Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(94): 43-50

Investigation of the effect of recombinant Neutrophil activating protein (Hp-NapA) of *helicobacter pylori* on proliferation and viability by peritoneal macrophage from BALB/c mice

Soleimani N[1], Mohabati Mobarez A[1*], Atyabi F[3]

1- Department of Medical Bacteriology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Nanotechnology Research Center, Department of Pharmaceutics, Tehran University of Medical Scieces, Tehran, Iran

Received: 6 Oct 2014, Accepted: 17 Dec 2014

Abstract

Background: The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor of this bacteria. Stimulating the immune system for *helicobacter* infection treatment could have an important role. The aim of study is to assess the effect of recombinant Neutrophil activating protein (Hp-NapA) of *helicobacter pylori* on proliferation and viability of peritoneal macrophages from BALB/c mice.

Materials and Methods: In this experimental study, recombinant Hp-NapA of *helicobacter pylori* was produced in vitro. Mice peritoneal macrophages were purified and cultured. Different concentrations of recombinant Hp-NapA was used for macrophages stimulation. MTT assay was performed to assess the viability and proliferation of macrophages.

Results: The results elucidated that the increasing effect of stimulation with recombinant Hp-NapA was significant at the dose of 30 µg/ml($p=0.01$). The rate of viabitity was significantly higher than control group at the doses of 30 and 60 µg/ml and in the concurrency series of recombinant protein with lipopolysaccharid, there was a statistically significarit increase in proliferation at just these doses.

Conclusion: According to our findings, recombinant Hp-NapA has a positive effect on proliferation, viability and function of peritoneal macrophages. Therefore, it is proposed that recombinant Hp-NapA can be studied as an immunomodulator for immunotherapy.

Keywords: Cell proliferation, Macrophages, *helicobacter pylori*

*Corresponding Author:
Address: Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Email: mmmobarez@modares.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۱ (شماره پیاپی۹۴)، فروردین ۱۳۹۴، ۵۰-۴۳

بررسی اثر پروتئین نوترکیب فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) از هلیکوباکترپیلوری بر میزان تکثیر و بقای ماکروفاژهای صفاق موشی مدل بالبسی

ندا سلیمانی[۱]، اشرف محبتی مبارز[۲*]، فاطمه اطیابی[۳]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، گروه فارماکوسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) یک آنتی ژن حفاظتی و یک فاکتور بیماری‌زایی اصلی هلیکوباکتر پیلوری است. تحریک سیستم ایمنی جهت درمان این باکتری نقش کارآمد دارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر پروتئین نوترکیب فعال کننده نوتروفیلی از هلیکوباکتر پیلوری بر میزان تکثیر و بقای ماکروفاژهای صفاقی موشی مدل بالب سی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: طی یک مطالعه تجربی – آزمایشگاهی، پروتئین نوترکیب Hp-NapA از هلیکوباکتر پیلوری در محیط آزمایشگاه تولید شد. ماکروفاژهای صفاقی موش خارج و کشت داده شد. از غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب Hp-NapA برای تحریک ماکروفاژها استفاده شد. از روش MTT به منظور ارزیابی بقاء و میزان تکثیر ماکروفاژها استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج روشن است که تأثیر افزایش دهنده تحریک از طریق پروتئین نوترکیبHp-NapA در دوز ۳۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر (p=۰/۰۱)، معنی‌دار بود. میزان بقاء در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر شده بود و در سری همزمانی پروتئین نوترکیب به همراه لیپوپلی ساکارید میزان تکثیر نیز در دوزهای مشابه افزایش معنی‌داری از نظر آماری نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های ما، پروتئین نوترکیب Hp-NapA دارای اثر مثبت بر میزان تکثیر، بقا و عملکرد ماکروفاژهای صفاقی دارد. بنابراین، مفروض است که پروتئین نوترکیب Hp-NapA می‌تواند به عنوان ایمنومدولاتور جهت ایمنی درمانی مطرح شود.

واژگان کلیدی: تکثیر سلولی، ماکروفاژها، هلیکوباکتر پیلوری

***نویسنده مسئول:** ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی گروه باکتری شناسی پزشکی

Email:mmmobarez@modares.ac.ir

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری، باکتری بیماری‌زای اختصاصی معده انسان بوده که حداقل در معده بیش از نیمی از افراد جهان کلونیزه شده است. فراوانی ابتلا به عفونت با هلیکوباکتر پیلوری به طور قوی به شرایط اقتصادی و اجتماعی جامعه وابسته است. میزان شیوع در بالغین میانسال در بسیاری از کشورهای در حال توسعه بیش از ۸۰ درصد ارزیابی شده که این میزان در کشورهای صنعتی و توسعه یافته ۵۰-۲۰ درصد می‌باشد. عفونت از طریق بلع دهانی باکتری کسب شده و بین افراد خانواده‌ها و در ابتدای کودکی انتقال می‌یابد(۱، ۲). اکثر مبتلایان بدون علامت بوده با این حال عفونت در برخی از آنها با توسعه اولسرهای پپتیک، آدنوکارسینومای معده، MALT لنفومای معده و لنفومای غیر هوچکینی همراه است(۳، ۴). این ارگانیسم اخیراً توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان فاکتور کارسینوژن کلاس ۱ طبقه‌بندی شده و شواهد مستقیمی از کارسینوژن بودن آن در مدل‌های حیوانی به دست آمده است(۵، ۶). آغاز بروز واکنش ایمنی علیه عفونت به طور غالب توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن از جمله ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می‌باشد. نیتریک اکساید تولید شده از ماکروفاژها یکی از مهم‌ترین واسطه‌های دفاعی در مقابل هلیکوباکتر پیلوری بوده و سیتوکین‌های مختلف، ماکروفاژها را در جهت تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه 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 موثر در این سلول‌ها باشد، می‌تواند آبشار سیگنالینگ بر ضد میکروارگانیسم عفونتی را فراهم نماید. فاکتور فعال کننده نوتروفیلی (neutrophil-activating protein-HP-NAP) یکی از پروتئین‌های مهم هلیکوباکتر پیلوری است. حین رشد باکتری، مولکول‌های HP-NAP از باکتری رها شده و مقداری از آن در سطح غشای خارجی باکتری به شکل متصل باقی می‌ماند(۸). این پروتئین به عنوان یک ایمونومدولاتور مطرح می‌باشد. با توجه به ویژگی‌های پروتئین مورد مطالعه، چنانچه فاکتور فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) نوترکیب بتواند موجب فعال‌سازی و افزایش کارایی ماکروفاژی گردد، می‌تواند به عنوان یک فاکتور کلیدی جهت پیش‌گیری و درمان عفونت مطرح باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر فاکتور فعال کننده نوتروفیلی هلیکوباکتر پیلوری بر روی تکثیر، بقا و زنده بودن ماکروفاژهای صفاقی موش در حضور لیپوپلی ساکارید (LPS) به عنوان یک محرک و بدون آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در طی یک مطالعه تجربی - آزمایشگاهی توالی ژن *napA* توسط شرکت genescript امریکا ساخته شد. ژن کلون شده در وکتور pET - 28a انتقال داده شد. به منظور بیان پروتئین نوترکیب NapA، از میزبان بیانی *E.coli* BL21 استفاده شد. جهت انجام القاء از کشت شبانه باکتری در حضور ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر 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) (فرمنتاز- لیتوانی) با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر و انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد(۹).

به منظور بررسی بیان پلاسمید نوترکیب از روش الکتروفورز SDS-PAGE با غلظت ۱۲/۵ درصد ژل پلی اکریل آمید و ولتاژ ۱۰۰، در حضور مارکر پروتئین Pre-stain ladder SM0607 (شرکت فرمنتاز و لدر ۲۰۰کیلودالتون) استفاده شد. در نهایت ژل پلی اکریل آمید با رنگ کوماسی G-250 (فرمنتاز- لیتوانی) رنگ آمیزی شده و باند مورد نظر بررسی شد(۹).

از آنجایی 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 شد. به منظور تهیه لیز سلولی، رسوب *E.coli* کشت داده شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر IB 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 دقیقه در دور ۱۲۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و سوپرناتانت جمع‌آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد. پس از عبور سوپرناتانت پروتئینی شستشوی ستون با بافرهای متعدد تا زمانی که جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر 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 جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری جزء پروتئینی، آنالیز الکتروفورز SDS-PAGE به منظور بررسی خلوص آنها انجام شد. به منظور حذف ایمیدازول از محلول پروتئینی از روش دیالیز تعویض بافر در حضور بافر PBS (شرکت Merk انگلستان) استفاده شد(۹، ۱۰).

موش‌های بالبسی (BALB/c) ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. برای جداسازی ماکروفاژهای صفاقی، ۱۰ 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 به صورت سوسپانسیونی از $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر در محیط RPMI حاوی مواد مکملی به صورت ۲ گرم در لیتر سدیم بی‌کربنات، ۲ میلی مولار L-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در آمده و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون درون هر پلیت ۹۶ خانه‌ای (نانک) در به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد کشت داده شد. در زمان انکوباسیون سلول‌های چسبان (۹۵ درصد ماکروفاژ) به ته پلیت چسبیدند. پس از انکوباسیون سلول‌های غیر چسبان با سه بار شستشو با RPMI ۳۷ سانتی‌گراد شستشو داده شدند. برای تحریک ماکروفاژها در یک سری از غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۵، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین نوترکیب HP-NAP استفاده شد. هر غلظت آنتی ژنی به صورت سه تایی به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت ماکروفاژها اضافه شد و یک گروه سلول ماکروفاژ تحریک شده به عنوان کنترل کشت داده شد. در سری دوم کشت و تحریک به صورت مشابهی انجام گرفت و علاوه بر آن به همه چاهک‌ها میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی ساکارید به عنوان محرک عمومی ماکروفاژها اضافه شد. از PBS به عنوان کنترل منفی و از اینترفرون گاما به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

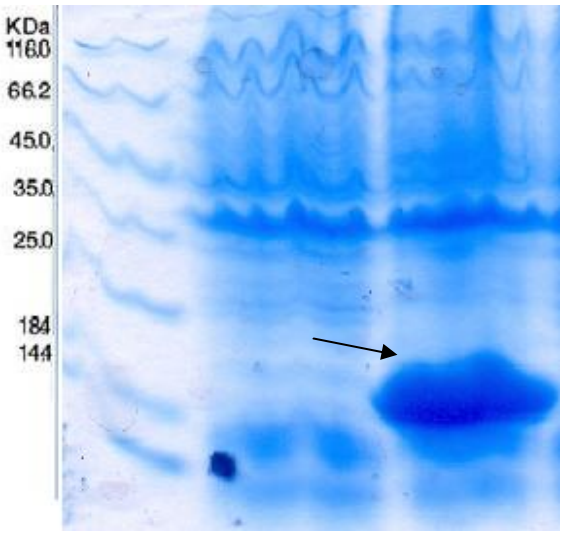
آزمون MTT بر اساس احیاء MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] می‌باشد که نشان دهنده فعالیت متابولیک داخل سلولی است؛ هر چقدر تعداد سلول‌ها بیشتر باشند میزان احیاء MTT بیشتر خواهد بود و بالعکس(۱۲). پس از ۴۸ ساعت کشت ماکروفاژها ۲۰ میکرو لیتر (PBS ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) MTT (شرکت Merk انگلستان) به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون محیط روئی کشت به آرامی برداشته شد و ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO (شرکت Sigma-Aldrich امریکا) به چاهک‌ها اضافه شد تا کریستال‌های فرمازان تشکیل شده حل گردند و سبب ایجاد رنگ شوند. میزان جذب چاهک‌ها در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به دست آمده بر حسب اندکس تحریک (Stimulation Index-SI) محاسبه گردید که SI میزان جذب ۵۷۰ هر تست به جذب ۵۷۰ کنترل منفی می‌باشد(۱۰، ۱۱). بررسی زنده بودن و بقای سلول‌های تیمار شده با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو ارزیابی شد. بدین منظور گروه‌های سلولی مجزای تیمار شده با پروتئین نوترکیب جهت ارزیابی تریپسینه شدند. پس از انجام فرایند شستشو سلول‌ها با نسبت برابر از تریپان بلو رنگ آمیزی و با استفاده از لام نئوبار درصد سلول‌های زنده تعیین گردید.

در پایان داده‌ها به صورت انحراف معیار±میانگین گزارش شد و واکاوی آماری داده‌های آزمون‌ها در غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب با استفاده از آزمون واکاوی واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey) بررسی گردید. نتایج با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و Prism نسخه ۶ بررسی و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

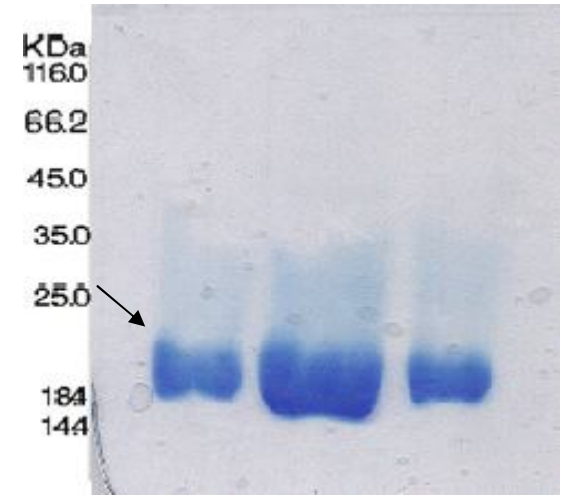
یافته‌ها

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 دترژنت 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 NapA تولید شده بود، پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون به دست آمد(شکل ۱).

نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتئین در محدوده باند ۲۰ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۲۰۴۷۷دالتون 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 تایید گردید و مشخص شد تنها مقادیر اندکی از پروتئین در فاز مایع قرار دارد. بررسی الکتروفورتیک نتایج تخلیص پروتئین نوترکیب حاکی از خلوص قابل توجه این پروتئین می‌باشد(شکل ۱). براساس اندازه‌گیری با روش برادفورد (به همراه استاندارد BSA) و اسپکتروفتومتری، استحصال پروتئین رسوبی از یک لیترکشت باکتری حدودا میزان ۴۰۰ میلی‌گرم تعیین شد(شکل ۲).



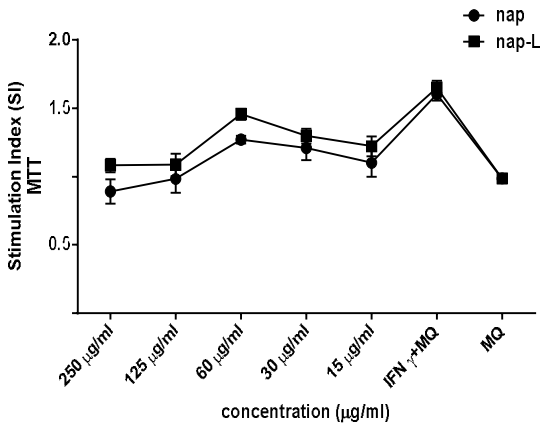
شکل ۱. ارزیابی بیان پروتئین NapA در ژل (۱۲٪)-SDS PAGE : چاهک ۱ : مارکر با وزن پایین، چاهک ۲ : NapA القا نشده، چاهک ۳: NapA القا شده با IPTG ۰/۱ mM



شکل ۲. تخلیص و تغلیظ پروتئین NapA در ژل (۱۲٪)-SDS PAGE

نتایج آزمون بقاء ماکروفاژهای مواجهه شده با غلظت‌های مختلف NapA در حضور و غیاب LPS در نمودار ۱ نشان داده شده است. آزمون آماری در مقایسه SI (نشان از تعداد سلول‌ها) حاکی از آن است که بقاء سلولی در گروه‌های مواجهه شده NapA و عدم حضور LPS کمتر از گروه کنترل می‌باشد(p=۰/۰۱۵) و در سری

تحریک شده با ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر LPS تفاوتی بین گروه‌های مختلف دیده می‌شود(p=۰/۰۰۱).



نمودار ۱. بررسی میزان بقاء ماکروفاژها با محاسبه SI در تیمار با غلظت های مختلف Hp-NapA

بحث

با توجه به منابع موجود، HP-NAP به عنوان آگونیست TLR2، دارای خاصیت ایمونومدولاتوری بوده و توانایی القای بیان اینترلوکین ۱۲ و ۲۳ (Interleukin-IL) از مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های انسانی را دارد(۱۲). حقیقی و همکاران از روش بیوانفورماتیک برای بهینه سازی کلون ژن مورد نظر در اشریشیاکلی استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد ژن کلون شده با پرایمرهای مهندسی شده و در نهایت پروتئین تولید شده حدود ۲۰ کیلودالتون بود(۱۲). در این تحقیق پروتئین فعال کننده نوتروفیلی نوترکیب از هلیکوباکتر پیلوری ساخته شد. نتایج SDS-page بیان این پروتئین را تائید کرد. این نتایج نشان می‌دهد پروتئین نوترکیب باکتریایی به درستی تولید شده و اندازه آن حدود ۲۰۴۷۷ دالتون می‌باشد. حاجی مرادی و همکاران اثر غضروف کوسه بر تولید میزان نیتریک اکساید و بقای ماکروفاژهای صفاق موشی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بررسی‌های آنها نشان داد که غضروف کوسه موجب افزایش تولید نیتریت می‌شود(۱۳). یوسفی و همکاران اثرات ایمنومدولاتوری اسانس جعفری را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعات آنها حاکی از آن بود که این مشتق گیاهی موجب سرکوب شدند فعالیت ماکروفاژی و تولید نیتریک اکساید می‌شود(۱۱). سلیمانی و همکاران اثر اسانس گیاه زیره را بر فعالیت و میزان تکثیر ماکروفاژی ارزیابی نمودند(۱۴). اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بررسی پروتئین نوترکیب هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یک محرک و کاندید درمانی انجام نپذیرفته است و این مطالعه برای اولین بار انجام گرفته است. در این مطالعه ما فاکتور فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) را بر روی ماکروفاژها در دو سری تحریک شده با LPS و بدون تحریک با LPS اثر دادیم و نتایج نشان داد که در سری ماکروفاژهایی که با غلظت‌های متفاوتی از فاکتور فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) مواجه شده بودند، میزان بقاء و رشد سلولی در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری از گروه کنترل منفی (شاهد PBS) بیشتر و در حد شاهد مثبت اینترفرون گاما شده بود که می‌تواند به علت افزایش در رشد ماکروفاژها و تعداد بیشتر سلول‌های فعال و یا اثر پروتئین نوترکیب فاکتور فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) بر روی عملکرد ماکروفاژهای موجود باشد. در سری ماکروفاژهایی که با LPS به عنوان فعال کننده عمومی تحریک شده بودند، آزمون MTT نشان می‌هد که میزان بقاء و رشد سلولی در گروه های مختلف تفاوت را با هم نشان می‌دهد، لیکن دوز ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از فاکتور فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) سبب افزایش مؤثر فعالیت و تکثیر ماکروفاژها در مقایسه با پروتئین به تنهایی می‌شود. کمترین میزان تحریک در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است، با افزایش غلظت و کاهش سطح تحریک شاید به دلیل اثر سرکوب کنندگی آن در غلظت‌های بالاتر باشد. با توجه به اطلاعات، این پروتئین با داشتن پتانسل تغییر پاسخ‌های سیستم ایمنی، سبب تغییر فنوتیپ از لنفوسیت T کمکی نوع ۲ به فنوتیپ لنفوسیت T کمکی نوع ۱ به واسطه تولید اینترفرون گاما و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا می‌شود. آغاز بروز واکنش ایمنی علیه عفونت و سرطان به طور غالب توسط سلول‌های دندریتیک می‌باشد. این سلول‌ها مولکول‌های سازگاری نوع I و II و مولکول‌های کمک محرک را به میزان زیادی بیان می‌کنند

و مسیر پاسخ ایمنی به سمت لنفوسیت T کمکی نوع ۱ به وسیله سیتوکین‌های تولید شده توسط آنها تعیین می‌گردد. در حقیقت HP-NAP به عنوان ابزاری جدید برای جهت دادن سیستم ایمنی به خصوص سلول‌های دندریتیک به سمت پاسخ لنفوسیت T کمکی نوع ۱ شناخته شده است و سلول‌های مذکور را به خوبی تحریک می‌کند(۱۵). با توجه به خواص موجود، این کمپلکس می‌تواند ابزار مناسب و موثری جهت کاربردهای ایمنی درمانی برای درمان عفونت و سرطان در آینده باشد(۱۶، ۱۷). تحریک سیستم ایمنی سلولی راهی مناسب جهت درمان عفونت‌های درون سلولی و نیز سرطان هاست. با توجه با ماهیت درون و بیرون سلولی هلیکوباکتر پیلوری، این پروتئین علیه خود این باکتری هم می‌تواند مفید واقع گردد. این مطالعه گشایشی برای ایده مذکور جهت درمان عفونت‌ها و سرطان با استفاده از خاصیت ایمنومودولاتوری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

محصولات ثانویه باکتریایی با اثرات مختلف بر سلول‌های سرطانی و سلول‌های ایمنی در ایجاد پاسخ مناسب برای درمان به عنوان یک کاندید مطرح می باشند لذا انجام آزمایشات حیوانی می‌تواند در رسیدن به این هدف غایی رهنمون نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از رساله دکتری بوده و نویسندگان از گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری داشته‌اند، کمال تشکر را می‌نماید.

منابع

1. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, et al. Oral immunization with urease and Escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori–infected adults. Gastroenterology. 1999;116(4):804-12.

2. Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, et al. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: A comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. Journal of gastroenterology and hepatology. 2001;16(7):734-9.

3. Zhuang X, Lin S. Progress in research on the relationsh between Hp and stomach cancer. World Chinese Journal of Digestology. 2000;8(2):206-7.

4. Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, Siepman NY, Sugg JE, Hopkins RJ. Helicobacter pylori and Early Duodenal Ulcer Status Post-Treatment: a Review. Helicobacter. 2001;6(2):84-92.

5. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. Gastroenterology. 1998;115(3):642-8.

6. Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer research. 1998;58(19):4255-9.

7. Carlsohn E, Nyström J, Bölin I, Nilsson CL, Svennerholm A-M. HpaA is essential for Helicobacter pylori colonization in mice. Infection and immunity. 2006;74(2):920-6.

8. Nyström J, Svennerholm A-M. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against H. pylori that is reflected by specific mucosal immune responses. Vaccine. 2007;25(14):2591-8.

9. Iankov ID, Penheiter AR, Carlson SK, Galanis E. Development of monoclonal antibody-based immunoassays for detection of Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. Journal of immunological methods. 2012; 384(1):1-9.

10. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of Escherichia coli O157: H7. Vaccine. 2010;28(42):6923-9.

11. 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.

Immunopharmacology and immunotoxicology. 2012; 34(2):303-8.
12. Haghighi M, Mohabati Mobarez A, Salmanian A, Zali M, Moazzeni S, Karkhane A. Application of Bioinformatics and Genetic Engineering for Designing Optimized Cloning and Overexpression of Neutrophil Activating Protein of Helicobacter pylori in Escherichia coli. ZUMS Journal. 2013;21(85):40-54.
13. Hajimoradi M, Daneshmandi S, Hassan Z. Effect of Shark Liver Oil on Nitric Oxide Production and MTT Reduction by Peritoneal Macrophages from BALB/c mice. 2008; 41: 64-70.
14. Soleimani N, Daneshmandi S, Sattari M, Pourfathollah AA. Immuno-modulatory and anti-tumor effects of cuminum cyminum essential oil. Arak Medical University Journal. 2011;13(4):22-9.
15. Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Giudice GD, et al. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils. European journal of immunology. 2003;33(4):840-9.
16. Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of Helicobacter pylori is a protective antigen and a major virulence factor. The Journal of experimental medicine. 2000;191(9):1467-76.
17. Wang G, Hong Y, Olczak A, Maier SE, Maier RJ. Dual roles of Helicobacter pylori NapA in inducing and combating oxidative stress. Infection and immunity. 2006; 74(12): 6839-46.