکتریایی با بیان کنترل شده پروتئین لیز E در *M. haemolytica* سوش A23 تولید گردید. به طور خلاصه، *electrocompetent M. haemolytica* سلول با پلاسمید حاوی سیستم لیز تبدیل شد. باکتری نوترکیب در محیط مایع در 28 درجه سانتی گراد رشد داده شدند تا آنها رسیده OD600 0.25 سپس فرهنگ باکتریایی در دو دسته تقسیم شدند و بیشتر در 28 (C ° کنترل) و 42 درجه سانتی گراد (القاء سیستم لیز E-واسطه) انکوبه شدند. لیز باکتری های اندازه گیری OD600، تجزیه و تحلیل FACS، و تعیین تعداد سلول زنده گیری شد. پس از لیز کامل شد، اشباح *M. haemolytica*، شسته شد برداشت های سانتریفوژ  $\times 5000$  (گرم، در 4 درجه سانتی گراد، 15 دقیقه)، و لیوفیلیزه ذخیره شده تا استفاده بیشتر است. اشباح لیوفیلیزه (26.2 میلی گرم) و سپس در 600 میکرولیتر از شور-HEPES بافر اتفاده شد (100 میلی مولار، 10 میلی متر استات سدیم، 10 میلی متر HEPES، pH برابر 7) حاوی pEGFP افزایش پروتئین فلورسنت سبز N1- (یا  $\beta$ CMV p آزمایشگاه Clontech، پالو آلتو، CA)، و بعد از مکمل 25)  $\text{CaCl}_2$  میلی متر)، آنها در 24 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه انکوبه شدند. میکروسکوپ الکترونی با هیتاچی S-800 میکروسکوپ زمینه انتشار الکترونی روبشی (هیتاچی، توکیو، ژاپن) گرفته شد. تثبیت سلولهای باکتریایی و تهیه نمونه همانند شرح قبلی اجرا گردید.

### Real-time PCR

برای مطالعات کمیت سنجی، real-time PCR با رنگ سبز SYBR درج گذاری DNA و پرایمرهای (5'-  
AATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC-3',5'-  
(3'-TTACCAATGCTTAATCAGTGAGG-3') که خاص ژن کدگذاری کننده امپی سیلین می باشد،  
اجرا گردید. برای کسب یک منحنی استاندارد، رقت های سریالی پلاسمید تهیه گردید (10-2 to 10-6).

## نشانگذاری فلورسانس اشباح باکتریایی

اشباح با انکوباسیون با 10 mM sulforhodamine B نشانگذاری گردید. برچسب dsDNA توسط روش PCR از یک قطعه 400 جفت از فاز  $\phi$ CH1 با آغازگر FITC نشاندار 5'-  
' 3'-CGGCAGGTTTCATCCAGGAG و ' 3'-TAACAGCACGCCGGAAGTGA-5' انجام شد. به ترجمه و بومی سازی pEGFP-N1 در اشباح باکتریایی، در هیبریداسیون درجا با پروب CY-3 برچسب به دست آمده توسط تقویت ژن EGFP با استفاده از 5'-oligonucleotides  
' 3'-GGTGAGCAAGGGCGAGGAG و ' 3'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATG-5' با استفاده از اشباح رنگ آمیزی با 0.25 میکروگرم / میلی لیتر MitoTracker سبز FM انجام شد. اشباح بارگذاری شده با میکروسکوپ کانونی با استفاده از مقاطع محور Z با یک فاصله ماکزیمم برابر  $0.122 \mu\text{m}$  آنالیز گردید.

## آزمایشات انتقال عفونت

ماکروفازهای RAW264.7 در محیط کشت RPMI 1640 با مکمل 5% l-glutamine, 10% FBS, and 5 × 10<sup>-5</sup> M 2-ME کشت شدند. PBMC جدا شده از کت اورنج از اهدا کنندگان سالم توسط سانتریفوژ تراکم در RPMI 1640 استفاده و اجازه به پایبندی به صفحات پلاستیکی به مدت 2 ساعت قرار گرفتند. سلول های چسبنده به مدت 6 روز در محیط همراه با GM-CSF و 1000 U / (IL-4 میلی لیتر) کشت داده شدند و برداشت در روز 7. ماکروفازها و DC در صفحات 24 و همچنین در تراکم کشت داده شدند / 105 × 1 خوب و با اشباح باکتریایی لود شده با pEGFP (500 باکتری / سلول) به مدت 2 ساعت، شسته به حذف اشباح رها شده در انکوباتور، و بیشتر به مدت 48 ساعت انکوبه شدند. سپس سلول، جدا شد با 4٪ پارافرمالدهید ثابت، و برای بیان EGFP با روش فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. رنگ آمیزی ایمنی EGFP با استفاده از Ab های انتی EGFP خرگوش پلی کلنال و انتی خرگوش بز پلی کلنال کونژوگه R-PE اجرا گردید.

## مطالعات ایمنی زایی

موش های شش تا هشت هفته ای ماده (BALB/c (H-2d از شرکت Harlan-Winkelmann (Borchen, Germany) خریداری گردید و تحت شرایط استاندارد طبق خط مشی های موسساتی، محلی و

کمیته اروپا حفظ گردید. همه آزمایش های کمیته اخلاق محلی مستقل تایید شد. گروه حیوانات (N = 5) در روزهای 1، 42 و 21 توسط هر داخل جلدی واکسینه شدند، و (ID)، تزریق 20 میکرولیتر به سمت عقب (و یا IM) تزریق از 20 میکرولیتر به عضله چهار سر (مسیر با اشباح لود شده با 109 CFU  $pCMV\beta$ ، میکروگرم 210 شامل 5 میکروگرم از DNA،  $pCMV\beta$  تنهایی 5 میکروگرم، و یا اشباح تخلیه. پلاسمید  $pCMV\beta$  شامل ژن  $\beta$ -گالاکتوزیداز-پشتیبانی می کند تحت کنترل پروموتور ژن اوایل فوری. CMV. نمونه سرم در روزهای 0، 21، 42، و 52 جمع آوری شد. نمونه های سرم در روزهای 0 و 21 و 42 و 52 جمع آوری گردید. موشها در روز 52 کشته شده و طحال برداشته شده و ذخیره سازی گردید. یک آزمایش نماینده از سه تا نشان داده شد.

### سنجش Ab

سرمهای موش های منفرد برای حضور بتاگالاکتوزیداز و Ab های خاص اشباح با تست ELISA با استفاده از پلیت های 96 چاهکی با پوشش 100  $\mu$ l/well بتا گالاکتوزیداز (5  $\mu$ g/ml) یا لیزات های اشباح (1  $\mu$ g/ml) در بافر کربنات 0.05 M با (pH 9.6) اندازه گیری گردیدند. تیتراهای نقاط پایانی به شکل لگاریتم دوطرفه آخرین رقت بیان گردید که یک OD در 405 نانومتر 0.1 U بالای مقادیر کنترل های منفی را بدست می دهد.

### اندازه گیری های پرولیفراسیون

سلولها طحال به تعداد  $1 \times 10^6$  cells/ml در محیط کشت کامل RPMI 1640 تنظیم شد و 100  $\mu$ l/well در پلیت میکروتیتر 96 چاهکی ته پهن در حضور غلظتهای مختلف بتاگالاکتوزیداز دانه گذاری گردید. بعد از سه روز سلولها با  $1 \mu$ Ci of [ $^3$ H]thymidine پالس گذاری شدند. شانزده ساعت بعد سلولها برداشت شده و ترکیب تیمیدین در یک شمارشگر چشمک زن اندازه گیری گردید.

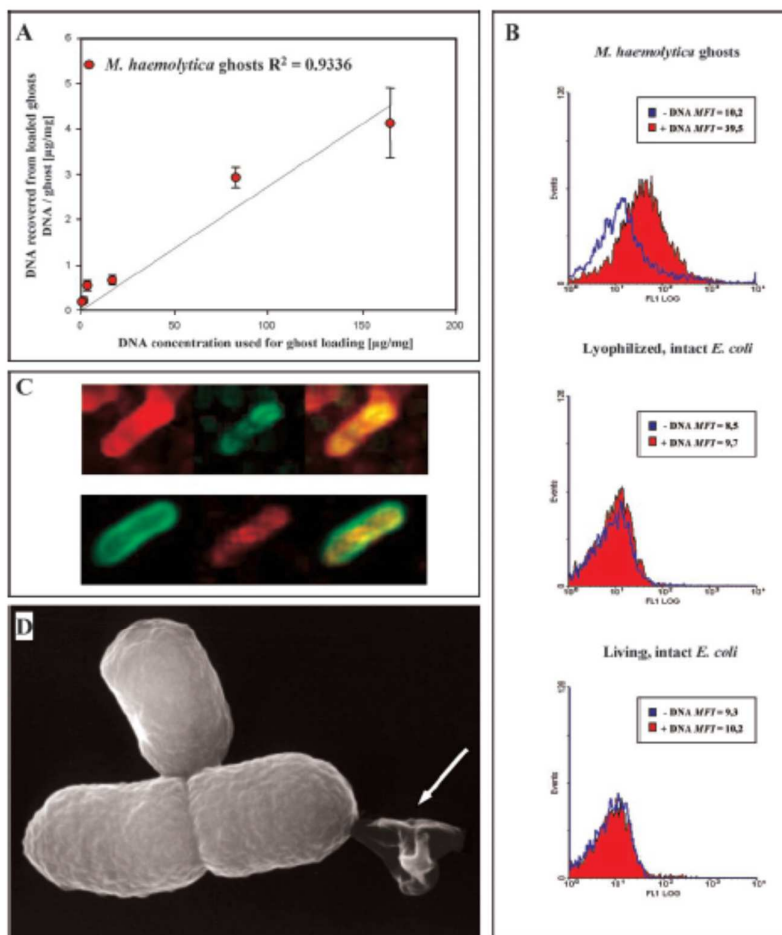
### اندازه گیری های IFN- $\gamma$ ELISPOT

سلولهای  $CD8^+$  T به طور منفی با استفاده از مهره های انتی  $CD4$  غنی سازی گردید. برای تعیین غلظت IFN- $\gamma$  ترشح سلول های  $CD8 + T$ ، IFN- $\gamma$  موش ELISPOT کیت BD (علوم زیستی، سن خوزه، CA) استفاده شد. سلول های  $5 \times 10^5$  (خوب 16) ساعت با یا بدون یک پپتید 10 (میکروگرم / میکرولیتر) مربوط به immunodominant-LD محدود  $\beta$ -گالاکتوزیداز اپی (TPHPARIGL) است، که خاص برای

MHC ارائه کلاس من انکوبه شدند. بعد از 16 ساعت، سلولها برداشته شده و  $\gamma$ -IFN به طور موضعی تولید شده منفرد مشتق از سلول با یک واکنش ایمنوانزیمی به یک ماتریس کاغذی به شکل نقطه های رنگی آشکار گردید که با یک دستگاه ثبت ELISPOT شمارش گردید.

#### تهیه و آنالیز سیتومتری جریان DC موشی

DC اولیه مشتق از مغز استخوان از موشهای BALB/c با استفاده از rGM-CSF تهیه گردید. - شبیح درمان DC (1 × 10<sup>6</sup>) با استفاده از ضد موش CD32 / 16 آپ به مدت 15 دقیقه شد. سپس سلول ها با monoclonals FITC نشاندار در برابر موس MHC کلاس (SF1-1.1) او کلاس (AMS-32.1) II، CD80 (16-10A1)، CD86 (GL1)، CD40 (3/23)، و یا (CD54 رنگ آمیزی شد) 3E2، همراه با ABS-PE برچسب مقابل (BD PharMingen) CD11c (HL3) کنترل منفی، - FITC یا ABS کنترل PE-isotype مزدوج استفاده شد. تجزیه و تحلیل FACS 20، 000 حوادث با استفاده از یک FACSsort و نرم افزار CellQuest (BD) علوم زیستی (با راهگاهی در سلول CD11c مثبت انجام شد. مطالعات کنترل، DC با LPS از سالمونلا سرووار سالمونلا انتریکا (سیگما آلدریچ) در 1 میکروگرم / میلی لیتر انکوبه شدند. میزان IL-6 و IL-1 $\alpha$  و IL-12p40 در مایعات لایه رویی بعد از شبیه سازی اشباح DC با ELISA به کمیت در آمدند.



**تصویر 1-** خواص DNA-لود اشباح *M. haemolytica*، زمان واقعی PCR مطالعات مجاز به ایجاد که یک همبستگی خطی بین غلظت DNA مورد استفاده برای بارگذاری شبیح و مقدار DNA وجود دارد پس از شستشو بازیافت شود. هر نقطه متوسط اندازه گیری در چهار نسخه تهیه  $\pm$  SD است. هر آزمایش را حداقل دو بار تکرار شد B.، قابلیت بارگذاری از اشباح باکتریایی و باکتری ها دست نخورده با استفاده از dsDNA خطی FITC نشاندار (400 جفت باز) مقایسه شد. در حال بارگذاری موفق منجر به تغییر در میانگین شدت فلورسانس C.، مطالعات Colocalization از dsDNA خطی FITC نشاندار در sulforhodamine-B برچسب *M. haemolytica* (پانل فوقانی) نشان داد که DNA لود (سبز) با داخل کشور، از اشباح باکتریایی (قرمز) همراه بود. علاوه بر این، بدون برچسب اشباح *M. haemolytica* (با pEGFP-N1 قسمت پایین) قرار گرفته است. پلاسمید pEGFP-N1 توسط در هیبریداسیون درجا با پروب CY-3 برچسب (قرمز) خاص برای EGFP تشخیص داده شد، و غشاهای شبیح با MitoTracker (سبز) FM رنگ آمیزی شد.



photomicrographs فلورسانس نشان دهنده مقطع از طریق اشباح باکتریایی D<sub>2</sub>، وضوح بالا انتشار درست میکروسکوپ الکترونی اسکن پروتئین E-lysed باکتری های گرم منفی. فلش نشان می دهد جریان از سیتوپلاسم باکتری در نقطه زمان لیز شروع طریق E-خاص تونل لیز.

### مطالعات انتقال عفونت Ex vivo DC

DC اولیه مشتق از مغز استخوان با هم با اشباح بارگذاری شده  $\beta$ CMVp انکوبه گردید (DC: نسبت اشباح 1:10) در  $37^{\circ}\text{C}$  (5% CO<sub>2</sub>) برای 16 ساعت انکوبه گردید. سپس DC توسط سانتریفوژ متمرکز شد، شسته شده، اتفاده در استریل PBS، و تزریق داخل وریدی مسیر را به موش BALB / c ماده (DC  $1 \times 10^6$  در هر حیوانی، N = 3). نمونه های سرمی در روز 11 جمع اوری گردید و طحال ها برداشته شده و روز 20 پروسه گردید.

### تحلیل آماری

معنی داری آماری تفاوت بین دو گروه از میانگین ها و انحراف معیار تست دو طرفه t student روی داده های تغییر شکل یافته ( $\log_{10}$ ) و بین بیش از دو گروه با ANOVA ی یکطرفه تعیین گردید. تفاوتها با  $p > 0.05$  غیرمعنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

اشباح *M. haemolytica* می تواند به طور کارآمدی با DNA پلاسمید بارگذاری شوند.

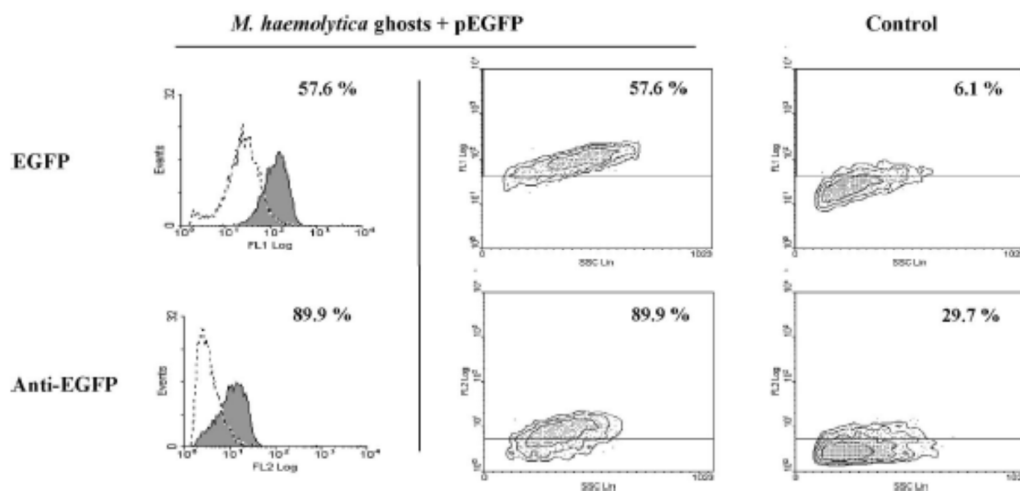
اشباح *M. haemolytica* با پلاسمید pEGFP-N1 بارگذاری گردیده که حاوی یک ژن حاوی *egfp* تحت کنترل پروموتور CMV می باشد. همبستگی خطی بین غلظت DNA استفاده می شود و مقدار pEGFP بهبود از اشباح باکتریایی (ضریب همبستگی = 0.934) در محدوده غلظت (0.033-16.5 DNA میلی گرم / میلی لیتر (مورد آزمایش قرار (شکل A1) مشاهده شد. تعداد اشباح باکتریایی نگاه با آنالیز سیتومتری جریان برای تعیین متوسط نسخه پلاسمید در شبیح (تقریباً 2000 نسخه) تعیین گردید که منطبق با  $5 \mu\text{g}$  از pEGFP/mg پروتئین باکتریایی است.

برای تحقیق درباره اینکه آیا DNA پلاسمید مرتبط با سطح داخلی یا خارجی اشباح می باشد یا خیر، ما ظرفیت اشباح *M. haemolytica* را برای بارگذاری با مال *Escherichia coli* زنده غیرفعال غیرلیفولیز و لیفولیز

مقایسه کردیم. برای این منظور، FITC نشاندار dsDNA خطی (400 جفت باز) (برای بارگذاری (شکل 1B)) مورد استفاده قرار گرفت. تغییر مشخص در میانگین شدت فلورسانس از اشباح لود در مقایسه با کنترل اشباح خالی مشاهده شد. در مقابل، فلورسانس سلول به E. coli دست نخورده (شکل 1B) اصلاح نشد. سپس sulforhodamine-B برچسب اشباح M. haemolytica لود شده با dsDNA FITC نشاندار شده توسط میکروسکوپ کانفوکال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت dsDNA FITC نشاندار (سبز) در اشباح باکتریایی (قرمز) واقع شد، به عنوان روکش از microphotographs فلورسانس از بخش Z-اسکن از طریق اشباح باکتریایی (شکل 1C) نشان داده شد. برای رد کردن تاثیر بالقوه از فلوئورساز در تمایل اتصال DNA به اشباح باکتریایی، اشباح بدون برچسب با pEGFP-N1 لود شد. پلاسمیدها لود متعاقبا توسط فلورسانس در هیبریداسیون درجا با استفاده از پروب -3-CY برچسب EGFP-خاص تشخیص داده شد، در حالی که غشاء شبح با MitoTracker سبز FM رنگ آمیزی شد. بخشهای اسکن Z اشکار کرد که pEGFP-N1 (قرمز) همراه با داخل اشباح (سبز) بوده اما نه با خارج (تصویر 1C) که به موجب آن تایید کننده نتایج بدست آمده از dsDNA خطی با نشان FITC می باشد.

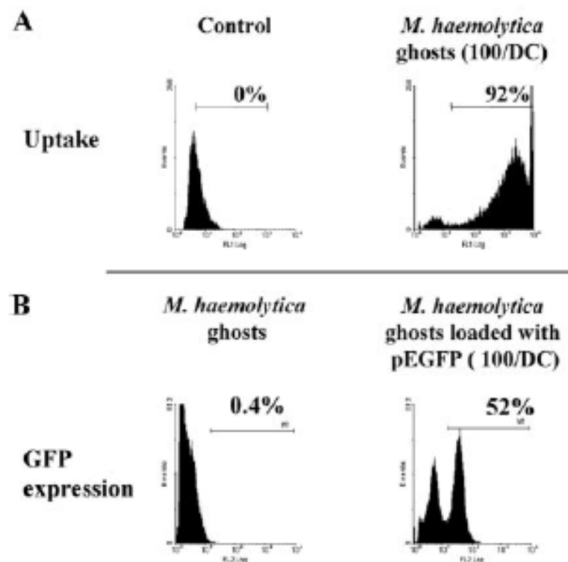
#### انتقال عفونت با واسطه اشباح ماکروفاژها و DC منجر به بیان کارآمد EGFP می گردد.

ماکروفاژها با اشباح باکتریایی بارگذاری شده با pEGFP-N1 برای 2 ساعت انکوبه، شسته و باز برای 48 ساعت انکوبه شدند تا امکان بیان فنوتیپی EGFP را بدهند. تغییر فلورسانس مشاهده فلوسایتومتری  $51.5 \pm 1.6\%$  از ماکروفاژها (شکل 2) بیان کارآمد از EGFP نشان داده است. برای نتیجه گیری مصنوعات احتمالی ما که از اتوفلورسانس ماکروفاژ ناشی می شود، EGFP نیز با استفاده از Abs اولیه ضد EGFP و Ab های ثانویه ضد IgG کونژوگه PE (تصویر 2) شناسایی شدند که به موجب آن تایید گردید که تقریبا  $60.1 \pm 2.4\%$  از سلولها ترانس ژنی بیان شدند.



تصویر 2- بیان EGFP توسط ماکروفاژها RAW264.7 پس از مصرف از اشباح *M. haemolytica* لود شده با 2600~ pEGFP پلاسمیدها /شبح). پوشش از نمودار هیستوگرام نشان می دهد یک تغییر مشخص در فلورسانس سلولهای تحت درمان با اشباح pEGFP (خاکستری، پر توپر) در مقایسه با سلول های تحت درمان با اشباح باکتریایی به تنهایی (سیاه و سفید تخم، پر نشده)، به عنوان یک نتیجه از هر دو فلورسانس ( EGFP پانل های بالا ) و یا تشخیص ایمونوشیمیایی از EGFP با ABS خرگوش پلی کلونال و R-PE-مزدوج شکم ضد خرگوش. اعداد نشان می دهد درصد از سلول های EGFP- بیان شده توسط تجزیه و تحلیل طرح نقطه بررسی قرار گرفت. یک آزمایش نماینده پنج نشان داده شده است.

مطالعات اضافی برای مشخصه سازی ظرفیت اشباح بارگذاری شده DNA برای انتقال عفونت DC انسانی اولیه تحویل شده با ماکروفاژ اجرا گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که اشباح باکتریایی هستند موثر با DC گرفته شده تحت درمان به نسبت 100 اشباح DC: (شکل 3). پس از 10 دقیقه، 87 درصد از DC شامل اشباح باکتریایی، که فلات بعد از 20 دقیقه  $\geq 92$  (%) رسیده است. DC انتقال عفونی نیز قادر به بیان موثر ترانس ژن بنا به سیتومتری جریان است (تصویر 3).

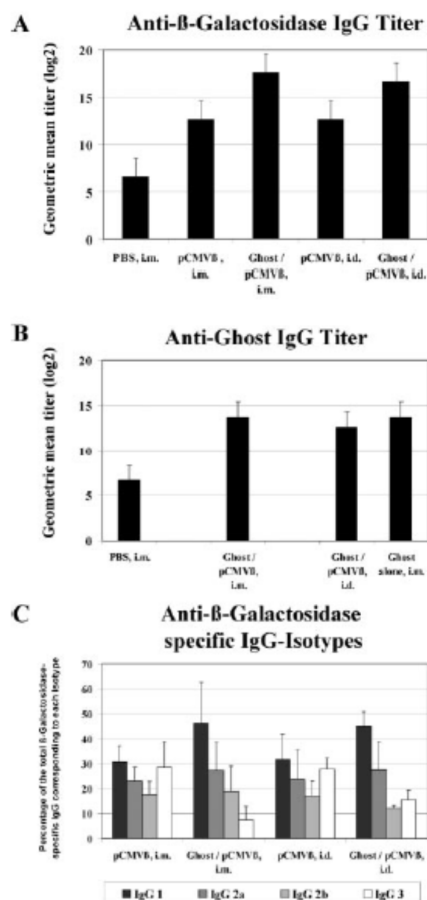


**تصویر 3-** مونوسیت ماکروفاژ مشتق از انسان DC هستند موثر با استفاده از pEGFP لود اشباح *M. haemolytica* انتقال. اشباح هستند تا 92 درصد از DC گرفته شده زمانی که به مدت 2 ساعت در یک شبخ درمان نسبت DC از 1: 100، تا 52٪ از حاضر DC در تهیه قادر به ابراز EGFP، به عنوان روش فلوسایتومتری پس از رنگ آمیزی ایمنی تعیین شد. یک آزمایش نماینده از سه، که با استفاده از سلول های از اهدا کنندگان مختلف انجام شد، نشان داده شده است.

واکسیناسیون DNA با میانجی گری اشباح باعث تحریک روشن سازی پاسخ های ایمنی کارآمد می شود. برای روایی سازی کارایی اشباح باکتریایی به شکل سیستم تحویل DNA، گروه های موش ها (تعداد 5) با مسیر *i.m.* یا *i.d.* با یا 5  $\mu\text{g}$  پلاسمید pCMV $\beta$  واکسیناسیون شدند که حاوی ژن کدگذاری کننده بتاگالاکتوزیداز، خود اشباح به تنهایی، یا اشباح بارگذاری شده با 5  $\mu\text{g}$  از pCMV $\beta$  در روزهای 1 و 21 و 42 می باشد. حیوانات واکسینه با اشباح هیچ گونه علائمی از سمیت حاد یا نیمه حاد را طی زمان مشاهده نشان نمی دهند که به موجب آن نشان می دهد که اشباح باکتریایی به خوبی تحمل می شوند.

پاسخ های Ab سرمی کارآمد در حیوانات واکسینه از لحاظ کنترل مستقل از مسیر ایمنی زایی تحریک گردید. حداقل یک دستور تیترا قدر بالاتر ضد  $\beta$ -گالاکتوزیداز در حیوانات دریافت اشباح DNA-لود در پایان پروتکل ایمن سازی با توجه به حیوانات DNA-واکسن برهنه ( $P < 0.05$ ، شکل a4) مشاهده شد. استفاده از اشباح پاسخهای ایمنی حتی پس از یک دوز واحد تحریک، در حالی که حداقل یک افزایش اضافی زمانی که حیوانات با

DNA برهنه واکسینه شدند لازم بود. شبخ خاص شکم نیز در حیوانات دریافت فرمولاسیون مبتنی بر روح توسط هر ID مشاهده شد و یا m. امیسیر (شکل 4B). این امر تایید می کند که رهیافت واکسیناسیون DNA مبتنی بر اشباح می تواند بررسی گردد تا واکسن های چندظرفیتی قادر به حفاظت علیه بیماریهای ایجاد شده توسط میکروارگانسیم بکار رفته برای تولید اشباح باشند.

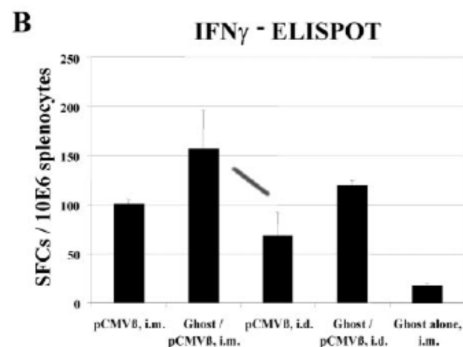
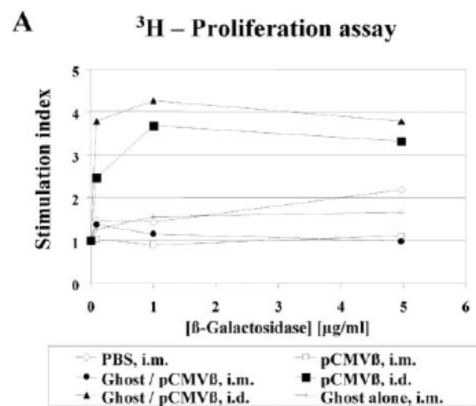


تصویر 4- پاسخ ایمنی هومورال کارآمد در موش BALB / c تحریک (N = 5) پس از واکسیناسیون با DNA-لود اشباح A. *M. haemolytica*. β-گالاکتوزیداز و B، پاسخ IgG ضد شبخ خاص در سرم موش واکسینه شوند. نتایج به log<sub>2</sub> متقابل از میانگین تیتر نقطه پایان هندسی بیان شده است SEM. توسط خطوط عمودی نشان داد. C، پروفیل isotype از β-گالاکتوزیداز خاص شکم IgG در حال حاضر در سرم موش واکسینه شوند. نتایج به دست آمده به طور متوسط از نمونه سه نسخه.

برای ارزیابی اینکه زیرجمعیت Th تحریک شده است یا خیر، توزیع زیررده بتاگالاکتوزیداز خاص IgG Abs ارزیابی گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که هر دو IgG 1 و IgG 2a Abs در حیوانات واکسینه (شکل 4C)

تحریک شد. با این حال، سطوح مشابهی از هر دو isotypes در موش واکسینه با DNA برهنه (مخلوط وابسته به Th1 الگوی Th2 / در (مشاهده شد، در حالی که  $P < 0.05$ ) افزایش قابل توجهی در مونوکلونال IgG1 همراه با کاهش در IgG3 در حیوانات-شبح واکسینه تشخیص داده شد. با این حساب، علی رغم این حقیقت که اجزای Th1 و Th2 هنوز وجود دارند، یک تغییر به سمت یک الگوی پاسخ Th2 بارزتر با استفاده از اشباح به شکل یک سیستم تحویل DNA بدست آمد که حاکی از آنست که مودوله سازی پاسخ اصلی Th با استفاده از این رهیافت امکانپذیر می باشد.

برای ارزیابی کارایی پاسخ های ایمنی سلولی تحریک شده با واکسیناسیون DNA با میانجیگری اشباح، ظرفیت پرولیفراسیون سلولهای طحال بعد از تحریک مجدد در حضور بتاگالاکتوزیداز ارزیابی گردید. پاسخ پرولیفراتیو کارآمد فقط در موش واکسینه توسط ID مشاهده شد مسیر (شکل 5A). اگر چه تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود ( $P > 0.05$ )، شاخص تحریک کمی بهتر در حیوانات دریافت آماده سازی شبح مشاهده شد. این داده ها نشان داد که نیز پاسخ های سلولی کارآمد می تواند با استفاده از رهیافت مبتنی بر اشباح تحریک گردد.



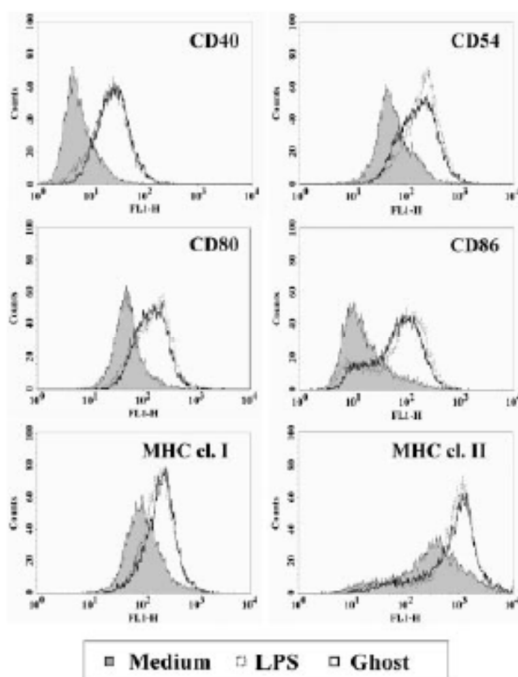
**تصویر 5-** پاسخ های ایمنی سلولی در موش پس از واکسیناسیون با DNA-لود اشباح *M. haemolytica* تحریک، گسترش سلاح های بعد از 4 روز از تحریک مجدد در سلولهای طحال در حضور غلظت های مختلف  $\beta$ -گالاکتوزیداز، با اندازه گیری اختلاط  $[3H]$  thymidine مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به نسبت بین ارزش (به طور متوسط از سه تکرار) از نمونه تحریک و ( *nonstimulated* شاخص تحریک (بیان شده است SEM. کمتر از 10٪ بود.  $CD8 + T$ ، آماده سازی سلول غنی از سلول های طحال  $105 \times 5$  (خوب) به مدت 16 ساعت در حضور یک پپتید شامل یک کلاس I-MHC محدود اپی انکوبه شدند، و تعداد  $IFN-\gamma$  اتولید سلول مشخص شد توسط ELISPOT. ارزش ابزار حسابی از سه تکرار کم از آن به دست آمده از سلول های *nonstimulated* هستند. خطوط عمودی نشان می دهد SEM.

برای تکمیل مطالعه پاسخ های ایمنی سلولی تحریک شده توسط تحویل DNA با واسطه گری اشباح، نیز به ارزیابی ظرفیت  $CD8+ T$  سل ها برای تولید  $IFN-\gamma$  در پاسخ به تحریک با یک پپتید پوشاننده یک MHC رده I اپیتوپ بارز ایمنی محدود را از بتا گالاکتوزیداز ارزیابی کردیم. تعداد بالا سلولهای ترشح کننده  $IFN-\gamma$  با استفاده از سلولهای T غنی از  $CD8+$  بازیابی شده از حیوانات واکسینه با اشباح بارگذاری شده  $pCMV\beta$  نسبت به تست T سل ها از موش واکسینه با  $pCMV\beta$  برهنه شناسایی گردید (تصویر 5B).

#### اشباح *M. haemolytica* تحریک کننده بلوغ و فعالسازی DC موشی مشتق از مغز استخوان

روشن سازی پاسخ های ایمنی بهبود یافته بعد از تحویل واکسن های DNA توسط اشباح باکتریایی، و مودوله کردن مشاهده شده (یعنی الگوی پاسخ تغییر یافته Th) حاکی از آنست که اجزای اشباح می تواند بر پروسه سازی Ag اثر داشته باشد. از آنجا DC هستند APC قوی ترین، ما تصمیم به بررسی اثر اشباح *M. haemolytica* بر بلوغ و فعال شدن موش مغز استخوان مشتق DC. خام و ناقص DC در شرایط آزمایشگاهی به مدت 16 ساعت یا با اشباح و یا، به عنوان کنترل مثبت، با LPS تحریک شد. سپس نشانگر سطح در  $CD11c$  مثبت در دار DC توسط فلوسیتومتری بررسی قرار گرفت. بیش انکوباسیون با اشباح (50 شیخ DC / منجر به افزایش بیان MHC کلاس I و امولکول، که شبیه به این بود مشاهده با استفاده از 1 میکروگرم / میلی لیتر (LPS شکل 6). بیان مولکول  $CD80$   $\gamma$  تحریک همزمان و  $CD86$ ، و همچنین به عنوان که از مولکول

چسبندگی CD40 و CD54 نیز بود پس از درمان شبیح تا تنظیم می شود. نتایج مشابهی با استفاده از 25 یا 10 اشباح/DC بدست آمد (نتایج نشان داده نشده).



تصویر 6- تجزیه و تحلیل جریان cytometric از DC پس از تحریک با اشباح *M. haemolytica* مغز استخوان مشتق شده موش DC با 1 LPS میکروگرم / میلی لیتر (و یا اشباح 25 اشباح / سلول) به مدت 18 ساعت انکوبه همزمان و روش فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت CD11c + -gated DC. بیان افزایش نشانگرهای سطح مختلف پس از شبیح (خط پر) و یا (LPS خط نقطه چین) درمان در مقایسه با DC بدون تحریک منطقه سایه دار نشان داد.

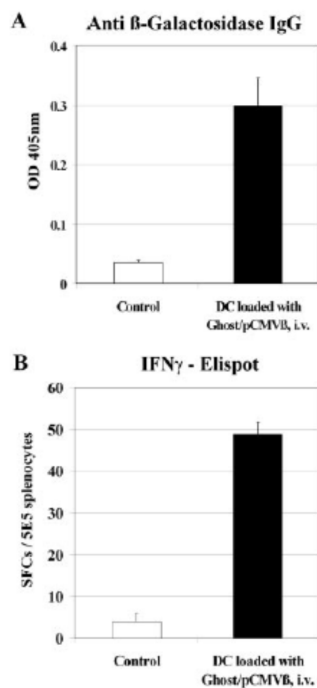
انگاه توانایی اشباح باکتریایی برای تحریک ترشح سیتوکین DC ارزیابی گردید. پس از تحریک با اشباح، تولید DC از IL-1α 2.4 برابر در مقایسه با بدون تحریک DC (296 PG / میلی لیتر) افزایش یافته بود. ترشح IL-6 نیز با 615 برابر (نانوگرم / میلی لیتر) نسبت به درمان نشده 0.25 (نانوگرم / میلی لیتر) افزایش یافته بود. در نهایت، محتوای L-12p40 در مایعات رویی از شبیح تحت درمان با 194 DC برابر 69 (نانوگرم / میلی لیتر) افزایش در مقایسه با سلول های غیر تحریکی 0.35 (نانوگرم / میلی لیتر) بود. نتایج بدست آمده نشان می دهد که پیش انکوباسیون DC نابالغ با اشباح منجر به فعالسازی و بلوغ سلولی می شود و به موجب آن توضیحی



است بر پاسخ های ایمنی بهبود یافته که با استفاده از اشباح باکتریایی به عنوان سیستم تحویل برای واکسن های DNA می باشد.

ایمنی زایی با DC که به شکل *ex vivo* با استفاده از اشباح *M. haemolytica* بارگذاری شده  $\beta$  pCMV پاسخ های ایمنی خاص بتا گالاکتوزیداز را تحریک می کند.

مطالعات بیشتری انجام گردید تا بینشی را به نقش DC در پاسخ های ایمنی تحریک شده با استفاده از اشباح به شکل سیستم تحویل DNA کسب کند. موش های *v. اوآکسینه* شدند مسیر با  $106 \times 1$  مغز استخوان مشتق DC، که انتقال داده شده بود در شرایط آزمایشگاهی با بردار  $\beta$  pCMV توسط انکوبه آنها را با پلاسمید لود اشباح *M. haemolytica* پاسخ آب ضد  $\beta$ -گالاکتوزیداز در تمام موش ها واکسینه (شکل 7A) مشاهده شد. علاوه بر این، افزایش در تعداد  $\gamma$ -تولید IFN سلول های طحال در حیوانات واکسینه، به تحریک مجدد یا *restimulation* با یک پپتید شامل کلاس I-MHC محدود اپی ایمنی زایی از  $\beta$ -گالاکتوزیداز (شکل 7B) مشاهده در پاسخ شد. این نتایج حاکی از آنست که DC یک نقش مهمی را در روشن سازی پاسخ های ایمنی بازی می کند هنگامی که اشباح باکتریایی به شکل یک سکوی مشترک تکنولوژی برای تحویل واکسن های DNA استفاده می شوند.



تصویر 7- پاسخ های ایمنی تحریک شده توسط DC در شرایط آزمایشگاهی با  $\beta$ CMVpلود اشباح M. *haemolytica* انتقال، پاسخ  $\beta$ -گالاکتوزیداز خاص IgG سرم 11 روز پس از واکسیناسیون B، سلول های /  $105 \times 5$  (خوب) به مدت 16 ساعت در حضور یک پپتید شامل یک کلاس I-MHC محدود اپی توپ، و تعداد  $\gamma$ -IFN تولید سلول های ELISPOT مشخص شد انکوبه شدند. ارزش ابزار حسابی از سه تکرار کم از آن به دست آمده از سلول های غیر تحریک شده هستند. خطوط عمودی نشان می دهد SEM

## بحث

مفهوم استفاده از DNA برهنه برای اهداف ایمنی زایی نقش بزرگی در حوزه واکسن شناسی دارد. این رویکرد جدید می تواند باعث به طراحی واکسن هر دو پیشگیری و درمان در برابر طیف گسترده ای از بیماری های عفونی و غیر عفونی. با این حال، اجرای دسته جمعی در این زمینه توسط ایمونیزایی فقیر به طور کلی، که منجر به نیاز به دوزهای پلاسمید بالا مختل. این بهره وری کم را می توان با این واقعیت است که AGS کد گذاری هستند به طور خاص به APC را هدف قرار نمی توضیح داد. با استفاده از شبیح باکتریایی به عنوان سیستم تحویل DNA می تواند این مشکل را حل کند. مطالعات *in vitro* ما نشان داده که اشباح *M. haemolytica* به طور موثری توسط ماکروفاژها و DC اولیه گرفته شده و به موجب آن منجر به تمایلات عفونت زایی بالایی می شود (52 تا 60 درصد).

این حقیقت که Ag ها در زمینه یک سیگنال خطر بهینه تحویل نمی شوند می تواند در ایمنی زای ضعیف واکسن های DNA نقش داشته باشد. در واقع، سیستم ایمنی بدن تکامل یافته است به رسمیت شناختن موجودیت باعث آسیب به جای آن خارجی است. بنابراین، APC تنها می تواند به درستی در حضور سیگنال های فعال دریافت شده از سلول های پاتولوژی تغییر (یعنی آلوده و یا نکروز)، اما نه از سلول های سالم و یا آپوپتوز. ارائه AGS توسط (DC غیرفعال به عنوان مثال، بدون تحریک همزمان یا *costimulation*) حتی ممکن است ترویج تحمل، در نتیجه منجر به فرار ایمنی بدن می شود. این رویدادهای مکانیستی بویژه زمانی مرتبط است که خود یا Ag خودی تغییر یافته در نظر گرفته شود (برای مثال ایمونوتراپی سرطان).

وقتی اشباح باکتریایی به شکل یک سیستم تحویل DNA رفتار می کنند، می توانند به شکل یک ادجوانت طبیعی به دلیل حضور اجزای پوشش بنا به شواهد از روی پاسخ های ایمنی بهبود یافته مشاهده شده بعد از

واکسیناسیون با کاندیداهای براساس اشباح عمل کنند. در واقع، مطالعات *in vitro* در استفاده از اولیه DC نشان داد که اشباح *M. haemolytica* ترویج بلوغ DC و فعال سازی انجام می شود. این می تواند عملکرد بهبود یافته از واکسن مبتنی بر روح را توضیح دهد. در مقابل، یک مشکل بالقوه در ارتباط با استفاده از یک سیستم تحویل به دست آمده از باکتری های گرم منفی حضور LPS (به عنوان مثال، اندوتوکسین) در ارتباط با پوشش سلولی است. با این حال، مطالعات قبلی نشان داد که دوز اشباح باکتریایی مورد نیاز برای ایجاد پاسخ ایمنی کارآمد می توان بدون که منجر به عوارض جانبی مربوط به اندوتوکسین اداره می شود. حداقل دو مرتبه غلظت LPS بالاتر تحمل زمانی که LPS به اشباح باکتریایی از زمانی که آن را در یک فرم آزاد است همراه است. با این حساب، محتوای LPS اشباح باکتریایی استفاده آنها را به شکل سیستم تحویل DNA محدود نکرده است.

ماهیت سیتوکین های آزاد شده طی پروسه فعالسازی نیز یک پارامتر مهم برای تعریف نوع پاسخ ایمنی تحریک شده است. طلاعات ما نشان می دهد که یک افزایش در ترشح IL-12 توسط DC در حضور اشباح باکتریایی وجود دارد. این سایتوکاین وابسته به-Th1 پلاریزه طرح اصلی یا نمونه، که به تنظیم تنگ در DC قرار است. با این حال، تنها یک اثر اندکی بر تولید IL-1 $\alpha$ ، که به عنوان IL-12 کوفاکتور برای توسعه وابسته به Th1 در موش عمل مشاهده شد. این، همراه با افزایش در IL-6، توضیح می دهد که تغییر در غالب توریم پاسخ از مخلوط وابسته به Th1 / Th2 در حیوانات در موش-شبح واکسن به یک الگوی Th2 در غالب واکسن با DNA برهنه، در نتیجه نشان دادن سودمندی این روش به لحن خوب پاسخ ایمنی بدن را برانگیخته است. جالب توجه است، ما نیز افزایش در تعداد سلول  $\beta$ -گالاکتوزیداز خاص-IFN- $\gamma$  تولید CD8 + T در حیوانات-شبح واکسن، مشاهده در پاسخ به تحریک مجدد یا *restimulation* با یک پپتید شامل کلاس-I MHC محدود اپی. این را می توان در ظرفیت APC برای پردازش و در حال حاضر MHC کلاس-I محدود AGS توضیح داد، حداقل در بخشی، توسط بهبود وابسته به اشباح. در واقع، ما تنظیم در بیان MHC کلاس I و مولکول با تحریک همزمان در درمان-شبح DC مشاهده شده است. علاوه بر این، اگر چه کاهش می یابد، سلول های وابسته به Th1 باقی مانده همچنین می توانید به پاسخ کلی کمک می کند. مطالعات ایمن سازی با شرایط آزمایشگاهی انجام انتقال DC نشان می دهد که این سلول ها نقش مهمی در تحریک پاسخ ایمنی در هنگام اشباح باکتریایی به عنوان یک سیستم تحویل DNA مورد استفاده قرار بازی. وابسته به شبح القاء واسطه پیش التهابی نیز ممکن است ایجاد

یک محیط محلی رسانا به ارائه Ag، که به نفع استخدام کارشناسی ارشد ایمنی ذاتی، در نتیجه ارتباط ایمنی ذاتی و تطبیقی را تسهیل میکند. در کل نتایج بدست آمده روشن کننده پیچیدگی و پلیوتروپیسم اثرات تحریک شده توسط اشباح باکتری طی تحریک پاسخ های ایمنی سازگارانه می باشد.

مطالعات قبلی نشان داده که اشباح باکتریایی یک سیستم تحویل واکسن موثر برای تحریک پاسخ های ایمنی همورال و ایمنی سلولی قوی علیه خود اشباح یا Ag های مخرب می باشد. بنابراین، اشباح دارای DNA همچنین می تواند به عنوان واکسن در برابر بیماری های ناشی از میکروارگانیزم ها برای آماده سازی شبیح انتخاب استفاده قرار گیرد. استفاده از باکتری های زنده به عنوان حامل برای سازه واکسن DNA به منزله یک جایگزین معتبر می باشد. با این حال، استفاده از بردارها زنده ممکن است با نگرانی های ایمنی همراه است، به خصوص زمانی که آزادی تحت شرایط بدون پوشش یا استفاده برای افراد دچار نقص ایمنی در نظر گرفته شده است. برعکس اشباح باکتریایی غیرزنده می تواند در دوزهای بالا بدون نگرانی های ایمنی تزریق گردد.

در پایان، پلاسمید کدگذاری کننده بتاگالاکتوزیداز به طور موثر به سلولهای هدف تحویل داده می شود که به طور مناسبی نسخه برداری و ترجمه می شود. پروتئین سنتز قادر به تحریک همورال کارآمد و پاسخ های ایمنی سلولی بود. بنابراین، اشباح باکتریایی تشکیل یک تکنولوژی نویدبخش برای توسعه واکسن DNA کارآمد تر را می دهند. تولید اسان، هزینه تولید کم و ایمنی عالی اشباح باکتریایی تشکیل دهنده مزیت های اجرایی در حجم وسیع است.



این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی