.

مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۴ شماره ۵ آذر و دی ۱۳۹۱ صفحات ۸۶- ۷۹

اثر IgY ایجاد شده بوسیله DNA واکسن علیه اوره آز C در موش‌های آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری*

زیبا ویسی ملکشاهی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
سید لطیف موسوی گرگری: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: Slmousavi@shahed.ac.ir

علی هاتف سلمانیان: پژوهشکده زیست فناوری گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
ولید ابراهیمی زاده: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
شقایق امیری جاوید: واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد، تهران، ایران

دریافت: ۹۱/۱/۲۰ پذیرش: ۹۱/۴/۱۷

چکیده

زمینه و اهداف: *هلیکوباکتر پیلوری* یک باکتری گرم منفی مارپیچی شکل می‌باشد که با استقرار و تکثیر در لایه مخاطی معده انسان ایجاد عفونت می نماید. این عفونت می‌تواند منجر به التهاب مزمن، زخم های معده و دوازدهه گردد. تحقیق برای یافتن روش‌های جدید درمان به سبب ایجاد مقاومت روز افزون باکتری به آنتی‌بیوتیک ها گسترده تر می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر IgY تولید شده بوسیله DNA واکسن حاوی ژن بیان کننده زیر واحد UreC از آنزیم اوره آز *هلیکوباکتر پیلوری* در موش‌های آلوده شده با باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد 10^9 باکتری (در ۴۰۰ µl محیط کشت بروسلا براث) به معده موش‌های C57BL/6j، ۳ بار به فاصله یک روز در میان گاواج شد. به موش‌های شاهد نیز ۴۰۰ µl محیط کشت استریل خورانده شد. هشت هفته پس از آخرین تلقیح از موشها خونگیری شد و میزان آلودگی بوسیله ELISA ارزیابی گردید. شدت التهاب معده توسط تست پاتولوژیکی بررسی شد. موش‌های آلوده به مدت ۲۸ روز توسط ۶۰ mg IgY جدا شده از زرده تخم مرغ از مرغ های ایمن شده بوسیله واکسن DNA ای مورد تیمار قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج ELISA نشان دهنده ایجاد آلودگی موش‌ها به میزان ۵۳٪ بود. نتایج پاتولوژی وجود التهاب در معده موش‌های آلوده را تایید کرد. کاهش معنی داری در تیتر آنتی بادی موش‌های آلوده و تیمار شده با IgY در مقایسه با موش‌های آلوده و تیمار نشده، دیده شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که IgY تولید شده می‌تواند در کاهش التهاب در مدل موشی موثر باشد.

کلید واژه ها: *هلیکوباکتر پیلوری*، IgY، DNA واکسن، التهاب

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی و مارپیچی شکل می‌باشد که محل استقرار و تکثیر آن در لایه مخاطی معده انسان است. این لانه گزینی موجب بروز عفونت و در پی آن تخریب بافت اپیتلیال معده می‌شود که در صورت عدم درمان مناسب سبب التهاب مزمن، زخمهای معده و دوازدهه می‌گردد (۱). بررسیهای اپیدمیولوژی و آماری نشان می دهد که نیمی از جمعیت جهان آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشند (۲). برای درمان عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* از رژیم های درمانی متداول که شامل مترونیدازول، آموکسی سیلین، کلاریترومایسین و بازدارنده پمپ پروتونی یا بیسموت است، استفاده می‌شود (۳). استفاده از چند

آنتی‌بیوتیک به طور همزمان از یک طرف و مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک ها از طرف دیگر پروسه درمان را حداقل در ۲۰-۱۰٪ از بیماران با مشکل مواجه ساخته است (۴). یکی از راه های موثر در پروسه درمان استفاده از آنتی بادی های اختصاصی می‌باشد. در حال حاضر کاربرد آنتی بادی ها در درمان عفونت ناشی از باکتری ها در حال افزایش است (۵). علاوه بر آن مشخص شده است که ایجاد ایمنی اکتسابی از طریق خوراندن آنتی بادی ها می‌تواند در پیشگیری و یا درمان عفونت بسیاری از پاتوژن های دستگاه گوارشی موثر باشد (۸-۶). استفاده از آنتی بادی های تخلیص شده از زرده تخم مرغ های، مرغ های ایمن شده علیه آنتی ژن های اصلی *هلیکوباکتر پیلوری*، تاثیر فراوانی در کنترل و درمان عفونت های ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* داشته است (۹). همچنین مطالعات نشان می‌دهند که آنتی بادی های تولید شده علیه *هلیکوباکتر پیلوری* در شیر گاو می‌تواند در درمان عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* در مدل های موشی موثر باشد (۱۱-۱۰). آنزیم اوره آز *هلیکوباکتر پیلوری* اصلی ترین پروتئین به عنوان ایمونوژن در مقایسه با دیگر پروتئین های این ارگانیسم می‌باشد. بنابراین این آنتی ژن می‌تواند یکی از بهترین کاندیدها برای تهیه واکسن یا آنتی بادی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* باشد (۱۳-۱۲). فعالیت اوره آز از یک طرف باعث بقاء باکتری در شرایط اسیدی معده و از طرف دیگر سبب ایجاد صدمات بافتی در بافت پوششی معده می‌شود. همچنین گزارشات بیانگر این است که باکتری بدون فعالیت اوره آزی قادر به ایجاد عفونت در معده انسان نمی‌باشد (۱۴). با اینکه نقش ایمنی اکتسابی در درمان عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* ناشناخته می‌باشد، اما تحقیقات نشان داده‌اند که آنتی بادی های خاصی می توانند در برابر عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* محافظت کننده باشند (۱۴). اخیرا استفاده از مدل های حیوانی برای نشان دادن ایجاد مصونیت به کمک آنتی بادی ایجاد شده علیه آنتی ژن نوترکیب و طبیعی *هلیکوباکتر پیلوری* مورد توجه قرار گرفته است که می‌تواند برای درمان عفونت های *هلیکوباکتر پیلوری* مورد استفاده قرار گیرد (۱۹-۱۵). تحقیقات قبلی گروه ما نشان داد که تزریق پلاسمید pCI حاوی ژن *ureC* (pCI-*ureC*) که یکی از زیر واحد های مهم آنزیم اوره آز *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد، می‌تواند سبب تولید آنتی بادی IgY در زرده تخم مرغ علیه آنزیم اوره آز از باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* شود. این آنتی بادی توانست آنزیم اوره آز تولید شده توسط *هلیکوباکتر پیلوری* را در محیط کشت خنثی کند (۱۶). در تحقیق حاضر بر آن شدیم که در اقدامی فراتر، تاثیر این آنتی بادی در مهار رشد باکتری در معده موش‌های آلوده شده با *هلیکوباکتر پیلوری* و کاهش التهاب ناشی از رشد این باکتری را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

جداسازی IgY از زرده تخم مرغ

آنتی بادی IgY به روش واکسن اسید نوکلیکی مطابق با روش قبلی القا گردید (۲۰). جهت تخلیص IgY ابتدا زرده تخم مرغ از سفیده جدا شد. پس از شستشو بوسیله آب مقطر و جدا نمودن کیسه زرده، دو برابر حجم زرده به آن بافر سدیم فسفات ۱۰ میلی مولار با PH= ۷/۶ اضافه کرده و به طور کامل مخلوط شد. به مخلوط فوق ۳/۵٪ PEG ۶۰۰۰ با نسبت وزن به حجم اضافه گردید و به کمک هم زن مغناطیسی به خوبی مخلوط گردید تا محلولی کاملا یکنواخت بدست آید. پس از ۶۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه بوسیله سانتریفیوژ (۴۵۰۰g) محلول رویی که حاوی لیپوپروتئین بوده جدا گردید و به رسوب حاصل، بافر فسفات حاوی ۱۲٪ PEG اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه مخلوط کردن، محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و رسوب به روی کاغذ صافی منتقل گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس رسوب باقی مانده بر روی فیلتر در بافر فسفات حل گردید و پس از تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد، در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. IgY به دست آمده از فرایند جداسازی، با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

کشت باکتری *هلیکوباکتر پیلوری*

نمونه های جداشده باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* از بیماران ایرانی (دانشکده بهداشت دانشگاه تهران)، در محیط بروسلا آگار حاوی خون دفیبرینه گوسفندی (۵٪) و سرم جنین گوساله (۷٪) و محلول مکمل کمپیلوباکتر (Merck) که دارای ونکومایسین، تری متوپریم و پلی میکسین B بود، و مواد ضد باکتری و قارچ کشت داده شد. پلیت ها به همراه گاز پک میکروآئروفیلیک C درون جار به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز، نمونه ها از جار خارج و در صوت مشاهده کلونی، آزمایش های تشخیصی (تست اوره آز، کاتالاز، اکسیداز) و رنگ‌آمیزی گرم انجام گردید (۱۸).

نحوه آلوده سازی موش‌ها توسط *هلیکوباکتر پیلوری*

تعداد ۴۱ سر موش نژاد C57BL/6j از موسسه انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در ۶ گروه تست، هر گروه شامل ۶ سر موش و ۱ گروه شاهد (۵ سر موش) تقسیم‌بندی شد. تقسیم‌بندی موش‌ها در شش گروه تست تنها به دلیل کنترل بهتر بوده و روش تیمار و نگهداری همگی یکسان بود. پس از رشد باکتری‌ها در محیط بروسلا براث حاوی مواد مکمل، تعداد باکتری ها در هر میلی لیتر محیط کشت شمارش و سپس تعداد 10^9 باکتری (در حجم ۴۰۰ میکرولیتر) به معده هر موش، ۳ بار به فاصله یک روز در میان گاواج (gavage) شد. به موش‌های شاهد نیز تحت همین شرایط ۴۰۰ میکرو لیتر محیط کشت استریل خورانده شد. قبل از تلقیح باکتری به معده موش‌ها، موش‌ها به مدت یک شبانه روز در حالت گرسنگی قرار داده شدند. ۶ ساعت بعد از تلقیح باکتری نیز به موش‌ها آب و غذا داده نمی شد. کلیه آزمایشات حیوانی بر اساس مقررات اخلاقی کار با حیوانات دانشگاه شاهد انجام پذیرفت.

تست الایزا

به منظور بررسی آلودگی موش‌ها، هشت هفته پس از آخرین تلقیح، از ناحیه چشم موش‌ها خون‌گیری صورت گرفت و پس از جداسازی سرم از آن جهت ارزیابی تولید آنتی بادی ضد *هلیکوباکتر پیلوری* با روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. به چاهک های پلیت الایزای ۹۶ چاهکی، ۲ میکروگرم پروتئین نوترکیب UreC به همراه ۱۰۰ میکرو لیتر بافر بی کربنات ۵۰ میلی مولار اضافه گردید و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به منظور حذف مکان های پوشش نیافته توسط آنتی ژن، به چاهک ها محلول PBS حاوی ۵٪ شیر خشک اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سریال رقت از سرم موش‌های ایمن شده و شاهد در چاهک های مورد نظر از بالا به پائین و از رقت ۱/۱۰۰ تا ۱/۶۴۰۰ در PBS-T تهیه گردید (محلول PBS حاوی ۰/۵٪ Tween–۲۰) و به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک اضافه گردید و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در مرحله بعد رقت مناسب (۱/۳۰۰۰) از آنتی بادی تولید شده علیه IgG موش کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز (Anti-mouse IgG HRP Congugate, from RAY Biotech) در بافر PBS-T تهیه و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر اضافه شد. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و شستشو بوسیله PBS-T، به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر محلول سوبسترا (۲ میلی‌گرم O-phenilenediamine Sigma-USA در ۵ میلی لیتر بافر سیترات فسفات (pH=۵) که به آن ۲/۵ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ افزوده شد) اضافه و میکرو پلیت برای انجام واکنش به محل تاریک منتقل شد. پس از ایجاد رنگ، واکنش توسط اسید سولفوریک ۲/۵M متوقف گردید و سپس جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

تشخیص آلودگی با آزمایش پاتولوژی (آسیب شناسی)

پس از تایید آلوده شدن موش‌ها توسط تست الایزا، تعداد ۴ سر موش دارای واکنش الایزای مثبت به صورت اتفاقی انتخاب و ناحیه آنتروم معده آن ها جدا و در ظرف شیشه ای حاوی ۱۰ در صد فرمالدهید قرار داده شد. نمونه ها جهت بررسی‌های پاتولوژی به دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله ارسال شدند. پس از تایید آلودگی موش‌های مورد بررسی توسط آزمایش های پاتولوژی، موش‌های دارای الایزای مثبت به عنوان موش آلوده شده در نظر گرفته شدند و سپس به دو گروه کنترل مثبت و گروه آزمایش مورد تقسیم بندی قرار گرفتند. موش‌های کنترل مثبت شامل پنج سر بود و جهت اطمینان از پایداری عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در نظر گرفته شدند و در طول تحقیق مورد تیمار دیگری قرار نگرفتند.

نحوه تلقیح آنتی بادی IgY به معده موش‌ها

موش‌های گروه آزمایش جهت بررسی اثر درمانی IgY تولید شده علیه اوره آز مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور هر موش به مدت ۲۸ روز و با میزان ۶۰ میلی‌گرم از IgY حل شده در ۵۰۰ میکرو لیتر PBS به صورت خوراکی و با گاواژ مستقیم به معده، مورد تیمار قرار گرفتند. لازم به ذکر است که ۲ ساعت قبل و ۶ ساعت بعد از هر تلقیح، به موش‌ها آب و غذا داده نمی شد. پس از اتمام ۲۸ روز دوره تیمار، به موش‌ها به مدت ۱۰ هفته استراحت داده شده و سپس جهت بررسی تاثیر آنتی بادی IgY تولید شده علیه اوره آز، از موش‌های گروه آزمایش (موش‌های آلوده شده توسط *هلیکوباکتر پیلوری* و تیمار شده توسط IgY)، موش‌های گروه کنترل مثبت (موش‌های آلوده شده توسط *هلیکوباکتر پیلوری* و تیمار نشده توسط IgY) و موش‌های گروه منفی (موش‌هایی که مورد هیچ گونه تیماری قرار نگرفته بودند) خون‌گیری صورت گرفت و سرم آنها جداسازی گردید و توسط روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. همانند مرحله قبل ناحیه آنتروم معده تعدادی از موش‌های تیمار شده جدا گردید و در فرمالدهید ۱۰ درصد برای آزمایشات پاتولوژی ارسال شدند.

روش‌های آماری مورد استفاده در این تحقیق

جهت آنالیز داده های بدست آمده از (T-test (Paired, Unpaired و P-value (تست فیشر) و نرم افزار Graphpad Prism استفاده شد.

یافته ها

تخلیص ایمونوگلوبولین از تخم مرغ

محصول به دست آمده از فرایند جداسازی ایمونوگلوبولین مرغی از زرده تخم مرغ های به دست آمده با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی برای اطمینان از حضور ایمونوگلوبولین در مخلوط پروتئینی تخلیص شده، نمونه مربوط به صورت جداگانه بوسیله بافرهای حاوی 2ME و فاقد آن بر روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز شد. در شکل۱، ستون ۱ مربوط به نمونه با بافر فاقد 2ME می‌باشد، باند ایمونوگلوبولین کامل، حاوی پیوند دی سولفیدی با اندازه تقریبی ۱۶۵ کیلودالتونی مشخص است، در حالی که در ستون ۲ و۳ از بافر حاوی 2ME استفاده شده که باعث باز شدن پیوندهای دی سولفیدی و جدائی زنجیره سبک و سنگین از یکدیگر شده است. همان طور که مشخص است زنجیره سنگین روبروی مارکر ۶۱ کیلودالتونی و زنجیره سبک در حدود روبروی مارکر ۳۰ کیلودالتونی قرار گرفته‌اند.

نتایج الایزای موش‌های آلوده، آلوده تیمار شده با IgY و شاهد

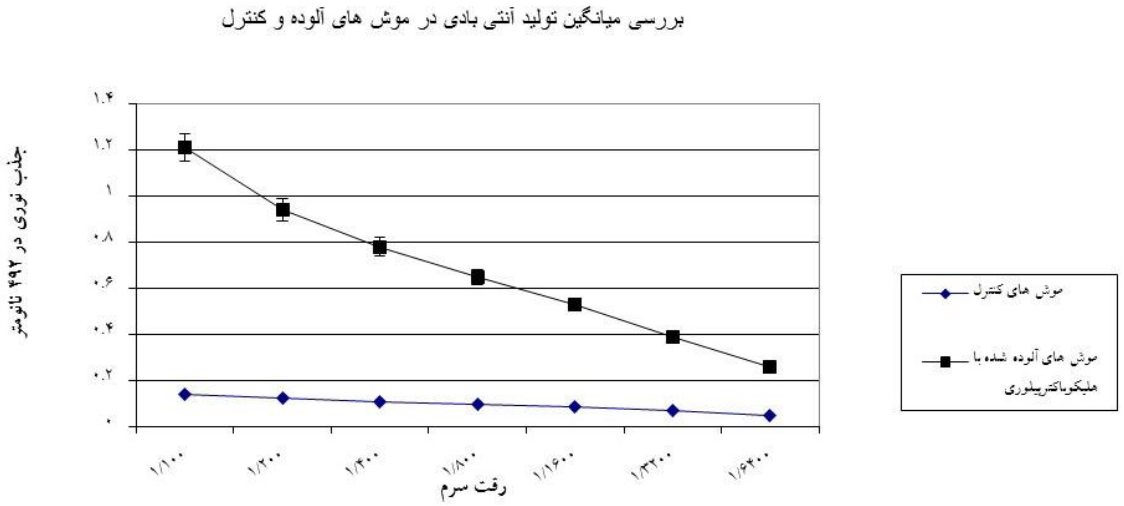
نمودار شماره ۱ نشان دهنده میزان تیتر آنتی بادی تولید شده در موش‌های گروه آزمایش پس از آلودگی آن ها بوسیله *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد. همان گونه که در نمودار مشخص می باشد میزان آنتی‌بادی های تولید شده علیه باکتری در سرم این گروه دارای تفاوت معنی‌داری با میزان تیتر آنتی بادی موجود در سرم گروه کنترل منفی (P<۰/۰۰۱) می‌باشد.

نمودار شماره ۲ نتایج الایزای سرم موش‌های کنترل و آلوده قبل و بعد از مواجهه با IgY ضد اوره آز را نشان می دهد. کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) در میزان جذب نوری سرم موش‌های دریافت کننده IgY ضد اوره آز نسبت به سرم همان موش‌ها قبل

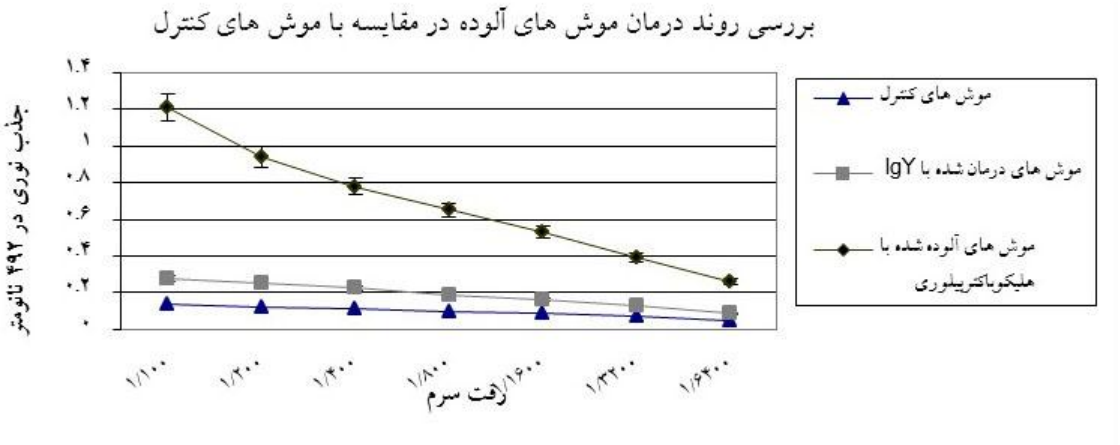
از شروع درمان وجود دارد. علاوه بر آن میانگین جذب نوری سرم موش‌های آلوده بعد از درمان تقریبا به سطح سرم موش‌های کنترل باز گشته است. کم بودن اختلاف بین میانگین دو گروه موش‌های کنترل و درمان شده با IgY تولید شده علیه اوره آز تائید کننده ($P>۰/۰۵$) اثر مثبت در کنترل *هلیکوباکتر پیلوری* است.

نتایج بررسی‌های پاتولوژیکی گروه های مختلف موش‌ها

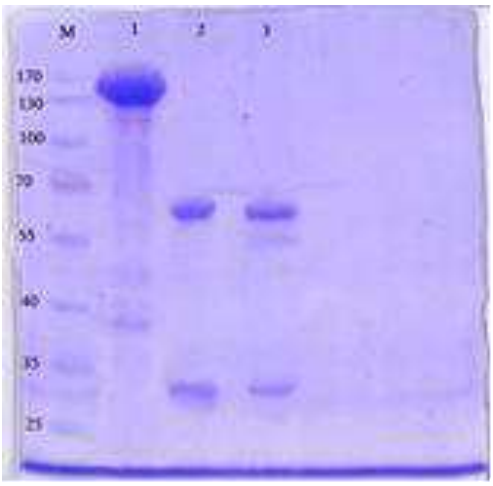
نتایج پاتولوژی معده موش‌های آلوده نشان داد که کلونیزاسیون *هلیکوباکتر پیلوری* در معده این موش‌ها صورت گرفته است. همچنین گسترش حفره های گوارشی و از بین رفتن اپیتلیوم نشان دهنده آتروفی شدید این بافت ها می‌باشد (شکل ۲). پس از ۲۸ روز دوره درمانی توسط IgY ضد اوره آز تولید شده به روش DNA واکسن، بررسی‌های بافت‌شناسی نشان‌دهنده کاهش التهاب و ارتشاح کمتر لنفوسیت ها در زیر مخاط بافت اپیتلیوم می‌باشد که بیان از توان IgY تولیدی در مهار کلونیزاسیون این باکتری می‌باشد (شکل ۲).



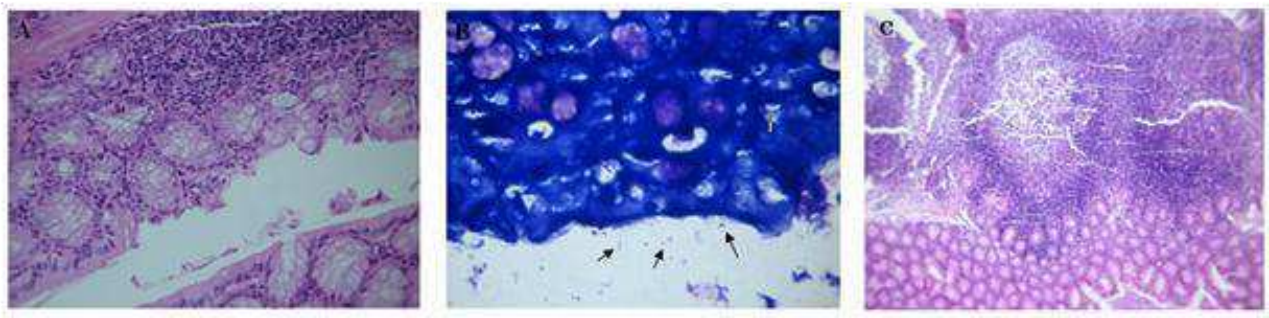
نمودار ۱: بررسی میانگین تولید آنتی بادی در موش‌های آلوده و کنترل: بررسی آلودگی موش‌های تیمار شده توسط هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با موش‌های کنترل. میزان جذب نوری سرم موش‌های آزمایش در رقت های مختلف توسط علامت ■ موش‌های کنترل توسط علامت ♦ نشان داده شده است.



نمودار ۲: بررسی روند درمان موش‌های آلوده در مقایسه با موش‌های کنترل: مقایسه میانگین غلظت آنتی‌بادی علیه UreC نوترکیب در سرم موش‌های آلوده شده توسط هلیکوباکتر پیلوری و تیمار نشده بوسیله IgY♦، سرم موش‌های آلوده و تیمار شده با IgY تولید شده علیه UreC■ و سرم موش‌های کنترل منفی ▲.



شکل ۱: آنالیز جداسازی ایمونوگلوبولین مرغی (IgY) از زرده تخم مرغ روی ژل SDS-PAGE ۹ درصد. ستون M اندازه مولکولی پروتئین،
ستون ۱: محصول جداسازی IgY با بافر بدون 2ME.
ستون ۲و ۳: محصول جداسازی با بافر حاوی 2ME



شکل ۲: بررسی بافت معده موش‌های C57BL/6j.
شکل A: حضور سلول های ایمنی در بافت معده موش‌های آلوده شده به *هلیکوباکتر پیلوری* نشان دهنده گاستریت مزمن می‌باشد. نوتروفیل های درون بافت اپی تلیال و در سطح و غدد مخاطی نمایان می‌باشند و فولیکول ایجاد شده است. ارتشاح سلول های لنفوپلاسموسینوئید شدید در زیر مخاط وجود دارد.
شکل B: حضور باکتری در سطح پوشش اپی تلیال و گردن غدد در رنگ آمیزی گیمسا مشخص می‌باشد. وجود باکتری های خمیده شکل بیانگر ایجاد عفونت و کلونیزاسیون *هلیکوباکتر پیلوری* در معده موش‌های تست می‌باشد. باکتری ها در شکل بوسیله پیکان نشان داده شده است (X 1000).
شکل C: بررسی بافت معده موش‌های درمان شده بوسیله IgY-HpUc. در این شکل ارتشاح نسبتا کمتر لنفوسیت ها در زیر مخاط وجود دارد که نشان دهنده درمان موش‌های آلوده توسط IgY-HpUc می‌باشد. (رنگ آمیزی گیمسا، بزرگنمایی X400)

بحث

هلیکوباکتر پیلوری مهمترین عامل ایجاد کننده زخم معده می باشد و طبق آمارهای منتشر شده بیش از نیمی از جمعیت جهان مبتلا به این باکتری می‌باشند (۲۱). *هلیکوباکتر پیلوری* می‌تواند با استقرار در بخش آنتروم معده سبب عفونت طولانی مدت این ناحیه گردد (۲۰-۱۹). همچنین عفونت های طولانی مدت توسط این باکتری می‌تواند منجر به سرطان های گوارشی و ایجاد کارسینوما در این ناحیه شود (۲۰). در حال حاضر بیماری های ایجاد شده توسط *هلیکوباکتر پیلوری* توسط آنتی‌بیوتیک ها درمان می شوند. با توجه به افزایش روزافزون سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، چنین رویکرد درمانی در ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد با شکست همراه می‌شود (۲۲). با توجه به گسترش سریع سویه های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، جایگزینی و یا به کارگیری یک سیستم کمکی همراه درمان های مبتنی بر آنتی‌بیوتیک در عفونت های ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* یک ضرورت به نظر می‌رسد. استفاده از آنتی بادی ها به دلیل خصوصیات منحصر به فرد آنها از جمله اختصاصیت و عدم ایجاد مقاومت دارویی یکی از روش‌های جایگزین درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. در اغلب موارد هزینه های سنگین ناشی از فرآیندهای تولید و تخلیص آنتی‌بادی ها مانعی جهت استفاده گسترده آن‌ها می‌باشد. استفاده از آنتی‌بادی های مشتق شده از زرده تخم به دلیل هزینه کم تولید، سهولت تخلیص و قابلیت استفاده آن ها در درمان بیماری های گوارشی می‌تواند روشی مناسب و تکمیل‌کننده درمان‌های آنتی‌بیوتیکی عفونت های ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* باشد. بر اساس بررسی های به عمل آمده یک میلی لیتر زرده تخم مرغ حاوی حدود ۵ میلی‌گرم IgY می‌باشد و با در نظر گرفتن حجم زرده تخم مرغ (۲۸ میلی لیتر) هر تخم مرغ می‌تواند حاوی ۱۴۰ میلی‌گرم IgY باشد. با توجه به اینکه هر مرغ در سال قادر به تولید حدود ۲۸۰

تخم مرغ است، این محاسبات حدود ۴۰ گرم IgY در ازای هر مرغ ایمن در سال را نشان می دهد (۲۳).
اختصاصیت آنتی بادی تولیدی وابسته به ایمونوژن انتخاب شده جهت تولید آنتی بادی می‌باشد. گرچه استفاده ار عصاره سلولی می‌تواند منجر به تولید آنتی بادی شود، ولی استفاده از آنتی ژن های اختصاصی در روند تولید آنتی بادی سبب ایجاد آنتی بادی با اختصاصیت بالا نسبت به پاتوژن مورد نظر می‌گردد و از واکنش های متقاطع می کاهد. انتخاب UreC به عنوان ایمونوژن در این تحقیق به دلیل اهمیت بالای این زیر واحد در عملکرد آنزیم اوره آز *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد. تحقیقات نشان داده زیر واحد UreC یکی از بهترین کاندیدها جهت تولید واکسن‌های نوترکیب می‌باشد (۱۶). تولید پروتئین های نوترکیب و تخلیص آن ها از جمله مراحل پر هزینه تولید آنتی بادی ها می‌باشد (۹). استفاده از واکسن‌های مبتنی بر DNA می‌تواند سبب کاهش چشمگیر چنین فرآیندهایی شود. اخیرا نشان داده شده است که واکسن‌های مبتنی بر اسید های نوکلئیک علاوه بر ایجاد ایمنی سلولی، می‌توانند سبب تحریک سلول های سیتوتوسیک T شده و همچنین ایمنی خونی را تحریک کنند (۲۴). تحقیقات انجام شده نشان داده است که ایمنی خونی ایجاد شده توسط واکسن‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک قابلیت محافظت کنندگی داشته و می‌تواند میزبان را در برابر عفونت‌های بعدی محافظت کند (۲۴). واکسن‌های اسید نوکلئیکی به علت سهولت در تولید انبوه پلاسمید نوترکیب و نیز افزایش مدت ایمنی به علت بیان مداوم و طولانی مدت آنتی ژن در بدن میزبان، در مقایسه با تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب سبب کاهش هزینه فرایند ایمن سازی و صرفه اقتصادی در تولید آنتی بادی اختصاصی می‌گردد.
در این مطالعه، به منظور دست‌یابی به روش‌های جایگزین آنتی بیوتیکی و همچنین جهت کاهش و درمان عفونت های گوارشی ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری*، اقدام به تولید آنتی بادی IgY توسط DNA ی ژن *ureC هلیکوباکتر پیلوری* و تخلیص آن از زرده تخم مرغ کردیم. نتایج تیتراسیون سرم مرغ‌های ایمن شده نشان داد که این شیوه ایمن سازی با تحریک موثر ایمنی هومورال، سبب تولید آنتی UreC در مرغ گشته و با انتقال موفقیت‌آمیز آن به زرده تخم مرغ همراه بوده و این IgY می‌تواند فعالیت آنزیمی اوره آز را در باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* نیز خنثی نماید (۲۱و۹). IgY تولید شده پس از تخلیص از زرده نشان داد، که فعالیت خود را طی مراحل کار کاهش نداده و توانسته است پتانسیل کاری خود را حفظ کند.
روش معمول جهت تخلیص IgY استفاده از کاراجنین و پلی اتیلن گلیکول می‌باشد و در این تحقیق از روش پلی اتیلن گلیکول با خلوص ۶۰٪ استفاده شد (۱۷). IgY تخلیص شده جهت درمان عفونت های موش‌های آلوده شده توسط *هلیکوباکتر پیلوری* استفاده شد. هم اکنون جهت شبیه سازی عفونت های *هلیکوباکتر پیلوری* از مدل های حیوانی نظیر میمون، سگ، خوک، گربه های خانگی و موش استفاده می‌شود، ولی استفاده از اغلب این حیوانات به دلیل عدم توانایی در نگهداری آسان، تعداد بالا و همچنین نسبت کم بروز عفونت، با محدودیت هایی همراه است (۲۷–۲۵).
بهترین مدل حیوانی جهت القای عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در موش‌های نژاد Mongolian gerbils گزارش شده است (۲۶). علت انتخاب موش نژاد C57BL/6J در این مطالعه، عدم دسترسی به موش‌های نژاد جربیل در ایران و شباهت فراوان این نژاد از موش به موش‌های جربیل بوده است (۲۹–۲۸). در این تحقیق موش‌های نژاد C57BL6/j پس از آلوده سازی توسط *هلیکوباکتر پیلوری* بوسیله IgY تولید شده به روش واکسن اسید نوکلئیکی مورد درمان قرار گرفتند. جهت اطمینان از درمان موش‌ها و کارآیی IgY ضد اوره آز در مهار و کاهش عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* از تست های سرولوژیکی و پاتولوژیکی استفاده گردید. پاتولوژی تنها روش تشخیصی است که نه تنها حضور باکتری را در معده نشان می دهد، بلکه بیانگر میزان التهاب ناشی از عفونت نیز می‌باشد. علاوه بر این پاتولوژی اطلاعات مفیدی همانند تغییرات بافتی، ایجاد آتروفی مزمن و یا حاد را نشان می دهد. تلاش های صورت گرفته در جهت کلونیزه نمودن *هلیکوباکتر پیلوری* در معده موش‌هایMongolian gerbils و C57BL/6J نشان می دهد که ضایعات پاتولوژی به وجود آمده در معده موش های C57BL/6J مشابه موش‌های Mongolian gerbils می‌باشد (۲۸و۲۳). در این تحقیق همانند تحقیقات انجام شده قبلی بر روی مدل‌های Mongolian gerbils به وضوح مشخص شده است که IgY ضد اوره آز صدمات سطوح مخاطی معده ناشی از عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* را کاهش می دهد. بنابراین ارزش درمانی IgY و استفاده از آن به صورت خوراکی در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی همانند Mongolian gerbils، به دلیل توانایی مهار اتصال باکتری ها می‌باشد (۳۰و۲۲و۹). با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق IgY می‌تواند سبب کاهش موثر التهاب ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* شده و عوارض ناشی از عفونت توسط این باکتری را کاهش دهد. همچنین با توجه تولید آنتی بادی IgY به روش واکسن اسید نوکلئیک نشان داده‌ایم که واکسن‌های اسید نوکلئیک می‌توانند سبب ایجاد ایمنی خونی موثر در میزبان شده آنتی بادی هایی با کارآیی بالا را سبب شوند. استفاده از واکسن‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک می‌تواند سبب کاهش چشمگیری در هزینه های تولید آنتی‌بادی شود و استفاده از آنتی‌بادی ها به همراه درمان های معمول از جمله درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند منجر به درمان موثرتر و اختصاصی گردد و از استفاده طولانی مدت آنتی بیوتیک ها و ایجاد سویه‌های مقاوم جلوگیری کند.

نتیجه گیری

ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *هلیکوباکتر پیلوری* و همچنین هزینه بالای درمان از جمله مشکلات بیماری های ایجاد شده توسط این باکتری می‌باشد. یکی از مشکلات تولید این گونه آنتی بادی های منوکلونال و نوترکیب تخلیص و بیان آنتی ژن‌ها می‌باشد. تولید آنتی بادی به روش واکسن اسید نوکلئیکی سبب حذف این مراحل و کاهش هزینه تولید می‌گردد. مهار عفونت توسط آنتی‌بادی تولید شده به روش اسید نوکلئیکی در مدل‌های موشی بیانگر کارآیی استفاده از روش واکسن اسید نوکلئیکی در

تولید آنتی‌بادی های نوترکیب می‌باشد. حذف مراحل تولید و تخلیص آنتی ژن سبب کاهش هزینه تولید آنتی‌بادی های نوترکیب شده که در نهایت سبب کاهش هزینه درمان خواهد شد. تولید آنتی بادی های نوترکیب از ایجاد سویه های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و درمان جلوگیری خواهد کرد و تولید آن ها با هزینه پایین قابلیت استفاده از آن ها به عنوان ابزار پیشگیری به صورت افزودنی ها در مواد غذایی را فراهم می‌کند که گام بزرگی در مهار انتشار عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد.

References

1. Blaser MJ, Chyou P, Nomura A. Age at establishment of Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res* 1995; **55**(3): 562.
2. Carlander D, Kollberg H, Wejåker PE, Larsson A. Peroral immunotheraphy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res* 2000; **21**(1): 1-6.
3. Casswall T, Nilsson HO, Björck L, Sjöstedt S, Xu L, Nord CE, et al. Bovine anti-Helicobacter pylori antibodies for oral immunotherapy. *Scand J Gastroenterol* 2002; **37**(12): 1380-1385.
4. Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 2009; **13**(2): 295-308.
5. Day AS, Jones NL, Policova Z, Jennings HA, Yau EK, Shannon P, et al. Characterization of virulence factors of mouse-adapted Helicobacter pylori strain SS1 and effects on gastric hydrophobicity. *Dig Dis Sci* 2001; **46**(9): 1943-1951.
6. Eaton KA, Brooks C, Morgan D, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1991; **59**(7): 2470.
7. Evans DJ. Characterization of the Helicobacter pylori urease and purification of its subunits* 1. *Microb Pathog* 1991; **10**(1): 15-26.
8. Horie K, Horie N, Abdou A, Yang JO, Yun SS. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans. *J Dairy Sci* 2004; **87**(12): 4073-4079.
9. Kaparakis M, Walduck AK, Price JD, Pedersen JS, Van Rooijen N. Macrophages are mediators of gastritis in acute Helicobacter pylori infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun* 2008; **76**(5): 2235.
10. Kuo CH, Hu HM, Tsai PY, Yang SF, Chang LL. A better method for confirming Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 2008; **43**(1): 32-37.
11. Kusters J, Gerrits M, Van Strijp J, Vandenbroucke-Grauls C. Coccoid forms of Helicobacter pylori are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun.* 1997; **65**(9): 3672.
12. Lachman LB, Ozpolat B, Rao XM, Graham DY, Osato M. Development of a murine model of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 1997; **2**(2): 78-81.
13. Marnila P, Rokka S, Rehnberg Laiho L, Kärkkäinen P, Kosunen TU, Rautelin H, et al. Prevention and suppression of Helicobacter felis infection in mice using colostral preparation with specific antibodies. *Helicobacter* 2003; **8**(3): 192-201.
14. Mestecky J, Russell M. Passive and active protection against disorders of the gut. *The Veterinary quarterly* 1998; **20**: 83.
15. Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food* 2002; **5**(3): 159-169.
16. Mohammadi M, Doroud D, Mohajerani N, Massarrat S. Helicobacter pylori antibiotic resistance in Iran. *World Journal of Gastroenterology* 2005; **11**(38): 6009.
17. Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H. Effect of Dietary Anti Urease Immunoglobulin Y on Helicobacter pylori Infection in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 2005; **10**(1): 43-52.
18. Ota H, Genta R. Morphological characterization of the gastric mucosa during infection with H. pylori. *The Immunobiolology of H pylori: From Pathogenesis to Prevention. Ernst PB, Michetti P, Smith PD (eds).* Philadelphia, Lippincott–Raven, 1977; PP: 15–28.
19. Pounder R, Ng D. The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; **9**(2): 33-40.
20. Sh AJ, Mousavi S, Salmanian A, Basiri M. Production of chicken egg yolk immunoglobulin against Helicobacter pylori UreC protein by DNA vaccination. *Kowsar Medical Journal* 2011; **15**(4): 197-202.
21. Safaralizadeh R, Siavoshi F, Malekzadeh R, Akbari M, Derakhshan M, Sohrabi M, et al. Antimicrobial effectiveness of furazolidone against metronidazole-resistant strains of Helicobacter pylori. *East Mediterr Health J* 2006; **12**(3/4): 286.
22. Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. *J Med Microbiol* 2003; **52**(3): 217.
23. Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection. *Clin Vaccine Immunol* 2002; **9**(5): 1061.
24. Silva DG, Stevens RH, Macedo J, Albano RM, Falabella MEV, Fischer RG, et al. Presence of Helicobacter pylori in supragingival dental plaque of individuals with periodontal disease and upper gastric diseases. *Arch. Oral Biol* 2010; **55**(11): 896-901.
25. Street M, Caruana P, Caffarelli C, Magliani W, Manfredi M, Fornaroli F, et al. Antibiotic resistance and antibiotic sensitivity based treatment in Helicobacter pylori infection: advantages and outcome. *Arch Dis Child* 2001; **84**(5): 419.

26. Sturegård E, Sjunnesson H, Nilsson HO, Andersson R, Areskoug C, Wadström T. Infection with cagA and vacA positive and negative strains of Helicobacter pylori in a mouse model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; **30**(2): 115-120.
27. Wang X. Helicobacter pylori infection in a mouse model.
28. Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of ItB-ureB fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvanticity. *World Journal of Gastroenterology* 2004; **10**(18): 2675-2679.
29. Zhao B, Jin NY, Wang RL, Zhang LS, Zhang YJ. Immunization of mice with a DNA vaccine based on severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fragment 1. *Viral Immunol* 2006; **19**(3): 518-524.
30. Malekshahi ZV, Gargari SLM, Rasooli I, Ebrahimizadeh W. Treatment of Helicobacter pylori infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. *Microb Pathog* 2011; **5**: 32-35.