جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

**Original Article**

# Cellular Immune Response Following Neonatal Mice Immunization with Vesicular Stomatitis Virus

**Fatemeh Sobhanimonfared[1], Taravat Bamdad[2*], Zohreh Azita Sadigh[3], Hadi Razavi Niko[4], Hamzeh Choobin[4]**

1- M.Sc. Student, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associated Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Ph.D., Head of M.M.R. Vaccine Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran
4- Ph.D. Candidate, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
*Email: bamdad_t@modares.ac.ir*

**Received: 19/May/2014, Accepted: 14/Jun/2014**

## Abstract

**Objective:** Infectious microorganisms are major sources of illness and death worldwide, and the leading cause of death in neonates. Effective vaccination of this age group is of particular importance. The lack of a response and greater susceptibility to tolerance are two major features that limit the effectiveness of vaccines in neonates. In this study we compare the cellular immune response generated following antigen injections at different times of life in newborn mice to that of adult mice.

**Methods**: Adult and different age neonate mice were vaccinated with vesicular stomatitis virus (VSV). One week after the last injection, cellular immunity was assayed on spleen cells that targeted EL4 infected cells using lactate dehydrogenase cytotoxicity assay.

**Results**: Antigen injection induced a decreased immune response in newborn mice compared with mice that had been immunized with subsequent injections. In the adult group, due to the evolution of the immune system, we observed a stronger immune response.

**Conclusion**: Immunization of newborn mice may induce a reduced response when compared to adult vaccinations. However this can be corrected by the administration of additional booster doses.

**Keywords:** Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Immunization, Tolerance, Neonate Mice, Lactate Dehydrogenase Assay

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 2, Summer 2014, Pages: 49-57

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

**مقاله اصیل**

# ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی به دنبال ایمنی‌زایی نوزاد موش با ویروس وزیکولار استوماتیت

**فاطمه سبحانی منفرد[۱]، طراوت بامداد[۲*]، زهره آزیتا صدیق[۳]، هادی رضوی نیکو[٤]، حمزه چوبین[٤]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی، گروه واکسن‌های ویروسی سرخجه، سرخک، اوریون، انستیتو تحقیقات سرم و واکسن رازی، کرج، ایران
۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی
Email: bamdad_t@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۰۲/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۳/۲۴

## چکیده

**هدف:** میکروارگانیسم‌های عفونت‌زا یکی از منابع اصلی بیماری و مرگ در سراسر جهان بوده و یکی از علل اصلی مرگ در دوران نوزادی انسان‌ها به‌شمار می‌روند بنابراین واکسیناسیون مؤثر در این گروه سنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بی‌پاسخی و یا پاسخ ایمنی کاهش یافته دو خصوصیت عمده ایمنی نوزادی است که کارآیی واکسن‌ها را محدود می‌کند. در این پژوهش پاسخ‌های ایمنی سلولی ایجاد شده به دنبال تزریق آنتی‌ژن در دوره‌های مختلف سنی موش‌های نوزاد با موش‌های بالغ مقایسه شده است.

**مواد و روش‌ها:** موش‌های بالغ و نوزاد در سنین مختلف پس از تولد با ویروس وزیکولار استوماتیت واکسینه شدند و یک هفته پس از تزریق ویروس یا دوزهای یادآور فعالیت سلول‌کشی سلول‌های ایمنی روی سلول‌های طحال با استفاده از سلول‌های هدف EL4 (رده سلولی لنفومای موشی) که با ویروس آلوده شده بودند و روش سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز با کیت لاکتات دهیدروژناز ارزیابی شد.

**نتایج:** نتایج به‌دست آمده نشان داد که تزریق آنتی‌ژن در بدو تولد منجر به القای پاسخ کاهش یافته در نوزادان موش در مقایسه با موش‌هایی می‌شود که تزریقات بعدی آنتی‌ژن را داشتند. همچنین در گروه بالغین به دلیل تکامل سیستم ایمنی پاسخ‌های بیشتر ایمنی مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به‌دست آمده نشان داد که ایمنی‌زایی موش‌های نوزاد ممکن است یک پاسخ ایمنی کاهش یافته‌ای را در مقایسه با واکسیناسیون موش‌های بالغ القا کند که با تزریق دوزهای یادآور جبران می‌شود.

**کلیدواژگان:** ویروس وزیکولار استوماتیت، ایمنی‌زایی، بی پاسخی، نوزاد موش، آزمایش لاکتات دهیدروژناز

**مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحات: ۴۹-۵۷**

## مقدمه

میکروارگانیسم‌های عفونت‌زا یکی از منابع اصلی بیماری و مرگ در سراسر جهان بوده [۱] و بیماری‌های عفونی علت اصلی مرگ در دوران نوزادی انسان‌ها به‌شمار می‌رود [۲-٤]، بنابراین جلوگیری از این عفونت‌ها یک اولویت در سلامت عمومی و اولین هدف در تحقیقات واکسن است. واکسیناسیون یکی ازمؤثرترین مداخله‌های بشریت در پزشکی برای

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



جلوگیری از بیماری‌های انسانی به‌شمار می‌رود. تاکنون واکسن‌ها منجر به ریشه‌کنی آبله شده و شیوع تعدادی از بیماری‌های عفونی مانند سرخجه و پولیومیلیت (Poliomyelitis) را محدود کرده است. از آن‌جا که نوزادان از جمله آسیب‌پذیرترین جمعیت‌ها نسبت به بیماری‌های عفونی هستند واکسیناسیون مؤثر در این گروه سنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. چندین عامل در آسیب‌پذیری نوزادان به عفونت ویروسی دخالت دارد، اما مهم‌ترین و شاید ابتدایی‌ترین آن‌ها به بی‌پاسخی ایمنی در این گروه سنی مربوط می‌شود [۳، ۵-۷]. با وجود تلاش‌های فراوانی که در زمینه واکسیناسیون نوزادان شده است، حداقل دو عامل عمده باعث اختلال در کارآیی مناسب آن‌ها می‌شود. القا و توسعه پایدار پاسخ‌های ایمنی سلولی برای حفاظت علیه بسیاری از بیماری‌زاهای ویروسی حیاتی است، اما سیستم ایمنی نوزادان از لحاظ عملکردی در این قضیه نابالغ است. بلافاصله بعد از تولد سطوح سلول‌های T بالغ ۱۰۰۰ برابر کمتراز سلول‌های T بالغین است و دوزهای بالای آنتی‌ژن مانند آنتی‌ژن‌های مرتبط با عفونت ویروسی یا واکسن ویروسی زنده می‌تواند منجر به القای پاسخ سلول‌های T کمکی و در پی آن ناتوانی نوزادان در فراهم کردن سطوح محافظتی TCD8 شود. عامل دوم که منجر به شکست در واکسیناسیون نوزادان می‌شود، حضور آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی مادری است که به جنین یا کودک شیرخوار انتقال می‌یابد [۳].

عملکرد ناقص مونوسیت‌ها و ماکروفاژها در نوزادان به علت بیان ناکافی کمپلکس سازگاری نسجی (Major Histocompatibility Complex: MHC) یک و دو و مولکول‌های کمک محرک برای پردازش آنتی‌ژن و تولید سایتوکاین‌ها است. اگر چه در مورد بلوغ سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells) انسانی اطلاعات بسیار کمی در دسترس است ولی به‌نظر می‌رسد که بلوغ این سلول‌ها به کندی صورت می‌گیرد و عملکرد آن‌ها به‌عنوان سلول عرضه کننده آنتی‌ژن در ابتدای تولد ضعیف است و در نتیجه منجر به محدودیت‌هایی در القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در بدو تولد می‌شود.

سلول‌های کشنده طبیعی (Natural Killer Cells) نیز به تعداد قابل توجهی در زمان تولد حضور دارند ولی فعالیت عملکردیشان برای چندین هفته پایین است [۸]. بی‌پاسخی و یا پاسخ ایمنی کاهش یافته دو خصوصیت عمده ایمنی نوزادی است که کارآیی واکسن‌های به‌کاررفته طی این دوره را محدود می‌کند [۹]. تعداد زیادی از عوامل مانند دوز آنتی‌ژن، مکان و زمان تزریق، برنامه زمان‌بندی تزریق و شرایط رویارویی با آنتی‌ژن تعیین کننده این مطلب است که ایمنی‌زایی بی پاسخی محیطی را القا کند یا ایمنی محافظت کننده‌ای را ایجاد نماید [۱۰-۱۳]. به‌واسطه عدم بلوغ سیستم ایمنی، نوزادانی که با آنتی‌ژن‌های بیگانه برخورد می‌کنند با خطر توسعه بی پاسخی در مقایسه با القای ایمنی مواجه هستند [۱۲]. ایمنی‌زایی نوزادان با بعضی آنتی‌ژن‌ها مانند آلو آنتی‌ژن‌های (Alloantigens) بیان شده روی سلول‌های لنفوییدی بی‌پاسخی را القا می‌کند [۷].

حساسیت به القای بی پاسخی به سرعت با افزایش سن کم می‌شود و در یک هفته اول تولد ناپدید می‌شود. اغلب دوزهای بالاتر آنتی‌ژن‌ها بیشتر تولروژنیک است. سن نیز یک عامل ضروری و مهم است زیرا ایجاد بی پاسخی از ۸۵ درصد در موش‌های ۱-۲ روزه تا ۰ درصد در موش‌های ۷ روزه کاهش می‌یابد [۱۴]. موش‌های نوزادی که با واکسن زیرواحدی پروتئین آنفلونزا ایمن شده بودند در مقایسه با موش‌های بالغ پاسخ IgG (Immunoglobulin G) قابل توجهی را نداشتند. نحوه تزریق و جایگاه آن نیز منجر به ایجاد پاسخ‌های متفاوت ایمنی‌زایی یا القای بی پاسخی در ابتدای تولد می‌شود. موش‌های یک روزه که به‌صورت داخل عضلانی یا توسط تفنگ ژنی با پلاسمید دارای آنتی‌ژن ویروسی تزریق شده بودند، پاسخ‌های ایمنی هومورال مشابهی را با موش‌هایی که در دوران بلوغ ایمن شده بودند ایجاد کردند [۶]. واکسیناسیون با پپتیدهای ایمنی‌زا منجر به پاسخ‌های متفاوت بی پاسخی یا ایمنی و حتی واکنش‌های شدید منجر به مرگ می‌شود [۱۵].

مقایسه تزریق زیر جلدی پلاسمیدها و تزریق داخل مقعدی در نوزادان تازه متولد شده نشان می‌دهد که موش‌هایی

که در آن‌ها ایمنی‌زایی به‌صورت داخل مقعدی انجام شده بود تیتر آنتی‌بادی در مقایسه با موش‌هایی که تزریقات زیر جلدی داشتند کمتر بود. این قضیه راه‌های کاربرد موفقیت در شکست بی پاسخی را تعیین می‌کند [۱۰].

با توجه به این‌که ایجاد ایمنی در افراد به عوامل مختلفی بستگی دارد، سن و نحوه تزریق و نوع آنتی‌ژن از مهم‌ترین این عوامل در ایمنی‌زایی به شمار می‌رود.

در پژوهش حاضر به مقایسه میزان ایمنی سلولی ایجاد شده در سنین مختلف پس از تولد در اثر تزریق ویروس وزیکولار استوماتیت (Vesicular Stomatitis Virus: VSV) پرداخته شده و میزان کارآیی واکسیناسیون در دوره‌های زمانی مختلف بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلول و تکثیر ویروس

در این مطالعه تجربی سلول Vero برای کشت VSV استفاده شد. این سلول از کلیه میمون سبز آفریقایی، منشأ گرفته و از نوع سلول‌های پوششی است. این سلول از بانک سلول انستیتو پاستور ایران دریافت شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco، آمریکا) حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر) استرپتومایسن (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ۱۰ درصد FBS (Feteal Bovine Serum) کشت داده شد. بعد از مدت ٤٨ ساعت که سلول‌ها کاملاً سطح ظرف کشت را پوشاندند و برای کشت ویروس آماده شدند، VSV (که به‌صورت هدیه از دکتر بل، مرکز تحقیقات سرطان اوتاوا، کانادا، گرفته شده بود) [١٦]، در محیط بدون سرم کشت داده شد و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد $CO_2$ نگهداری شد. پس از تشکیل ضایعات سلولی، سلول‌ها طی ۳ مرتبه انجماد و ذوب تخریب و همراه با محیط واجد ویروس در ۱۵۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محیط رویی دارای ویروس جمع‌آوری و پس از تعیین تیتر به روش کربر (Karber) با تهیه رقت‌های لگاریتمی ده تایی و استفاده از فرمول (Log TCID50 = L-D (S- 0.5) L= منفی لگاریتم کمترین رقت، D= فاصله لگاریتمی رقت‌ها، S= مجموع نسبت‌های قسمت‌های مثبت)، در مقادیر کم تقسیم و تا زمان استفاده در ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

### حیوان آزمایشگاهی

موش‌های C57BL/6 نر و ماده بالغ ٦ تا ٨ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران فراهم و بر طبق راهنمای مراقبت از حیوانات در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند.

نوزادان حاصل از این موش‌های بالغ بعد از ۲۱ روز طبق برنامه زمان‌بندی به دنیا آمدند و به گروه‌های ۳ تایی مورد مطالعه تقسیم شدند.

### برنامه ایمن‌سازی

گروه یک: تزریق به‌صورت زیر جلدی $10^3$ TCID50 در بدو تولد انجام گرفت و تزریق دوم با فاصله ٤٠ روز از تزریق اول انجام شد.

گروه دوم: تزریق به‌صورت زیر جلدی $10^3$ TCID50 تنها در بدو تولد انجام گرفت.

گروه سوم: تزریق اول در بدو تولد به‌صورت زیر جلدی $10^3$ TCID50 انجام گرفت، تزریق یادآور اول به فاصله هجده روز از تزریق اول به‌صورت زیر جلدی با همان تیتر ویروس انجام گرفت، تزریق یادآور دوم نیز به فاصله هجده روز از یادآور اول تکرار شد (٤٠ روزگی).

گروه چهارم: تزریق اول در بدو تولد به‌صورت زیر جلدی $10^3$ TCID50 و تزریق دوم به فاصله هجده روز از تزریق اول به‌صورت زیر جلدی با همان تیترانجام گرفت.

گروه پنجم: تزریق اول در بدو تولد به‌صورت زیر جلدی ۳۰ ماکرولیتر محیط DMEM و تزریق دوم به فاصله ٤٠ روز از تزریق اول به‌صورت زیرجلدی با $10^6$ TCID50 انجام گرفت.

گروه ششم: تزریق اول در بدو تولد به‌صورت زیر جلدی ۳۰ ماکرولیتر محیط DMEM و تزریق دوم به فاصله ٤٠ روز از تزریق اول به‌صورت زیرجلدی با $10^3$ TCID50 انجام گرفت.

گروه هفتم: در این گروه موش‌های بالغ نر با $10^3$ TCID50 به‌صورت زیر جلدی تزریق شدند.

گروه کنترل: تزریق‌فقط به‌صورت زیر جلدی ۳۰ ماکرولیتر محیط DMEM با نام گروه شاهد انجام گرفت.

## سنجش فعالیت CTL

یک هفته پس از ایمن‌سازی نهایی، موش‌ها به روش قطع نخاع قربانی شدند و طحال آن‌ها در شرایط استریل خارج شد. فعالیت CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) بر پایه آزاد شدن لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase: LDH) ارزیابی شد. طحال هر موش به‌طور جداگانه همگن و گلبول‌های قرمز آن حذف شد. سلول‌های طحال به‌عنوان سلول‌های عامل (Effectors) در محیط کشت سلول تهیه شد. یاخته‌های EL4 با منشأ سرطان لنفوم موش C57BL6 به‌عنوان سلول‌های هدف با VSV با ضریب عفونی ۱۰ (Multiplicity of Infection: MOI) آلوده شدند. پس از سه ساعت مجاورت سلول هدف با ویروس، $1\times10^3$ سلول هدف با ۵۰ برابر و ۱۰۰ برابر سلول‌های طحال که با توجه به خاطره‌ای که از واکسینه شدن با ویروس در آن‌ها ایجاد شده است به‌عنوان سلول‌های عمل کننده قادر به لیز سلول‌های هدف با منشأ یکسان هستند، در پلیت‌های ۹٦ خانه کشت سلول مجاور شدند.

پس از ٦ ساعت گرمخانه‌گذاری، ترشح LDH در محلول رویی براساس دستورالعمل کیت Cytotoxicity Detection Kit (Roche، آلمان) ارزیابی شد و براساس چگالی نوری (OD) به‌دست آمده طبق فرمول

$$\frac{\text{کنترل پایین–سلول عمل کننده–مخلوط واکنش}}{\text{کنترل بالا–کنترل پایین}}\times 100$$

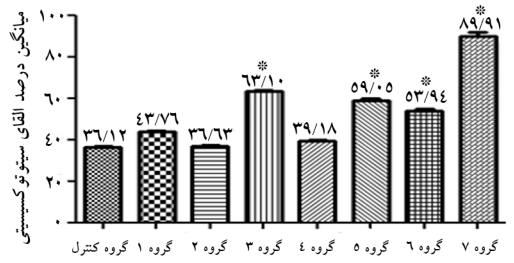
میزان کشندگی سلولی محاسبه شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به‌دست آمده با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و ($P>0/05$) آنالیز شد.

# نتایج

سنجش فعالیت ایمنی سلولی در اثر تزریق آنتی‌ژن VSV در موش‌های نوزاد و موش‌های بالغ C57BL/6 با کیت مورد نظر ارزیابی شد. موش‌های نوزاد در بدو تولد و به دنبال آن در سنین مختلف با ویروس تلقیح شدند و تحریک پاسخ‌های ایمنی آن‌ها با موش‌های بالغ مقایسه شد (شکل ۱).




**شکل ۱** مقایسه درصد القای کشندگی سلولی گروه‌های مختلف پس از واکسیناسیون با ویروس VSV؛ طحال موش‌های ایمن شده با سلول‌های EL4 مجاور و درصد تولید LDH اندازه‌گیری شد. * نشان دهنده معنی‌دار بودن گروه‌های مورد مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری است ($P<0/05$). اعداد قرار گرفته روی ستون‌ها نشان دهنده میانگین درصد کشندگی سلولی برای هر گروه است.

در مقایسه گروه یک و چهار که هر دو دارای تزریق زیر جلدی ویروس در بدو تولد بودند تزریق یادآور اول در گروه ۱ که در زمان بلوغ سیستم ایمنی (٤۰ روزگی) صورت گرفت، پاسخ ایمنی بیشتری را به همراه داشت و در گروه ٤ تزریق در ۱۸ روزگی (عدم بلوغ سیستم ایمنی) صورت گرفت.

در مقایسه گروه یک و شش که هر دو دارای تزریق ویروس در ٤۰ روزگی هستند، تحریک پاسخ ایمنی بیشتری

در گروه ٦ (تزریق محیط در بدو تولد) مشاهده شد که کاهش پاسخ ایمنی در گروه یک به‌واسطه تزریق ویروس در بدو تولد بود.

مقایسه گروه ٣ و ٦ نشان می‌دهد که در گروه ٣ با توجه به تزریق ویروس در بدو تولد، بی‌پاسخی ایجاد شده به‌واسطه تزریقات یادآور اول و دوم شکسته می‌شود و حتی پاسخ ایمنی بیشتری را نسبت به گروه ٦ که فقط در ٤٠ روزگی دارای تزریق ویروس بودند ایجاد کردند. این قضیه نشان دهنده تقویت سیستم ایمنی به هنگام واکسیناسیون با دوزهای یادآور است.

مقایسه دو گروه ٥ و ٦ که دارای تزریق ویروس با تیترهای متفاوت هستند نشان می‌دهد که در گروه ٥ که $10^{6}$ TCID50 به آن‌ها تزریق شد، تحریک بیشتر پاسخ ایمنی را نسبت به گروه ٦ (تزریق $10^{3}$ TCID50) داشت.

مقایسه دو گروه ٣ و ٥ نشان می‌دهد با وجود تزریق یادآور ویروس با تیتر بالاتر در گروه ٥ (تزریق $10^{6}$TCID50) در ٤٠ روزگی و تکرار تزریقات یادآور با تیتر کمتر ویروس (تزریق $10^{3}$ TCID50) در گروه ٣، حتی با وجود بی‌پاسخی ایجاد شده در بدو تولد تحریک بیشتر سیستم ایمنی در گروه ٣ صورت می‌گیرد.

مقایسه گروه دو که تنها دارای تزریق آنتی‌ژن در بدو تولد بود با گروه‌های ١، ٣ و ٤ که علاوه بر تزریق در بدو تولد دارای تزریقات بعدی آنتی‌ژن بودند نشان دهنده بی‌پاسخی بیشتر این گروه است که این مطلب تأکید ویژه‌ای بر کاهش پاسخ ایمنی در سنین نوزادی دارد.

در گروه هفت نیز به علت بالغ بودن حیوانات و تکامل سیستم ایمنی، پاسخ ایمنی بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده می‌شود. کلیه مقایسه‌ها و اختلافات ذکر شده در پاسخ‌های ایمنی از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار است ($P<0/05$).

## بحث

ایمنی‌زایی یک روش مؤثر برای جلوگیری از بیماری‌های عفونی است [٤]. واکسیناسیون نوزادان برای حفاظت آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زایی که در اوایل زندگی با آن برخورد می‌کنند بسیار ضروری است [٨]. نوزادان در مقایسه با بالغین دارای سیستم ایمنی نابالغی هستند و نقایصی که در اجزای پاسخ‌های ایمنی ذاتی و التهابی وجود دارد منجر به توسعه پاسخ‌های (TH2 T-HELPER) به دنبال ایمنی‌زایی با تعدادی از واکسن‌ها [٦] و موجب القای بی پاسخی در سنین نوزادی می‌شود. عوامل زیادی در القای بی پاسخی یا پاسخ محافظت کننده متعاقب ایمنی‌زایی نقش دارد که سن یکی ازمهم‌ترین این این عوامل است [١٠].

با توجه به اهمیت ایمنی‌زایی در سنین کم و نوزادی و پاسخ‌های متفاوت ایجاد شده در این سنین، این پژوهش اثر سن در ایمنی‌زایی را بررسی کرد و با استفاده از سنجش فعالیت کشندگی سلول‌های طحال میزان ایمنی سلولی ارزیابی شد. هر چند روش خروج کرومیوم (Chromium Release) روش استاندارد سنجش فعالیت کشندگی سلول‌های طحالی است به دلیل عدم امکان انجام این آزمایش از روش جایگزین فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز که از سلول‌های لیز شده خارج و با کیت‌های تجاری قابل ارزیابی می‌باشد، استفاده شد. VSV به‌عنوان آنتی‌ژن مدل که هیچ خاطره تولید آنتی‌بادی بر علیه آن در مادر وجود نداشت، بدون استفاده از ادجوانت (Adjuvant) در سنین مختلف جهت ایمن‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

به‌واسطه عدم بلوغ ایمنی، احتمال ایجاد بی پاسخی در نوزادانی که با آنتی‌ژن‌های بیگانه برخورد می‌کنند بیشتراز ایجاد ایمنی مناسب بر علیه آنتی‌ژن می‌باشد [١٢، ١٧، ١٨]. همان‌طور که در گروه‌های تحت مطالعه آن‌هایی که دارای تزریق آنتی‌ژن در بدو تولد بوده‌اند (گروه ٢) نسبت به گروه‌هایی که دارای تزریق محیط در بدو تولد بودند (گروه ٦) بی‌پاسخی بیشتری مشاهده شد. در مطالعه‌ای واکسیناسیون در سنین نوزادی با DNA پلاسمیدی که پروتئین انگل مالاریا را کد می‌کند، منجر به ایجاد بی پاسخی در این گروه سنی شد، ولی کاربرد همین پلاسمید در سنین بزرگسالی پاسخ ایمنی مؤثری را القا نمود

[۱٤]. این یافته‌ها تفاوت‌های مهمی را در ماهیت و ویژگی پاسخ‌های ایمنی به‌وجود آمده توسط واکسن‌ها در مقابل ایمنی‌زاهای پروتئینی رایج اثبات می‌کند.

حساسیت به بی پاسخی به سرعت با پیشرفت سن کم می‌شود، همان‌طور که در گروه‌های ٥ و ٦ مورد مطالعه پژوهش حاضر نیز واکسیناسیون پس از طی دوره نوزادی و بلوغ نسبی سیستم ایمنی منجر به تحریک سیستم ایمنی شد. انواعی از واکسن‌ها پاسخ‌های ایمنی قدرتمند و حفاظت کننده‌ای را در حیوانات بزرگسال القا می‌کند [۱۲-۱٤]. همان‌طور که بیشترین میزان تحریک در گروه ۷ مشاهده شد که در زمان بلوغ ایمن شده بودند. در مطالعه دیگری نشان داده شد، واکسیناسیون در نوزادی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را ایجاد می‌کند و تزریق آنتی‌ژن بیشتراز القای بی پاسخی منجر به تحریک می‌شود [۷]. موش‌هایی که در سنین یک روزه نوزادی با پلاسمید تزریق شده بودند درمقایسه با موش‌هایی که در سنین بلوغ ایمن شده بودند پاسخ ایمنی مشابهی را تولید کردند [٦]. البته ایمنی‌زایی در دوران نوزادی به عوامل مختلفی بستگی دارد، نوع تزریق و ماهیت آنتی‌ژن نیز در ایجاد ایمنی‌زایی یا بی پاسخی مؤثر است، به‌طوری که پلاسمیدهای کد کننده آنتی‌ژن‌های ویروسی قادر بودند پاسخ‌های ایمنی سلولی مشابهی را در بین موش‌های بالغ و نوزاد ایجاد کنند [۹] در حالی که بعد از کاربرد داخل رگی ناقل‌های آدنو ویروس بیان کننده آنتی‌ژن در نوزاد موش، بی پاسخی پایداری در آن‌ها القا شد [۱۷، ۱۸]. با توجه به این که تزریقات زیر جلدی مکرر با DNA واکسن‌ها پاسخ آنتی‌بادی را به دنبال دارد در مطالعه حاضر نیز تنها تزریق زیر جلدی آنتی‌ژن در بدو تولد در گروه دو بی‌پاسخی بیشتری را به آنتی‌ژن نسبت به گروه‌هایی که دارای تزریقات بعدی آنتی‌ژن بودند به همراه داشت (گروه ۱، ۳ و ٤) و این مطلب تأکید ویژه‌ای برالقای بی پاسخی در سنین نوزادی دارد [۱۷-۱۹]. در مقایسه گروه‌های ۳ و ٤، دوزهای یادآور بعد از تزریق اولیه در بدو تولد بی‌پاسخی به آنتی‌ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و پاسخ‌های CTL بیشتری را القا می‌کند. در مطالعات مختلف از آن‌جایی که عوامل مختلفی به غیر از سن، همانند ماهیت آنتی‌ژن، نحوه تزریق و مقدار آنتی‌ژن نیز ایمنی‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد از این رو نتایج مشاهده شده در مطالعات مختلف ممکن است متفاوت باشد. در پژوهش حاضر تزریقات آنتی‌ژن‌های ویروسی با تیترهای بالاتر در سنین بزرگسالی منجر به تحریک بیشتر سیستم ایمنی شد که این امر ممکن است در مورد نوزادان نیز صادق باشد، لیکن تحمل دوزهای بالای آنتی‌ژن در نوزادان و جنبه‌های بی‌خطر بودن آن از جمله مسایلی است که باید مد نظر قرار گیرد، به‌طوری که در مورد آنتی‌ژن مورد بررسی تیتر به‌کار رفته $10^3$ TCID50 ویروس در این پژوهش، که با تزریق تیترهای مختلف ویروس در بدو تولد تعیین شده بود، بالاترین تیتری بود که نوزادان در بدو تولد قادر به تحمل آن بودند.

به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بی‌پاسخی ایجاد شده نسبت به تزریق آنتی‌ژن ویروسی در ابتدای تولد، با تزریق‌های بعدی آنتی‌ژن منجر به تحریک ایمنی می‌شود. این مسئله به لزوم زمان مناسب ایمن‌سازی یا به‌کارگیری ادجوانت‌های مناسب برای تقویت سیستم ایمنی در ایمن‌سازی‌های بدو تولد تأکید می‌نماید.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است.

## منابع

[1] Klinman DM, Takeno M, Ichino M, Gu M, Yamshchikov G, Mor G, Conover J. DNA

vaccines: safety and efficacy issues. Springer Semin Immunopathol 1997; 19(2): 245-56.

[2] Gerdts V, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk, Griebel PJ. Fetal immunization by a DNA vaccine delivered into the oral cavity. Nat Med 2000; 6(8): 929-32.

[3] Hassett DE, Zhang J, Whitton JL. Neonatal DNA immunization with a plasmid encoding an internal viral protein is effective in the presence of maternal antibodies and protects against subsequent viral challenge. J Virol 1997; 71(10): 7881-8.

[4] Gerdts V, Snider M, Brownlie R, Babiuk LA, Griebel PJ. Oral DNA vaccination in utero induces mucosal immunity and immune memory in the neonate. J Immunol 2002; 168(4): 1877-85.

[5] Hassett DE, Zhang J, Slifka M, Whitton JL. Immune responses following neonatal DNA vaccination are long-lived, abundant, and qualitatively similar to those induced by conventional immunization. J Virol 2000; 74(6): 2620-7.

[6] Pertmer TM, Robinson HL. Studies on antibody responses following neonatal immunization with influenza hemagglutinin DNA or protein. Virology 1999; 257(2): 406-14.

[7] Wang Y, Xiang Z, Pasquini S, Ertl HC. Immune response to neonatal genetic immunization. Virology 1997; 228(2): 278-84.

[8] Hodgins DC, Shewen PE. Vaccination of neonates: problem and issues. Vaccine 2012; 30(9): 1541-59.

[9] Bot A, Bot S, Garcia-Sastre A, Bona C. DNA immunization of newborn mice with a plasmid-expressing nucleoprotein of influenza virus. Viral Immunol 1996; 9(4): 207-10.

[10] Liu AB, Tai KF, Lin SZ. Repeated DNA vaccination induced neonatal tolerance against *Escherichia. coli*. beta-galactosidase in immune-competent mice. Tzu Chi Med J.2005; 17(2): 75-81.

[11] Mao Q, Wang Y, Gao R, Shao J, Yao X, Lang S, Wang C, Mao P, Liang Z, Wang J. A neonatal mouse model of coxsackievirus A16 for vaccine evaluation. J Virol 2012; 86(22): 11967-76.

[12] Mor G, Yamshchikov G, Sedegah M, Takeno M, Wang R, Houghten RA, Hoffman S, Klinman DM. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. J Clin Invest 1996; 98(12): 2700-5.

[13] Mor G, Eliza M. Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. Mol Biotechnol 2001; 19(3): 245-50.

[14] Ichino M, Mor G, Conover J, Weiss WR, Takeno M, Ishii KJ, Klinman DM. Factors associated with the development of neonatal tolerance after the administration of a plasmid DNA vaccine. J Immunol 1999; 162(7): 3814-8.

[15] Liao JB, Publicover J, Rose JK, DiMaio D. Single-dose, therapeutic vaccination of mice with vesicular stomatitis virus expressing human papillomavirus type 16 E7 protein. Clin Vaccine Immunol 2008; 15(5): 817-24.

[16] Breitbach CJ, De Silva NS, Falls TJ, Aladl U, Evgin L, Paterson J, Sun YY, Roy DG, Rintoul JL, Daneshmand M, Parato K, Stanford MM, Lichty BD, Fenster A, Kirn D, Atkins H, Bell JC. Targeting tumor vasculature with an

oncolytic virus. Mol Ther 2011; 19(5): 886-94.

[17] Jones SM, Stroher U, Fernando L, Qiu X, Alimonti J, Melito P, Bray M, Klenk HD, Feldmann H. Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. J Infect Dis 2007; 196 Suppl 2: S404-12.

[18] Hu C, Lipshutz GS. AAV-based neonatal gene therapy for hemophilia A: long-term correction and avoidance of immune responses in mice. Gene Ther 2012; 19(12): 1166-76.

[19] Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, Chuah M, VandenDriessche T, Miao CH, Hough C, Lillicrap D. A murine model for induction of long-term immunologic tolerance to factor VIII does not require persistent detectable levels of plasma factor VIII and involves contributions from Foxp3+ T regulatory cells. Blood 2009; 114(3): 677-85.