

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 ماریچی شکل می‌باشد که با استقرار و تکثیر در لایه مخاطی معده انسان ایجاد عفونت می‌نماید. این عفونت می‌تواند منجر به التهاب مزمن، زخم‌های معده و دوازدهه گردد. تحقیق برای یافتن روش‌های جدید درمان به سبب ایجاد مقاومت روز افزون باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها 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 ۱۰<sup>۹</sup> باکتری (در ۴۰۰ µl محیط کشت بروسلا براث) به معده موش‌های C57BL/6j، ۳ بار به فاصله یک روز در میان گاوچ 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 مرغ‌های ایمن شده بوسیله واکسن DNA ای مورد تیمار قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** 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 تیتراژ 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.

**کلیدواژه‌ها:** هلیکوباکتر پیلوری، IgY، DNA واکسن، التهاب

### مقدمه

اپیدمیولوژی و آماری نشان می‌دهد که نیمی از جمعیت جهان آلوده به هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند (۲). برای درمان عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری از رژیم‌های درمانی متداول که شامل مترونیدازول، آموکسی سیلین، کلاریترومایسین و بازدارنده پمپ پروتونی یا بیسموت است، استفاده می‌شود (۳). استفاده از چند

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی و ماریچی شکل می‌باشد که محل استقرار و تکثیر آن در لایه مخاطی معده انسان است. این لایه 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

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  $\text{pH} = 7/6$  اضافه کرده و به طور کامل مخلوط شد. به مخلوط فوق  $3/5\%$  PEG ۶۰۰۰ با نسبت وزن به حجم اضافه گردید و به کمک هم زن مغناطیسی به خوبی مخلوط گردید تا محلولی کاملاً 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  $12\%$  PEG اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه مخلوط کردن، محلول به مدت ۱۵ دقیقه در  $12000\text{ g}$  سانتریفیوژ شد و رسوب به روی کاغذ صافی منتقل گردید و به مدت یک ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتریگراد 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  $4^\circ\text{C}$  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 جدا شده باکتری هلیکوباکتر پیلوری از بیماران ایرانی (دانشکده بهداشت دانشگاه تهران)، در محیط بروسلا آگار حاوی خون دفیبرینه گوسفندی ( $5/5\%$ ) و سرم جنین گوساله ( $7/7\%$ ) و محلول مکمل کمپلوباکتر (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 میکروآتروفیلیک C درون جار به مدت ۷ روز در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتریگراد 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 رنگ آمیزی 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) تقسیم بندی شد. تقسیم بندی 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 برات حاوی مواد مکمل، تعداد باکتری‌ها در هر میلی لیتر محیط کشت شمارش و سپس تعداد  $10^9$  باکتری (در حجم  $400$  میکرولیتر) به معده هر موش، ۳ بار به فاصله یک روز در میان گاوچ (gavage) شد. به موش‌های شاهد نیز تحت همین شرایط  $400$  میکرو لیتر محیط کشت استریل خوراندند. 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.

آنتی بیوتیک به طور همزمان از یک طرف و مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک‌ها از طرف دیگر پروسه درمان را حداقل در  $20-10\%$  از بیماران با مشکل مواجه ساخته است (۴). یکی از راه های موثر در پروسه درمان استفاده از آنتی بادی های اختصاصی می باشد. 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 خوردن آنتی بادی ها می تواند 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 می دهند که آنتی بادی های تولید شده علیه هلیکوباکتر پیلوری در شیر گاو می تواند 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 ارگانیزم می باشد. بنابراین این آنتی

می تواند 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 می شود. همچنین گزارشات بیانگر این است که باکتری بدون فعالیت اوره آز قادر به ایجاد عفونت در معده انسان نمی باشد (۱۴). با اینکه نقش ایمنی اکتسابی در درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری ناشناخته می باشد، اما تحقیقات نشان داده اند که آنتی بادی های خاصی می توانند در برابر عفونت هلیکوباکتر پیلوری محافظت کننده باشند (۱۴). اخیراً 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 می تواند 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 می باشد، می تواند 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 موش های 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 نوکلیدی مطابق با روش قبلی القا گردید (۲۰). جهت تخلیص IgY ابتدا زرده تخم مرغ از

## تست الایزا

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 نمی‌شد. 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 هایلیکوباکتر پیلوری و تیمار شده توسط IgY)، موش‌های گروه کنترل مثبت (موش‌های آلوده شده توسط هایلیکوباکتر 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 داده‌های بدست آمده از ( T-test (Paired, Unpaired) و P-value (تست فیشر) و نرم افزار Graphpad Prism استفاده شد.

## یافته‌ها

## تخلیص ایمونوگلوبولین از تخم مرغ

محصول به دست آمده از فرایند جداسازی ایمونوگلوبولین مرغی از زرده تخم مرغ‌های 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 شکل ۱، ستون ۱ مربوط به نمونه با بافر فاقد 2ME می‌باشد، باند ایمونوگلوبولین کامل، حاوی پیوند دی سولفیدی با اندازه تقریبی ۱۶۵ کیلوالتونی مشخص است، در حالی که در ستون ۲ و ۳ 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 کیلوالتونی و زنجیره سبک در حدود روبروی مارکر ۳۰ کیلوالتونی قرار گرفته‌اند.

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

نمودار شماره ۱ نشان دهنده میزان تیتراژ آنتی بادی تولید شده در موش‌های گروه آزمایش پس از آلودگی آن‌ها بوسیله هایلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. همان گونه که در نمودار مشخص می‌باشد میزان آنتی بادی‌های تولید شده علیه باکتری در سرم این گروه دارای تفاوت معنی‌داری با میزان تیتراژ آنتی بادی موجود در سرم گروه کنترل منفی ( $P < 0.001$ ) می‌باشد.

نمودار شماره ۲ نتایج الایزای سرم موش‌های کنترل و آلوده قبل و بعد از مواجهه با IgY ضد اوره آز را نشان می‌دهد. کاهش معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) در میزان جذب نوری سرم موش‌های دریافت کننده IgY ضد اوره آز نسبت به سرم همان موش‌ها قبل

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 هایلیکوباکتر پیلوری با روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. به چاهک‌های پلیت الایزای ۹۶ چاهکی، ۲ میکروگرم پروتئین نوترکیب UreC به همراه ۱۰۰ میکرو لیتر بافر بی کرنات ۵۰ میلی مولار اضافه گردید و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به منظور حذف مکان‌های پوشش نیافته توسط آنتی ژن، به چاهک‌ها 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 چاهک‌های 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 میلی گرم O-phenylenediamine Sigma-USA در ۵ میلی لیتر بافر سبترات 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 آن‌ها جدا و در ظرف شیشه‌ای حاوی ۱۰ در صد فرمالدهید قرار داده شد. نمونه‌ها جهت بررسی‌های پاتولوژی به دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله ارسال شدند. پس از تایید آلودگی موش‌های مورد بررسی توسط آزمایش‌های 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 هایلیکوباکتر پیلوری در نظر گرفته شدند و در طول تحقیق مورد تیمار دیگری قرار نگرفتند.

## نحوه تلقیح آنتی بادی IgY به معده موش‌ها

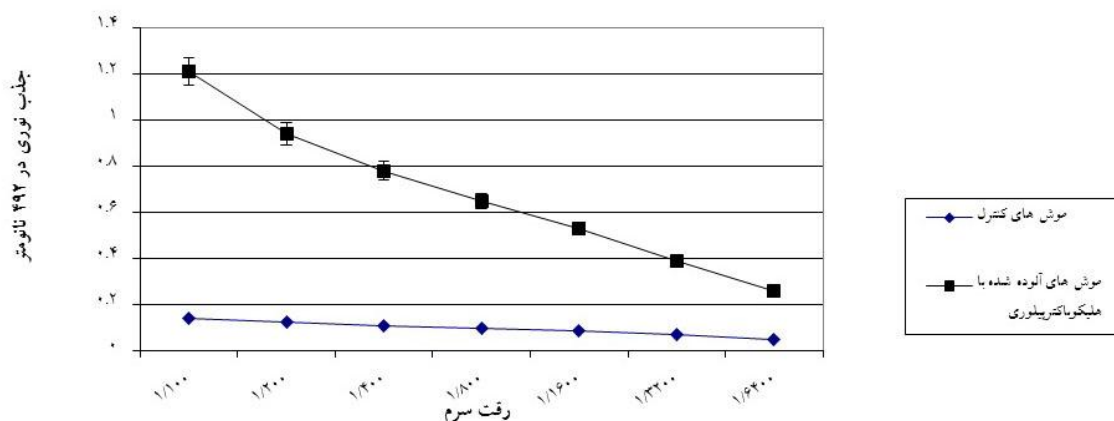
موش‌های گروه آزمایش جهت بررسی اثر درمانی IgY تولید شده علیه اوره آز مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور هر موش به مدت ۲۸ روز و با میزان ۶۰ میلی گرم از IgY حل شده در ۵۰۰ میکرو لیتر PBS به صورت خوراکی و با گاوآژ مستقیم به معده،

همچنین گسترش حفره های گوارشی و از بین رفتن اپیتلیوم نشان دهنده آتروفی شدید این بافت ها می باشد (شکل ۲). پس از ۲۸ روز دوره درمانی توسط IgY ضد اوره آز تولید شده به روش DNA واکسن، بررسی های بافت شناسی نشان دهنده کاهش التهاب و ارتشاح کمتر لنفوسیت ها در زیر مخاط بافت اپیتلیوم می باشد که بیان از توان IgY تولیدی در مهار کلونیزاسیون این باکتری می باشد (شکل ۲).

از شروع درمان وجود دارد. علاوه بر آن میانگین جذب نوری سرم موش های آلوده بعد از درمان تقریباً به سطح سرم موش های کنترل باز گشته است. کم بودن اختلاف بین میانگین دو گروه موش های کنترل و درمان شده با IgY تولید شده علیه اوره آز تأیید کننده اثر مثبت در کنترل هلیکوباکتر پیلوری است.

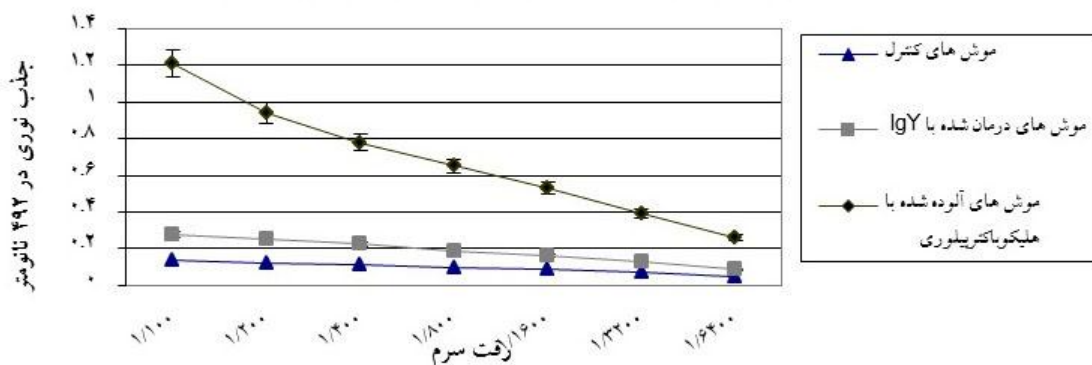
**نتایج بررسی های پاتولوژیکی گروه های مختلف موش ها**  
نتایج پاتولوژی معده موش های آلوده نشان داد که کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در معده این موش ها صورت گرفته است.

بررسی میانگین تولید آنتی بادی در موش های آلوده و کنترل

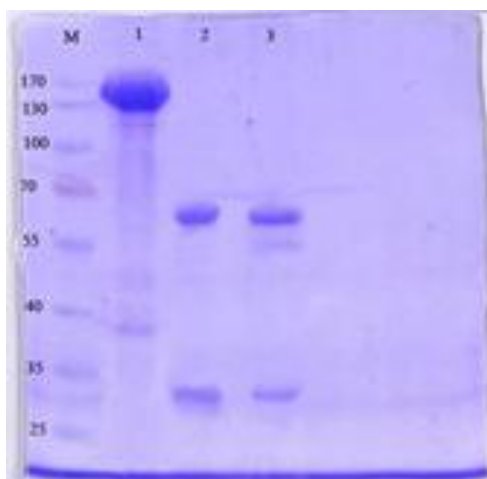


**نمودار ۱:** بررسی میانگین تولید آنتی بادی در موش های آلوده و کنترل: بررسی آلودگی موش های بیمار شده توسط هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با موش های کنترل. میزان جذب نوری سرم موش های آزمایش در رقت های مختلف توسط علامت ■ موش های کنترل توسط علامت ♦ نشان داده شده است.

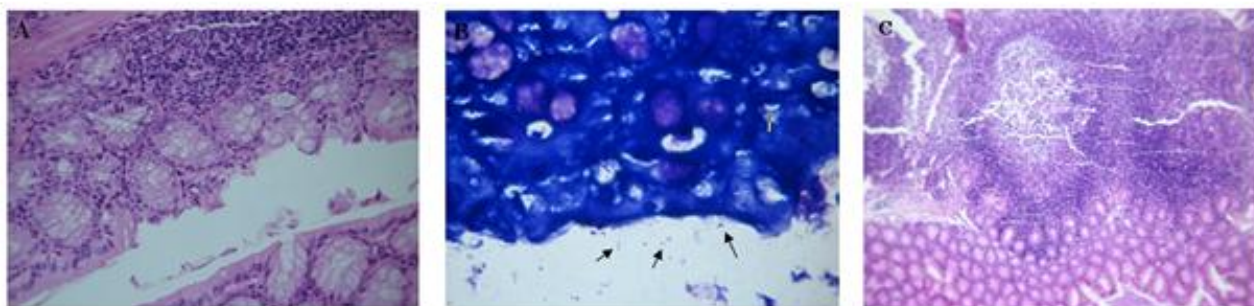
بررسی روند درمان موش های آلوده در مقایسه با موش های کنترل



**نمودار ۲:** بررسی روند درمان موش های آلوده در مقایسه با موش های کنترل: مقایسه میانگین غلظت آنتی بادی علیه UreC نوترکیب در سرم موش های آلوده شده توسط هلیکوباکتر پیلوری و تیمار نشده بوسیله IgY، سرم موش های آلوده و تیمار شده با IgY تولید شده علیه UreC و سرم موش های 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 ۲ و ۳: محصول جداسازی با بافر حاوی 2ME



شکل ۲: بررسی بافت معده موش‌های C57BL/6j

شکل A: حضور سلول‌های ایمنی در بافت معده موش‌های آلوده شده به هلیکوباکتر پیلوری نشان دهنده گاستریت مزمن می‌باشد. نوتروفیل‌های درون بافت اپی تلیال و در سطح و غدد مخاطی نمایان می‌باشند و فولیکول ایجاد شده است. ارتشاح سلول‌های لنفویلاسموسینوئید 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 باکتری‌های خمیده شکل بیانگر ایجاد عفونت و کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در معده موش‌های تست می‌باشد. باکتری‌ها 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 نسبتاً کمتر لنفوسیت‌ها در زیر مخاط وجود دارد که نشان دهنده درمان موش‌های آلوده توسط IgY-HpUc می‌باشد. (رنگ آمیزی گیمسا، بزرگنمایی X400)

## بحث

از آنتی‌بادی‌ها 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 هزینه‌های سنگین ناشی از فرآیندهای تولید و تخلیص آنتی‌بادی‌ها مانعی جهت استفاده گسترده آنها می‌باشد. استفاده از آنتی‌بادی‌های مشتق شده از زرده تخم به دلیل هزینه کم تولید، سهولت تخلیص و قابلیت استفاده آن‌ها در درمان بیماری‌های گوارشی می‌تواند روشی مناسب و تکمیل‌کننده درمان‌های آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های ناشی از هلیکوباکتر پیلوری باشد. بر اساس بررسی‌های به عمل آمده یک میلی‌لیتر زرده تخم مرغ حاوی حدود ۵ میلی‌گرم IgY می‌باشد و با در نظر گرفتن حجم زرده تخم مرغ (۲۸ میلی‌لیتر) هر تخم مرغ می‌تواند حاوی ۱۴۰ میلی‌گرم IgY باشد. با توجه به اینکه هر مرغ در سال قادر به تولید حدود ۲۸۰

هلیکوباکتر پیلوری مهمترین عامل ایجاد کننده زخم معده می‌باشد 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 (۱۹-۲۰). همچنین عفونت‌های طولانی مدت توسط این باکتری می‌تواند منجر به سرطان‌های گوارشی و ایجاد کارسینوما در این ناحیه شود (۲۰). در حال حاضر بیماری‌های ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری توسط آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شوند. با توجه به افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، چنین رویکرد درمانی در ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد با شکست همراه می‌شود (۲۲). با توجه به گسترش سریع سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، جایگزینی و یا به کارگیری یک سیستم کمکی همراه درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بیوتیک در عفونت‌های ناشی از هلیکوباکتر پیلوری یک ضرورت به نظر می‌رسد. استفاده

تخم مرغ است، این محاسبات حدود ۴۰ گرم IgY در ازای هر مرغ ایمن در سال را نشان می‌دهد (۲۳). اختصاصیت آنتی بادی تولیدی وابسته به ایمونوژن انتخاب شده جهت تولید آنتی بادی می‌باشد. گرچه استفاده از عصاره سلولی می‌تواند منجر به تولید آنتی بادی شود، ولی استفاده از آنتی ژن‌های اختصاصی در روند تولید آنتی بادی سبب ایجاد آنتی بادی با اختصاصیت بالا نسبت به پاتوژن مورد نظر می‌گردد و از واکنش‌های متقاطع می‌کاهد. انتخاب UreC به عنوان ایمونوژن در این تحقیق به دلیل اهمیت بالای این زیر واحد در عملکرد آنزیم اوره از هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. تحقیقات نشان داده زیر واحد UreC یکی از بهترین کاندیداها جهت تولید واکسن‌های نوترکیب می‌باشد (۱۶). تولید پروتئین‌های نوترکیب و تخلیص آن‌ها از جمله مراحل پر هزینه تولید آنتی بادی‌ها می‌باشد (۹). استفاده از واکسن‌های مبتنی بر DNA می‌تواند سبب کاهش چشمگیر چنین فرآیندهایی شود. اخیراً نشان داده شده است که واکسن‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک علاوه بر ایجاد ایمنی سلولی، می‌تواند سبب تحریک سلول‌های سیتوتوسیک T شده و همچنین ایمنی خونی را تحریک کند (۲۴). تحقیقات انجام شده نشان داده است که ایمنی خونی ایجاد شده توسط واکسن‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک قابلیت محافظت‌کنندگی داشته و می‌تواند میزان 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 عفونت‌های 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 از را در باکتری هلیکوباکتر پیلوری نیز خنثی نماید (۹، ۲۱). 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 عفونت‌های موش‌های آلوده شده توسط هلیکوباکتر پیلوری استفاده شد. هم‌اکنون جهت شبیه سازی عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری از مدل‌های حیوانی نظیر میمون، سگ، خوک، گربه‌های 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 محدودیت‌هایی 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 (۲۸-۲۹). در این تحقیق موش‌های نژاد C57BL/6J 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 کارایی IgY ضد اوره از در مهار و کاهش عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری از تست‌های سرولوژیکی و پاتولوژیکی استفاده گردید. پاتولوژی تنها روش تشخیصی است که نه تنها حضور باکتری را در معده نشان می‌دهد، 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 می‌دهد. تلاش‌های صورت گرفته در جهت کلونیزه نمودن هلیکوباکتر پیلوری در معده موش‌های Mongolian gerbils و C57BL/6J نشان می‌دهد که ضایعات پاتولوژی به وجود آمده در معده موش‌های C57BL/6J مشابه موش‌های Mongolian gerbils می‌باشد (۲۸ و ۲۳). در این تحقیق همانند تحقیقات انجام شده قبلی بر روی مدل‌های Mongolian gerbils به وضوح مشخص شده است که IgY ضد اوره از صدمات سطوح مخاطی معده ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری را کاهش می‌دهد. بنابراین ارزش درمانی IgY و استفاده از آن به صورت خوراکی در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی همانند Mongolian gerbils، به دلیل توانایی مهار اتصال باکتری‌ها می‌باشد (۳۰ و ۲۲ و ۹). 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 می‌تواند سبب ایجاد ایمنی خونی موثر در میزبان شده آنتی بادی‌هایی با کارایی بالا را سبب شوند. استفاده از واکسن‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک می‌تواند سبب کاهش چشمگیری در هزینه‌های تولید آنتی بادی شود و استفاده از آنتی بادی‌ها به همراه درمان‌های معمول از جمله درمان‌های آنتی بیوتیکی می‌تواند منجر به درمان موثرتر و اختصاصی گردد و از استفاده طولانی مدت آنتی بیوتیک‌ها و ایجاد سویه‌های مقاوم جلوگیری کند.

### نتیجه گیری

ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک هلیکوباکتر پیلوری و همچنین هزینه بالای درمان از جمله مشکلات بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری می‌باشد. یکی از مشکلات تولید این گونه آنتی بادی‌های 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 آنتی بادی تولید شده به روش اسید نوکلئیکی در مدل‌های موشی بیانگر کارایی استفاده از روش واکسن اسید نوکلئیکی در

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 می کند که گام بزرگی در مهار انتشار عفونت هلیکوباکتر پیلوری می باشد.

تولید آنتی بادی های نو ترکیب می باشد. حذف مراحل تولید و تخلیص آنتی ژن سبب کاهش هزینه تولید آنتی بادی های نو ترکیب شده که در نهایت سبب کاهش هزینه درمان خواهد شد. تولید آنتی بادی های نو ترکیب از ایجاد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک

## References

- 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.
- Carlander D, Kollberg H, Wejåker PE, Larsson A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res* 2000; **21**(1): 1-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Evans DJ. Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits\* 1. *Microb Pathog* 1991; **10**(1): 15-26.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 colostrum preparation with specific antibodies. *Helicobacter* 2003; **8**(3): 192-201.
- Mestecky J, Russell M. Passive and active protection against disorders of the gut. *The Veterinary quarterly* 1998; **20**: 83.
- 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.
- Mohammadi M, Doroud D, Mohajerani N, Massarrat S. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Iran. *World Journal of Gastroenterology* 2005; **11**(38): 6009.
- 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.
- Ota H, Genta R. Morphological characterization of the gastric mucosa during infection with *H. pylori*. *The Immunobiology of H pylori: From Pathogenesis to Prevention*. Ernst PB, Michetti P, Smith PD (eds). Philadelphia, Lippincott-Raven, 1977; PP: 15-28.
- Pounder R, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; **9**(2): 33-40.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.