مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ایمنولوژیکی پروتئین نوترکیب FlgE2 در هلیکوباکتر پیلوری بر تغییرات تولید سیتوکین TNF-a در سلول‌های ماکروفاژ در محیط آزمایشگاهی

فروزان عابد کانجو[۱]، ندا سلیمانی[۲]×، سید مسعود حسینی[۳]، جوزوپه زانوتی[٤]

تاریخ دریافت ۱٤۰۱/۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش ۱٤۰۱/۰۵/۲۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف:: *هلیکوباکتر پیلوری* باسیلی گرم منفی است که می‌تواند در لایه‌های موکوسی معده انسان کلونیزه شود. این ارگانیسم بر اساس طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی در بین فاکتورهای کارسینوژن کلاس ۱ قرار دارد. گرچه مطالعات متعددی بر روی واکنش هلیکوباکترپیلوری و سلول‌های ایمنی انجام شده است، ولی بررسی واکنش تک‌تک فاکتورهای بیماری‌زا با این سلول‌ها می‌تواند جنبه‌های مبهم پاتوژنز این باکتری را مشخص کند. بررسی واکنش بین برخی فاکتورهای بیماری‌زای *هلیکوباکتر پیلوری* مانند CagA و VacA با سلول‌های ایمنی مهم است. از طرفی با بررسی نوع واکنش یک فاکتور که به‌عنوان کاندید واکسن نیز مطرح است می‌توان نوع رفتار تحریک سلول‌های ایمنی را در محیط آزمایشگاه قبل از تزریق آن به حیوان آزمایشگاهی ارزیابی نمود. فاکتور پروتئین نوترکیب FlgE2 از هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند به‌عنوان یک کاندید مناسب که تاکنون بررسی نشده است مطرح باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ایمنولوژیکی FlgE2 بر میزان تولید TNF-alpha در سلول‌های ماکروفاژها در شرایط آزمایشگاهی به روش الایزا می‌باشد.

مواد و روش کار: در این پژوهش تجربی با کد اخلاق زیستی د/SBU/1542 ، پروتئین نوترکیب FlgE2 بیان و تخلیص گردید. ماکروفاژهای صفاقی موش استخراج گردید. به‌منظور ارزیابی اثرات پروتئین نوترکیب بر سلول‌های ماکروفاژ از غلظت‌های مختلف ۴ و ۲۰ و ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. مایع رویی مواجهه جداسازی شد و به‌منظور ارزیابی اثرات سیتوکینی در تست الایزا استفاده گردید.

یافته‌ها: بر اساس آنالیز آماری بیشترین میزان ترشح در غلظت µg/ml ۲۰ و پس‌ازآن در غلظت µg/ml ۴ (P<0.0001) و سپس µg/ml ۴۰ (P< ۰،۰۰۱۷) مشاهده شد. آنالیز آماری نشان می‌دهد که نتایج در غلظت µg/ml ۴ و ۲۰ و ۴۰ در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنادار و نزدیک به هم می‌باشد. بااین‌حال، مقدار TNF-α در غلظت µg/ml ۸۰ تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت (P = 0.4028).

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که پروتئین نوترکیب FlgE2 ازجمله فاکتورهای مهم در بیماری‌زایی *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد و بررسی ساختار و عملکرد آن برای راهکارهای کاندید واکسن کارآمد بسیار مهم می‌باشد. این فاکتور پروتئینی به‌خوبی می‌تواند سیستم ایمنی را تحریک نموده و موجب فعال شدن ماکروفاژها گردد. درنتیجه بررسی اثرات این پروتئین به‌صورت جداگانه می‌تواند منجر به راه‌کارهای درمانی جدید و پیشگیری از عفونت‌های *هلیکوباکتر پیلوری* که نیمی از جمعیت جهان را درگیر خود کرده است، شود.

کلیدواژه‌ها: ماکروفاژ، TNF-a، *هلیکوباکتر پیلوری*، پروتئین نوترکیب FlgE2

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره اول، ص ۵۳-٤۵، فروردین ۱٤۰۱

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه شهید بهشتی دانشکده علوم و فناوری زیستی گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، تلفن: ۰۹۹۲۱۷۴۹۷۴۰
Email: soleimani@sbu.ac.ir

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باسیلی گرم منفی است که می‌تواند در لایه‌های مخاطی معده انسان کلونیزه شود (۱). این باکتری به علت توانایی بالا در ایجاد تطابق با محیط برای مدت طولانی در معده انسان زنده می‌ماند (۲). شیوع این باکتری در کشورهای درحال‌توسعه به ۸۰در صد و فراتر هم می‌رسد. هلیکوباکتر پیلوری

[۱] دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشکده شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] دانشیار باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشکده شهید بهشتی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)
[۳] استاد ویروس شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشکده شهید بهشتی، تهران، ایران
[٤] استاد بیوشیمی، گروه علوم زیستی پزشکی دانشگاه پادووا، پادووا، ایتالیا

دومین باکتری پاتوژن شایع می‌باشد و باعث بیماری‌هایی از قبیل زخم دوازدهه، زخم معده، سرطان معده و لنفومای بافت لنفوئیدی همراه مخاط (MALT) معده می‌شود (۳). طی دو دهه گذشته مسائل زیادی از فرایند بیماری‌زایی این باکتری در سطح مولکولی مشخص‌شده ولی یکی از ابهامات بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری این است که مشخص نیست چرا فقط ۱۰درصد الی ۱۵درصد افرادی که با این باکتری کلونیزه می‌شوند به سمت بیماری پیش می‌روند. فاکتورهای احتمالی دخالت کننده شامل ژنوتیپ باکتری، ژنتیک میزبان و پاسخ ایمنی میزبان می‌باشد. از ویژگی‌های برجسته این باکتری فاکتورهای بیماری‌زایی متعدد آن است ولی هنوز یک فاکتور مشخص بیماری‌زا برای هلیکوباکتر در نظر گرفته نشده است، فاکتورهای مهم بیماری‌زایی از قبیل اوره آز، فلاژل، CagA، VacA، BabA، SabA، AlpA/AlpB، IceA، DupA، LPS و OipA می‌باشند (۴). این ارگانیسم اخیراً توسط سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان فاکتور کارسینوژن کلاس ۱ طبقه‌بندی‌شده و شواهد مستقیمی از کارسینوژن بودن آن در مدل‌های حیوانی به دست آمده است (۵ و ۶). آغاز بروز واکنش ایمنی علیه عفونت به‌طور غالب توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن ازجمله ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می‌باشد. نیتریک اکساید تولیدشده از ماکروفاژها یکی از مهم‌ترین واسطه‌های دفاعی در مقابل هلیکوباکتر پیلوری بوده و سیتوکین‌های مختلف، ماکروفاژها را در جهت تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و درنتیجه مقابله و از بین بردن باکتری‌های زنده در مخاط معده را فراهم می‌آورد به طوری که ماکروفاژهای تحریک شده با اینترفرون گاما، هلیکوباکتر پیلوری را مهار می‌کند (۷). چنانچه ترکیبی بتواند محرک افزایش فعالیت و تولید سیتوکین مؤثر در این سلول‌ها گردد، می‌تواند آبشار سیگنالینگ بر ضد میکروارگانیسم عفونتی را فراهم نماید. هلیکوباکتر پیلوری، باکتری فلاژل دار است، که ساختار بنیادی برای زنده ماندن باکتری در معده انسان محسوب می شود. پروتئین FlgE بخشی از قلاب در فلاژل باکتری می‌باشد، که موجب یک اتصال انعطاف پذیر در سطح سلول معده می‌گردد (۷-۵). در ژنوم *H. pylori* دو ژن در موقعیت‌های مختلف وجود دارد که برای بیان ژن FlgE شناخته شده است. FlgE2 هلیکوباکتر پیلوری از ۱۶۰۵ اسیدآمینه تشکیل شده است و وزن مولکولی آن ۶۶ کیلو دالتون می‌باشد. ژن hp0908 کد کننده پروتئین FlgE2 بوده و محل قرار گیری آن در داخل اپرون حاوی ژن‌های hp0906 و hp0907 می‌باشد که به ترتیب پروتئین‌های FliK و FlgD را کد می‌کنند. این پروتئین‌های بیان شده، در تنظیم طول قلاب نقش دارند. از سوی دیگر، ژن hp0870 کد کننده پروتئین FlgE1 است و در داخل اپرونی قرار دارد که آن اپرون حاوی دو ژن تنظیم‌کننده متفاوت شامل: hypA، که نیکل هیدروژناز را کد می‌کند و lpxB که یک لیپید A-دی‌ساکارید سنتاز می‌باشد. مشابه همه پروتئین‌های فلاژلین باکتریایی، FlgE2 نیز با در معرض قراردادن آنتی‌ژن H موجود در بخش جلویی دمین، یک مکان اتصال برای عوامل ضدباکتریایی ایجاد می‌کند. این ویژگی باعث می‌شود که در موارد ایمنی زایی، این پروتئین به‌عنوان هدف واکسن مطرح شود (۸، ۹). پاسخ ایمنی نسبت به *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماری‌زایی این باکتری دخالت دارد. گرچه مدارکی وجود دارد که ثابت می‌کند این باکتری با مکانیسم‌های متعدد می‌تواند از دسترس سیستم ایمنی فرار کند، با این حال واکنش پیچیده *هلیکوباکتر پیلوری* و سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی هنوز کاملاً مشخص نیست (۱۰، ۱۱). مطالعات متعددی بر روی واکنش هلیکوباکترپیلوری و سلول‌های ایمنی انجام شده است. ولی تاکنون مطالعه‌ای بر روی پروتئین نوترکیب FlgE2 صورت نگرفته است. سال‌های اخیر نیز بررسی واکنش بین برخی فاکتورهای بیماری‌زایی هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های ایمنی آغاز شده است. با بررسی نوع واکنش یک فاکتور که به‌عنوان کاندید واکسن نیز مطرح است می‌توان نوع تحریک سلول‌های ایمنی را در محیط آزمایشگاه قبل از تزریق به حیوان آزمایشگاهی ارزیابی نمود. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ایمونولوژیکی پروتئین نوترکیب FlgE2 در هلیکوباکتر پیلوری بر تغییرات تولید سیتوکین TNF-a در سلول‌های ماکروفاژ در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار

القا و بیان پروتئین نوترکیب FlgE2:

در این مطالعه تجربی، با کد اخلاق زیستی د/SBU/1542 در ایتدا توالی ژن FlgE2 (در دانشکده بیومدیکال دانشگاه پادووا ایتالیا) سنتز و در اختیار قرار گرفت. ژن کلون شده در وکتور pet 28a - انتقال داده شد. به‌منظور بیان پروتئین نوترکیب FlgE2، از میزبان بیانی *E.coli* BL21 استفاده شد. جهت انجام القاء از کشت شبانه باکتری در حضور ۵۰g/ml کانامایسین استفاده شد. القا در حجم بالا و پس از رسیدن جذب نوری محیط به حدود ۱-۰/۸ (در طول موج ۵۵۰ نانومتر) انجام شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از محلول IPTG Isopropyl-beta-thio (galactopyranoside) با غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار در هر میلی‌لیتر و انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (۱۲).

ارزیابی پروتئین نوترکیب به روش SDS-PAGE:

به‌منظور بررسی بیان پلاسمید نوترکیب حاوری ژن FlgE2 از روش الکتروفورز SDS-PAGE با غلظت ۱۲/۵ درصد ژل پلی

اکریل آمید و ولتاژ ۱۰۰، در حضور مارکر پروتئین Pre-stain SM0607 ladder (شرکت فرمنتاز و لدر ۲۰۰ کیلودالتون) استفاده شد. در نهایت ژل پلی اکریل آمید با رنگ کوماسی G-250 رنگ آمیزی شده و باند مورد نظر بررسی شد (۱۲ و ۱۳).

تخلیص و بیان پروتئین نوترکیب FlgE2:

از آن جایی که در وکتور مورد استفاده His-tag تعبیه شده بود و با توجه به پرایمر طراحی شده می‌توان از رزین نیکل و کروماتوگرافی تمایلی جهت خالص سازی پروتئین استفاده کرد. به‌منظور تهیه لیز سلولی، رسوب *E.coli* کشت داده شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر washing buffer سوسپانسیون شده و توسط سونیکاتور در ۱۰ سیکل ۴۰ ثانیه‌ای با سرعت ۹۰ درصد تحت شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد شکسته شد. سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ (۲۰ min ,۱۲۰۰۰ rpm, ۴^{O}C)و سوپرناتانت جمع آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. پس از عبور سوپرناتانت پروتئینی شستشوی ستون با چند بافر مختلف، تا زمانی که جذب نوری $_{280\ nm}$خروجی ستون به صفر برسد، ادامه یافت. سپس بافر شستشوی دوم به ستون اضافه شد و تمام خروجی در یک ظرف مجزا نگهداری شد. در نهایت بافر شستشوی سوم اضافه شد و خروجی ستون نیز به طور جداگانه جمع اوری شد. پس از جمع آوری جزء پروتئینی، آنالیز الکتروفورز SDS-PAGE به‌منظور بررسی خلوص آن‌ها انجام شد. به‌منظور حذف ایمیدازول از محلول پروتئینی از روش دیالیز تعویض بافر در حضور بافر PBS استفاده شد (۱۴ و ۱۵).

جداسازی، کشت و تحریک ماکروفاژها:

موش‌های BALB/c ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. در این مطالعه از ماکروفاژهای صفاق موشی استفاده شد. بدین منظور برای جداسازی این سلول‌ها، ۷ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (سیگما) سرد به درون صفاق موش‌ها تزریق و سپس کشیده شد. ماکروفاژها از ۵ سر موش جدا و با هم مخلوط گردید. سلول‌ها پس از شستشو و شمارش به‌صورت سوسپانسیونی از $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر در محیط RPMI دارای ۲ گرم در لیتر سدیم بی کربنات، ۲ میلی مولار L-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰درصد سرم جنین گاوی مهیا شدند و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون درون هر پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای قرار گرفتند و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵در صد کشت داده شد. برای تحریک ماکروفاژها در یک سری از غلظت‌های ۴ و ۲۰ و ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین نوترکیب FlgE2 استفاده شد. هر غلظت آنتی‌ژنی به‌صورت سه تایی به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت ماکروفاژها اضافه شد و یک گروه سلول ماکروفاژ تحریک شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) به‌عنوان کنترل کشت داده شد (۱۶ و ۱۵). جهت بررسی پاسخ سایتوکین TNFα به روش الایزا از مایع رویی کشت های سلولی ماکروفاژی که قبلاً جمع آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود استفاده شد. تست الایزا برای سنجش میزان سایتوکاین مذکور با استفاده از کیتهای تجاری اختصاصی اندازه گیری TNFα انجام شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع جمع اوری شده روی کشت سلول در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا اضافه شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد و پس از طی این زمان، پلیت ها در یخچال در ۴ درجه به مدت ۱۲ ساعت over night قرار داده شد. بعد از گذشت زمان انکوباسیون پلیت ها تخلیه گردید و به وسیله محلول شستشو سه بار و هر بار به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شد. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول blocking در هر چاهک ریخته شد و مجدد پلیت ها به‌صورت فویل پیچ به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون مرحله قبل، پلیت ها سه بار با بافر شستشو مشابه مرحله قبل، شستشو داده شدند و به‌خوبی روی کاغذ تکانده شدند تا هیچ بافری داخل حفرات باقی نماند. در نهایت بعد از پروسه‌های مکرر شستشو و اضافه نمودن انتی بادی اولیه و انتی بادی ثانویه متصل به آنزیم و افزودن سوبسترا، با استفاده از دستگاه ELISA reader، میزان جذب نوری نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از نمونه استاندارد کیت، منحنی استاندارد، رسم و نمونه‌های مورد آزمایش ارزیابی شدند (۱۸ و ۱۷).

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و Prism6 استفاده شد. نتایج داده‌های کمّی براساس میانگین ۳ بار تکرار مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. داده های کمّی از لحاظ دارا بودن توزیع نرمال، بررسی و از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (برای توزیع نرمال)، و از روش Lsd (برای Post Hoc) با سطح معنی‌داری ۵درصد (α=۰/۰۵) استفاده گردید.

یافته‌ها

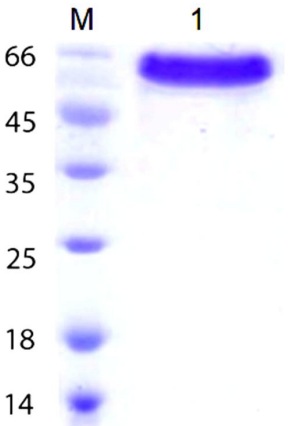
القاء و بیان پروتئین FlgE2در *E.coli BL21*:

جهت ارزیابی پروتئین ساخته شده پس از القاء، ابتدا سلول‌های E.coli لیز شده و سپس پروتئین محلول آن‌ها بررسی شد. پروتئین محلول سلول بر روی ژل پلی اکریل آمید و در حضور ترکیب حاوی SDS از یکدیگر تفکیک شده و پس از رنگ آمیزی با

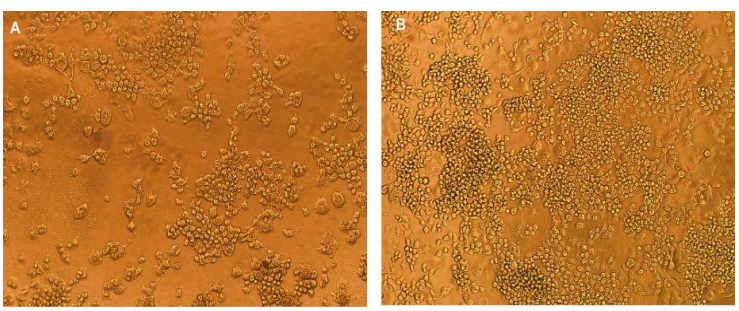
کوماسی G-250 کلوئیدی، مورد بررسی قرار گرفت. از آن جایی که بخشی از پروتئین FlgE2 تولید شده بود، پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۶۶ کیلودالتون به دست آمد (شکل ۱).

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب FlgE2:

نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتئین در محدوده باند ۶۶ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۶۶۰۰۰ دالتون، پیش‌بینی شده همخوانی دارد (شکل ۱) بیان این پروتئین از ساعت سوم آغاز شده و در ساعت پنجم به بیشترین مقدار خود می‌رسید بین ساعت پنجم، هفتم و القا شبانه تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت. با بررسی‌های انجام شده مشخص شد که بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب به صورت ذرات جامد غیر محلول (اینکلوژن) در فاز رسوبی قرار دارند. رسوبی بودن این پروتئین با نتایج به دست آمده از تخلیص فاز مایع حاصل از لیزات سلول با روش Native و استفاده از بافرهای فاقد اوره نیز تأیید گردید و مشخص شد تنها مقادیر اندکی از پروتئین در فاز مایع قرار دارد. بررسی الکتروفورتیک نتایج تخلیص پروتئین نوترکیب حاکی از خلوص قابل‌توجه این پروتئین می‌باشد (شکل ۱). نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ بیان این پروتئین را به طور اختصاصی تأیید کرده و نشان می‌دهد از درجه خلوص بالایی برخوردار است (شکل ۲). براساس اندازه‌گیری با روش برادفورد (به همراه استاندارد BSA) و اسپکتروفتومتری، استحصال پروتئین رسوبی از یک لیترکشت باکتری حدوداً میزان ۱۰ میلی‌گرم تعیین شد. در شکل شماره ۲. اثر تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب FlgE2 با سلول‌های ماکروفاژ و بدون تیمار در گروه کنترل تحریک رشد به‌خوبی مشاهده شد.



شکل (۱): ارزیابی بیان پروتئین FlgE2 در ژل SDS-PAGE(۱۲٪): چاهک ۱: مارکر با وزن پایین، چاهک ۲: FlgE2 القا شده با mM 1/0 IPTG



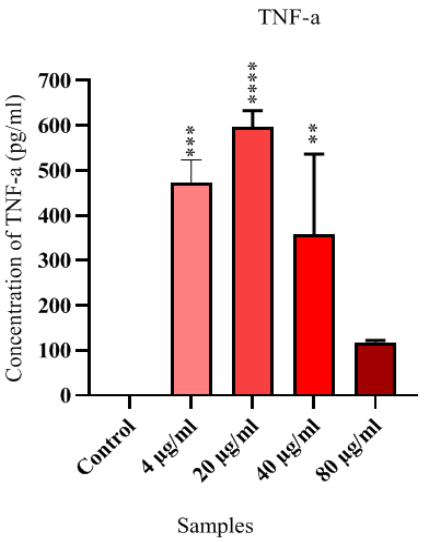
شکل (۲): تیمار سلول‌های ماکروفاژ با پروتئین نوترکیب FlgE2 و بدون تیمار در گروه کنترل. A) گروه کنترل بدون تیمار B) گروه تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب FlgE2

نتایج ELISA برای بررسی تغییرات ترشحTNF-α :

بررسی تغییرات میزان ترشح TNF-α از سلول‌های ماکروفاژی در معرض رقت‌های µg/ml ۸۰- ۴۰- ۲۰ و ۴ از پروتئین نوترکیب با تست الایزا بررسی شد در این تست سلول‌های ماکروفاژی تیمار نشـــده به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شـــد. در نهایت جذب نوری مقدار ســـیتوکین TNF-α در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد. نتایج این تست در نمودار ۱ ارائه شده است.

جدول (۱): نتایج مربوط به اثر غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب بر میزان تولید TNF-a در سلول‌های ماکروفاژی

Sample 80 µg/ml	Sample 40 µg/ml	Sample 20 µg/ml	Sample 4 µg/ml	Control
۱۱۳/۸۴۴	۵۴۱/۰۲	۵۵۸/۶۰۹۶	۴۱۲/۸۶۷۲	۱
۱۲۱/۳۸۲۴	۱۸۴/۲۰۲۴	۶۳۱/۴۸۰۸	۵۰۳/۳۲۸	۱
۱۲۰/۷۵	۳۴۸/۳۲	۶۰۰/۳۴۱	۵۰۰/۶۴۲	۱



نمودار (۱): ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب بر میزان تولید TNF-a در سلول‌های ماکروفاژی

نتایج تـ ست الایزا برای TNF-α در اثر تیمار پروتئین نوترکیب (FlgE2) در غلظت‌های متفاوت موجب ترشـــح مقادیر مختلف از غلظت ســـایتوکین TNF-α را در مقایســـه با گروه کنترل با آزمون اماری t-test ارزیابی شد. همچنین میزان متفاوتی در ترشح TNF-α در ســـایر رقت‌های ۴۰-۲۰ و ۴ µg/ml از پروتئین نوترکیب در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. به اساس آنالیز آماری بیشترین میزان تر شح در غلظت ۲۰ µg/ml و پس‌ازآن در غلظت ۴ µg/ml (P<0.0001) و سپس ۴۰ µg/ml (P< ۰،۰۰۱۷) م شاهده شد. آنالیز آماری نشـــان می‌دهد که نتایج در غلظت ۴ µg/ml و ۲۰ و ۴۰ در مقایســـه با گروه کنترل دارای اختلاف معنادار و نزدیک به هم می‌باشد. اما مقدار TNF-α در غلظت ۸۰ µg/ml در مقایسه با گروه کنترل به اساس آنالیز آماری ۰،۴۰۲۸ تفاوت معنادار را نشان نداده اســت. علامت × بالای نمودار نشـان‌دهنده‌ی تفاوت معنادار با گروه کنترل ا ست. این فاکتور پروتئینی به‌خوبی می‌تواند سی ستم ایمنی را تحریک نموده و موجب فعال شدن ماکروفاژها گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت مطالعه بر روی هلیکوباکتر پیلوری به دلیل شـــیوع این پاتوژن در بیش ۵۰ درصـــد از جمعیت جهان و ایجاد بیماری‌های بسیار مهمی ازجمله گاستریت مزمن، زخم معده و آدنوکارسینومای

معده می‌باشد. هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند ترکیبات سطحی تولید کند که برای نوتروفیل ها و مونوسیت ها کموتاکتیک بوده که به نوبه خود در آسیب سلول‌های اپیتلیال و التهاب دخیل هستند. تاکنون هیچ نوع واکسنی بر ضد هلیکوباکتر پیلوری ارائه نشده است و کارایی آنتی بیوتیک های فعلی کافی نیست. درمان عمدتاً ترکیبی از مهارکننده‌های پمپ پروتون و ۴- ۳ آنتی بیوتیکی است. در حال حاضر مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری روز به روز در حال افزایش است و بروز سویه‌های با مقاومت چندگانه، رخداده و درمان آنتی بیوتیکی را با مشکل مواجه کرده است. بنابراین، ایمنی زایی برای پیشگیری، کنترل بیماری‌های همه گیر و عفونت‌های کودکان ضروری است. درنتیجه، واکسن تنها گزینه پیشنهادی است (۱۹، ۲۰). مطالعات پیشگیری و درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری از اواخر دهه ۱۹۹۱ میلادی بر روی مدل‌های حیوانی آغاز شده است (۲۱). در مورد واکسن هلیکوباکتر پیلوری، نقاط ضعف مختلفی وجود دارد، به طوری که این واکسن‌ها ایمنی را در برابر سایر سویه‌ها و دوزهای بالا فراهم نمی‌کند و امکان بازگشت به نوع وحشی وجود دارد. همچنین ممکن است واکنش پذیری متقابل بین آنتی‌ژن‌های خود باکتری‌ها و سلول‌های میزبان رخ دهد (۲۲).

وجود فاکتورهای ویرولانس با تنوع ژنتیکی بالا در این باکتری، طراحی و توسعه واکسن علیه عفونت‌های ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری را سخت و پیچیده کرده است. اما از آن جایی که اتصال به سلول میزبان اولین قدم برای کلونیزاسیون و ایجاد عفونت توسط این باکتری می‌باشد، لذا واکسن‌هایی که هدفشان جلوگیری از اتصال باکتری به سطح سلول‌های میزبان می‌باشد، از اهمیت بالایی برخوردار هستند. امروزه استفاده از تکنولوژی آنتی‌ژن پروتئین نوترکیب برای واکسیناسیون، شناسایی آنتی‌ژن نوترکیب برای تحریک واکنش ایمنی و استفاده از آنها به جای واکسن‌های گذشته است. اگر چه مطالعات بسیاری در مورد ساخت پروتئین‌های نوترکیب و ارزیابی ایمنی زایی آنتی‌ژن‌های واکسن باکتریایی وجود دارد، اما واکسن کاملاً مؤثر برای جلوگیری از هلیکوباکتر پیلوری معرفی نشده است.

تاکنون مطالعه‌ای بر روی این پروتئین (FlgE2) در دنیا انجام نشده است و برای اولین بار در ایران و دنیا انجام شد است و این مطالعات بازسازی روند پاسخ ایمنی در محیط آزمایشگاه است و نتایج حاصل از ان برای بررسی آنتی‌ژنیسیته برای اهداف واکسن سازی ارزشمند می‌باشد. بررسی‌های پاسخ‌های سایتوکاینی به روش الایزا در این مطالعه با استفاده از غلظت‌های متفاوت پروتئین نوترکیب (FlgE2) به‌عنوان آنتی‌ژن در مواجه با سلول های ماکروفاژی بررسی گردید. آنتی‌ژن‌های (FlgE2) قسمت خارجی از این پاتوژن محسوب می‌شود و آنتی بادی علیه آن به‌عنوان یک سایت تشخیص ضد باکتریایی شناخته شده است و آن را به یک هدف بالقوه برای واکسن جهت درمان ایمونولوژیک تبدیل کرده است. لذا شناخت این ساختار اهمیت ویژه‌ای دارد و ساختار و عملکرد فلاژل در این پاتوژن بسیار مهم است. تاژک هلیکوباکتر پیلوری عامل مهم در جهت کلونیزاسیون ایجاد التهاب و فرار از سیستم ایمنی است (۲۳) نتایج این تحقیق نشان داد که این فاکتور باعث افزایش پروتئین‌های ترشحی التهابی TNFa شده است که با مطالعات صورت گرفته هم سو است (۲۴). پژوهشی در سال ۲۰۱۶ توسط Jinn-jong در مورد اثربخشی پروتئین‌های FlaA و r-FlgK فلاژل بر روی پاسخ سرولوژیک موش‌های Balb/cانجام گرفت. با استفاده از روش ELISA با رقت ۱: ۱۰۰۰ برر سی گردید. در این پژوهش از سه گروه مو شی که در هر گروه ۱۵ سر موش موجود بود و این پژوهش در طی ۴ هفته مورد آزمون قرار گرفت. گروه‌ها به صورت گروه چالش داده شده با گونه وحشی هلیکوباکترپیلوری،(W) گروه چالش داده شده با ایزوژنیک ژن موتانت شدهflg-K (M) گروه ایمن شده با پروتئین r-FlgK قبل از چالش دادن با گونه وحشی هلیکوباکترپیلوریI تقسیم گردیدند. گروه‌ها پس از تست الیزا با آزمون آماریone way ANOVA برر سی گردیدند و تفاوت معناداری در پا سخ و W و همچنین بین M وI دیده شد. همچنین در هر گروه تفاوت معناداری در پاسخ سرولوژیک از هفته اول تا چهارم پژوهش دیده شد (۲۵). لذا دلیل آنکه فلاژل دارای کمترین تنوع آنتی‌ژنی است به‌عنوان کاندید خوبی برای ساخت واکسن هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند معرفی گردد. بر اساس مقاله‌ای از Waskito و همکاران در سال ۲۰۱۸ ساختار فلاژل هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های اپیتلیال باعث افزایش ترشح سایتوکاین های التهابی ازجمله IL-6، IL-8 و TNF-α می‌شود. نتایج تست الایزا برای TNF-α که پروتئین نوترکیب (FlgE2) با تناسب در رقت‌های متفاوت باعث افزایش از غلظت سایتوکین TNF-α را در مقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد. همچنین میزان متفاوتی در ترشح TNF-α و سایر رقت‌های µg/ml ۲۰-۴۰ و ۴ از پروتئین نوترکیب گزارش نشد. آنالیز آماری نشان می‌دهد که نتایج معنادار و نزدیک به هم بودند. درغلظت µg/ml ۴۰ پروتئین و این نتایج با مطالعه Waskito قرابت معنایی داشت (۲۶). تاکنون مطالعه اختصاصی بر روی این فاکتور نوترکیب صورت نگرفته است و برای اولین بار در پژوهش ما به آن پرداخته شده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد این فاکتور موجب تحریک تکثیر ماکروفاژها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سلول‌های ایمنی می‌گردد و سبب افزایش تولید و ترشح TNF-α به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات محرک و فعال کننده ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌شود که این فاکتور در پاکسازی و پاسخ به

موقع سیستم ایمنی بسیار مهم است. لذا این فاکتور می‌تواند به‌عنوان یک کاندید برای طراحی واکسن برای این باکتری مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

این نگارش بخشی از طرح به شماره ۴۰۰۰۶۷۳ از برنامه ICRP می‌باشد، که از حمایت‌های مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری بهره مند شده است.

References:

1. Kranzer K, Söllner L, Aigner M, Lehn N, Deml L, Rehli M, Schneider-Brachert W. Impact of Helicobacter pylori virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells. Infect Immun 2005;73(7):4180-9.
2. Sokolova O, Bozko PM, Naumann M. Helicobacter pylori Suppresses Glycogen Synthase Kinase 3β to Promote β-Catenin Activity. J Biol Chem 2008;283(43):29367-74.
3. Ahmadi Hedayati M, Khani D. Relationship of social risk factors and Helicobacter pylori infection with pathological characteristics of Gastric carcinoma. Iran J Med Microbiol 2020;14(1):43-30.
4 Kraft C, Stack A, Josenhans C, Niehus E, Dietrich G, Correa P, et al. Genomic changes during chronic Helicobacter pylori infection. J Bacteriol. 2006 Jan;188(1):249–54.
5- Wen S, Velin D, Felley CP, Du L, Michetti P, Pan-Hammarström Q. Expression of Helicobacter pylori virulence factors and associated expression profiles of inflammatory genes in the human gastric mucosa. Infect Immun 2007;75(11):5118-26.
6- Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian Gerbils. Cancer Res 1998;58:4255-9.
7. Carlsohn E, Nyström J, Bölin I, Nilsson CL, Svennerholm AM. HpaA is essential for Helicobacter pylori colonization in mice. Infect Immun 2006;74(2):920-6.
8. Loconte V, Kekez I, Matković-Čalogović D, Zanotti G. Structural characterization of FlgE2 protein from Helicobacter pylori hook. FEBS J 2017;284(24):4328-42.
9-Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature 1997;388(6642):539-47.
10-Yoon YH, Barker CS, Bulieris PV, Matsunami H & Samatey FA. Structural insights into bacterial flagellar hooks similarities and specificities. Sci Rep 2016;6(1):1-1.
11- O'Toole PW, Kostrzynska M, Trust TJ. Non-motile mutants of Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae defective in flagellar hook production. Mol Microb 1994;14(4):691-703.
12. Tan ML, Choong PF, Dass CR. Review: doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. J Pharm Pharmacol 2009;61(2):131-42.
13. Saremi S, Atyabi F, Akhlaghi SP, Ostad SN, Dinarvand R. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. Int J Nanomed 2011;6:119-28.
14. Soleimani N, Mobarez A, Jafari Olia M, Atyabi F. Synthesis, Characterization and effect of the antibacterial activity of chitosan nanoparticles on vancomycin- resistant enterococcus and other gram negative or gram positive bacteriaint. J Pure Appl Sci Technol 2015;26(1):14-23.
15. Hosseinzadeh H, Atyabi F, Dinarvand R and Naser Ostad S. Chitosan–Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: Preparation and in vitro study. Int J Nanomed 2012;7:1851-63.

16. Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Haghighi M. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant helicobacter pylori neutrophil-activating protein. J Mazandaran Univ Med Sci 2014;23(2):134-44.
17. Daneshmandi S, Hajimoradi M, Soleimani N, Sattari M. Modulatory effect of Acetobacter xylinum cellulose on peritoneal macrophages. Immunopharmacol Immunotoxicol 2011;33(1):164-8.
18. Yousofi A, Daneshmandi S, Soleimani N, Bagheri K, Karimi MH. Immunomodulatory effect of Parsley (Petroselinum crispum) essential oil on immune cells: mitogen-activated splenocytes and peritoneal macrophages. Immunopharmacol Immunotoxicol 2012;34(2):303-8.
19. Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Al Haghighi M. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant Helicobacter pylori neutrophilactivating protein. J Mazandaran Univ Med Sci 2014:23:134-44.
20. Soleimani, N., & Mobarez, A. M. Effect of recombinant neutrophil-activating protein (HP-NAP) of Helicobacter pylori on peritoneal macrophages. Iran J Pub Health 2014:43(2), 234.
21. Hedayati MA, Salavati S. Transcriptional Profile of Helicobacter pylori Virulence Genes in Patients with Gastritis and Gastric Cancer. Can J Infect Dis Med Microbiol 2021;10:1309519.
22. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. Gastroenterol 1998:115(3):642-8.
23. Antani JD, Sumali AX, Lele TP, Lele PP. Asymmetric random walks reveal that the chemotaxis network modulates flagellar rotational bias in Helicobacter pylori. Elife 2021;10:e63936.
24. Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of Helicobacter pylori.Curr Microb2017;74(7):863-9.
25. Zarei M, Mosayebi G, Khansarinejad B, Abtahi H. Antigenic and immunogenic evaluation of Helicobacter pylori FlaA epitopes. Iran J Basic Med Sci 2017;20(8):920.
26. Kusters JG, Van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clinical Microb Rev 2006;19(3):449-90.

Original Article

IMMUNOLOGICAL EFFECTS OF FLGE2 RECOMBINANT PROTEIN IN *HELICOBACTER PYLORI* ON TNF-A CYTOKINE PRODUCTION IN MACROPHAGE CELLS *IN VITRO*

Frozan abidkanjo[1], Neda Soleimani[2], Seyyed Masoud Hosseini[3], Giuseppe Zanotti[4]*

Received: 12 June, 2022; Accepted: 16 August, 2022

Abstract

***Background & Aims*:** *Helicobacter pylori* is a gram-negative bacillus that can be colonized in the mucosal layers of the human stomach. According to the classification of the World Health Organization, this organism is among the class 1 carcinogens. Although numerous studies have been performed on the reaction between *H. pylori* and immune cells, however, the study of the reaction of individual pathogens with these cells can reveal obscure aspects of the pathogenesis of this bacterium. It is important to study the reaction between some pathogenic factors of *H. pylori* such as CagA and VacA with immune cells has begun. On the other hand, by examining the type of reaction of a factor that is considered also as a vaccine candidate, we can evaluate the type of immune cell stimulation behavior of the factor *in vitro* before injection of it into the laboratory animal. FlgE2 recombinant protein from *H. pylori* can be considered as a suitable candidate that has not been studied yet. The aim of this study was to evaluate the immunological effects of FlgE2 on the amount of TNF-alpha production in macrophage cells in laboratory conditions by ELISA method.

Materials & Methods: In this experimental study with the bioethical code of SBU/1542/D, FlgE2 recombinant protein was expressed and purified. Peritoneal macrophages of mice were extracted. Different concentrations of 4, 20, 40, and 80 µg/ml were used to evaluate the effects of recombinant protein on macrophage cells. Exposure supernatant was isolated and used to evaluate the effects of cytokines on ELISA.

Results: Based on statistical analysis, the highest secretion was observed at the concentration of 20 µg/ml and then at the concentration of 4 µg/ml ($P<0.0001$) and 40 µg/ml ($P<0.0017$). Statistical analysis shows that there was a significant and close difference at 4, 20, and 40 µg/ml, compared to the control group; however, the amount of TNF-α at the concentration of 80 µg/ml was not significantly different from control group ($P = 0.4028$).

***Conclusion*:** This study showed that the recombinant FlgE2 protein is one of the important factors in the pathogenicity of *H. pylori* and its structure and function are very important for effective vaccine candidate strategies. This protein factor can stimulate the immune system and activate macrophages. As a result, investigation of the effects of this protein separately can lead to new treatment strategies and prevention of *H. pylori* infections, which has involved half of the world's population.

Keywords: Macrophage, TNF-a, *H. pylori*, Recombinant FlgE2 Protein

Address: Tehran, Shahid Beheshti University, Faculty of Biological Sciences and Technology, Department of Microbiology and microbial biotechnology.

***Tel*:** +989921749740

E. mail: N_soleimani@sbu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022: 33(01): 53 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

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

[1] *PhD student, Department of Microbiology, School of Biotechnology, Shahid Beheshti School, Tehran, Iran*

[2] *Associate Professor of Medical Bacteriology, Department of Microbiology, School of Biotechnology, Shahid Beheshti School, Tehran, Iran (Corresponding Author)*

[3] *Professor of Virology, Department of Microbiology, School of Biotechnology, Shahid Beheshti School, Tehran, Iran*

[4] *Professor of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences University of Padova, Padova, Italy*