مقاله پژوهشی

آنتی ژنهای ایمونوژن شاخص سوشهای H. pylori جدا شده از بیماران مبتلا به بیماریهای مختلف دستگاه گوارش

دکتر شهره فرشاد* ، دکتر عزیز ژاپونی، دکتر عبدالوهاب البرزی***، دکتر کامران باقری لنکرانی******
دکتر سیدعلیرضا تقوی***، مرضیه حسینی******

دریافت : ۸۷/۱۲/۱۷ ، پذیرش : ۸۸/۵/۷

چکیده:

مقدمه و هدف: هلیکو باکتر پیلوری (H. pylori) یک پاتوژن انسانی میباشد که روی مخـاط گوارشـی تـاثیر گذاشـته و سـبب یـک پروسه التهابی منجر به بیماریهای مختلف معده می شود. عوامل ایجاد کننده پیامدهای مختلف این عفونت کاملاً مشخص نیستند. هدف از این مطالعه، بررسی پروتئینهای ایمونوژن در سوشهای H. pylori می باشـد کـه از بیمـاران مبـتلا بـه بیماریهـای مختلـف گوارشی جدا شده اند.

روش کار: در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی پروتئین های تام ۱٤٤ سوش H. pylori جدا شده از سه گروه بیمار (دارای زخم معده ۳۷ نفر، فاقد زخم ۷۷ نفر و مبتلا به سرطان معـده ۳۰ نفـر) بوسـیله روش سـدیم دودسـیل سـولفات- پلـی اکریـل آمیـد ژل الکتروفورزیس یک بعدی (1D-SDS-PAGE) جدا شده و سپس با سرم میزبانهای مربوطه بلات شدند.

نتایج : دراین روش اعضای هر گروه بر حسب شباهت در الگوهای پروتئینی ارتباط بالایی را نشان دادند و بنابراین در یـک گـروه قرار گرفتند. الگوی ایمونوبلاتها با الگوی ژلهای رنگ آمیزی شده با روش کوما سی بریلیانت بلو متفاوت بودند. برخی از باندهای پروتئینی جدا شده در SDS-PAGE بوسیله روش بلاتینگ تـشخیص داده نـشدند. تنهـا بانـدهای ۱۰۶و ٤٥ کیلـو دالتـونی (KD) سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران با سرطان معده بطورمعنی دار واختصاصی با سـرمهای بیمـاران مربوطـه شـان شناخته شدند (P< ۰/۰۵) وباند۱۳KD به صورت اختصاصی با سرمهای بیماران فاقد زخم شناسایی شـدند (P< ۰/۰۵). بجـز ایـن باندها، در الگوی بلاتینگ سرمهای تمام بیماران اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه نهائی: این مطالعه با استفاده از روش بلاتینگ یک بعدی ، توانست ۲ باند پروتئینی آنتی ژنی ۱۰۶ و ٤٥ کیلـو دالتـونی بـرای سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران سرطانی و یک باند ۱۳KD برای سوشهایی که از بیماران فاقد زخمی جدا شـده بودند را که بطور اختصاصی با سرم میزبانان مربوطه شان واکنش نشان دادند شناسایی کند.

کلید واژه ها : بیماریهای گوارشی / پروفایل پروتئینی / هلیکوباکتر پیلوری

* دانشیار مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی دکتر البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز(s_farshad@yahoo.com)
** استادیار مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی دکتر البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
*** استاد گروه اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
**** استاد مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شیراز
***** دانشیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شیراز
****** کارشناس مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی دکتر البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مقدمه :

هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایعترین علل عفونت انسان در تمامی دنیا است. این ارگانیسم در لایه مخاطی معده انسان و علیرغم پاسخ ایمنی بدن برای دهها سال و احتمالاً برای تمامی عمر باقی می ماند و باعث بیماریهای مختلف گوارشی مانند ورم معده ، زخم معده و سرطان می شود (۴-۱). عوامل وابسته به میزبان، باکتری یا محیط می توانند تعیین کننده پیامدهای طولانی مدت یک عفونت شوند(۱۰-۵). برای افزایش درک H. pylori و واکنش متقابل آن با میزبان انسانی ، شناسائی پروتئینها و سایر آنتی ژنهائی که سوشهای مختلف H. pylori تولید میکنند و نیز پاسخهای سیستم ایمنی انسانی اهمیت بسیاری دارند.(۱۱) علاوه براین تفاوت ژنتیکی بالا و تفاوت در تظاهر فاکتورهای بیماریزا در بین سوشهای مختلف H. pylori ممکن است در بروز نتایج عفونت تاثیر گذار باشند(۱۴-۱۲). با ازدیاد پیدایش سوشهای هلیکوباکتر پیلوری مقاوم به دارو، ابداع یک واکسن مؤثر می تواند یک جایگزین مناسب برای کنترل یا حتی پیشگیری از عفونت H.pylori باشد. بدلیل نا همگونی زیاد در سوشهای H. pylori نیاز فراوانی به آنتی ژنهایی که در بین سوشهای مختلف محافظت شده باشند تا بتوانند بعنوان واکسن بکار روند و نیز آنتی ژنهایی که ارزش تشخیصی داشته باشند احساس می شود(۱۷-۱۵). همچنین مشخص شده است که بلاتینگ عصاره پروتئینی کامل باکتری میتواند اساس یک روش سرولوژی غیر تهاجمی جهت ارزیابی عفونت قبلی با H. pylori در بیماران مبتلا به گاستریک آتروفیک باشد(۱۸).

برای یافتن این گزینه ها بایستی مارکرهای سرولوژیک اختصاصی H. pylori که نشانگر یک وضعیت بالینی می باشند تعیین شوند. مقایسه الگوهای تشخیصی آنتی ژنی در سرم بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری مبتلا به وضعیتهای مختلف بالینی مانند مبتلایان به زخم معده یا بیماران فاقد زخم یا افراد مبتلا به سرطان معده شاید بهترین راه دسترسی تشخیص چنین نشانگرهای مناسب باشند.

هدف از مطالعه فعلی یافتن پروتئینهای ایمونوژنیک در سوشهای H. pylori جدا شده از بیماریهای مختلف گوارشی بوسیله روش ایمونوبلاتینگ با سرمهای میزبانان مربوطه شان می باشد. نتایج حاصله می توانند اطلاعاتی را در رابطه با آنتی ژنهای پروتئینی بالقوه جهت استفاده در تشخیص سرولوژیکی و واکسیناسیون فراهم سازند.

روش کار:

بیماران و نمونه ها : در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی تعداد ۱۴۴ بیمار که به دلیل ناراحتی گوارشی به بخش اندوسکوپی بیمارستان نمازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز مراجعه کرده بودند موردبررسی قرار گرفتند. تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری و تائید نوع بیماری گوارشی از نظر آسیب شناسی بوسیله مرکز آسیب شناسی بیمارستان انجام گرفت. از هر بیمار، ۲ نمونه از body و antrum گرفته شده و در محیط انتقالی (حاوی محیط آبگوشتی مغز و قلب غنی شده با ۲۰٪ گلوکز) به آزمایشگاه ارسال شدند. همزمان نمونه های خون از بیماران گرفته شده و پس از انتقال به آزمایشگاه سرم آنها جدا و در دمای $-20^{\circ}C$ برای استفاده بعدی ذخیره شدند. بیمارانی که در طی دو هفته قبل از اندوسکوپی جهت درمان از آنتی بیوتیک یا مهار کننده پمپ پروتونی و یا ترکیبات بیسموت استفاده کرده و یا عمل جراحی قبلی معده داشتند از مطالعه حذف شدند.

جدا سازی سوشهای هلیکو باکترپیلوری : نمونه های بیوپسی بیماران به آرامی هموژنیزه شده و برروی محیطهای اوره آز سریع و بروسلا آگار(Merk, Germany) غنی شده با ۱۰٪ خون لیزشده اسب و حاوی آنتی بیوتیکهای آمفوترپسین B (۲mg/L), تری متوپریم (۵ mg/L) و نالیدیسیک اسید (۱۰ mg/L) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان, کشت داده شدند. کشتها به مدت ۱۰-۵ روز در حرارت ۳۷°C در محیط میکروآئروفیلیک (حاوی ۶٪ اکسیژن، ۷/۱٪ دی اکسید کربن, ۷/۱٪ هیدروژن و ۷۹٪ نیتروژن) نگهداری شدند. سپس نمونه ها جهت تأئید وجود هلیکوباکترپیلوری بر اساس مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم و تستهای اوره آز سریع، اکسیداز و کاتالاز مثبت ارزیابی شدند(۱۹).

تهیه پروتئین تام سلولی : سوشهای H. pylori از روی محیط جامد جمع آوری شده و از آن سوسپانسیونی حاوی 6×10^{10} cfu/ml در PBS استریل تهیه شد. این سوسپانسیون سلولی ۲ بار توسط PBS سرد(M sodium chloride ۰/۱۵ ,mM sodium phosphate ۵۰ و PH=۷/۲) حاوی protease inhibitor phenylmethylsufonyl fluoride ۱mM (PMSF; Sigma, USA) شسته شد.

سپس رسوب باکتری در بافر لیز کننده (۰/۷۵٪ Tris, ۲٪ dodecyl sulfate sodium, ۵٪ dithiothreitol, ۱۰٪ glycerol و ۰/۱٪ bromophenol blue) لیـز شـد(۲۰). محلول یکنواخت بدست آمده به مدت ۵ دقیقه دربن ماری حاوی آب جوش قرار گرفته و سپس در دمای ۲۰- درجـه تا زمان مصرف ذخیره گردید.

SDS-PAGE و ایمونوبلاتینـگ: اجـزاء پـروتیئن تـام سـلولی بوسیله روش SDS-PAGE با دستگاه Hoefer Se/SE 660 (Amersham Pharmacia Biosciences San Francisco, USA) با استفاده از ژل ۱۰٪ طبق روش Laemmli جـدا شدند(۲۱). در هر سری آزمـایش از مـارکر وزن مولکـولی (Protein Molecular Weight Standards, broad range, Amersham Biosciences, UK) جهـت تعیـین وزن مولکولی قطعات پروتئینی نمونه ها استفـاده شد. پس از الکتـروفورزیس یک ژل به روش Commassie Brilliant Blue G-250 رنگ آمیزی وژل دوم از همان نمونه ها طبق روش Sambrook ایمونو بلات شد(۲۲). ژلهای رنگ شـده اسکن‌شده و وزن مولکولی باندهای مربوطه طبق مارکرهای مولکولی پروتئینی تعیین گردید. در بلاتینگ پروتئینها بـا استفاده از دسـتگاه Semi-Dri Blotting System (Hoefer TE 77، Amersham Biosciencs, San Francisco, USA) به غشاء PVD منتقل شدند. بلاتینگ در مدت دوساعت و باشدت جریان MA/Cm^2 ۱ انجام گرفت. سپس غشاءها برای ۴۵ دقیقه در PBS حاوی ۲٪ آلبومین سرم گاوی در دمای اتاق قرار گرفته وبعد از شستشو با PBS-T (phosphate buffer saline containing 0.65% tween 20) برای مدت ۳ تا ۵ دقیقه، با سرم بیماران که ۱/۸۰ رقیق شـده بودنـد به مدت ۲ ساعت در حرارت اتاق اینکوبه شدند. در مرحلـه بعد انکوباسیون در یک رقت ۱/۱۰۰۰ از آنتی سرم peroxidase conjugate coat anti-human polyvalent IgG به مـدت ۲ ساعت انجام شد. شستشو دربین زمانهـای اینکوباسـیون به وسـیله PBS-T انجـام گـشت. پـس از ۳ بـار شستـشو باندهای پروتئینی با اینکوباسیون بلاتها در حرارت اتاق در یک محلول PBS حاوی ۷-۴ µl از 4-chloro-1-naphtol و H_2o_2 (بـه نـسبت وزن بـه حجـم ۰/۱٪) ظـاهر شده و سپس واکنش بوسیله شستشو در آب مقطر متوقف شـد. بلاتینـگ بـرای هـر سـوش H. pylori جـدا شده از بیماران مختلـف بـا سـرم بیمـاران مربوطـه انجـام گرفت.

نتایج :

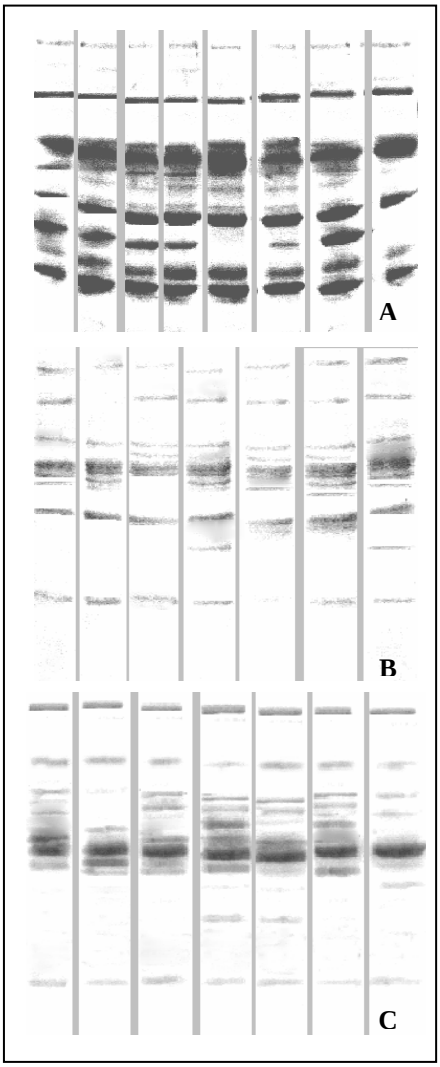
گروه بیماران: طبق یافته های بالینی و آسـیب شناسـی بیماران به سه گـروه تقـسیم شـدند: بیمـاران دارای زخـم معده (۳۷ نفر)، بیمـاران فاقـد زخـم (۷۷ نفـر) و بیمـاران مبتلا به سرطان معده (۳۰ نفر)

جدا سازی هلیکوباکتر پیلوری: به ترتیب از body و antrum معده ۲۸ و ۳۰ بیمار دارای زخم ۳۱ و ۳۵ بیمار فاقد زخم و ۱۱ و۱۳ بیمار سرطانی هلیکوباکتر پیلوری جدا شـد. بـا یافته های پاتولوژی وجود ارگانیسم در این نمونه ها مـورد تأئیـد قرارگرفـت. ویژگیهـای بیمـاران شـامل سـن، جـنس وعفونت با هلیکوباکتر پیلوری در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ : ویژگیهای بیماران مورد بررسی در این مطالعه

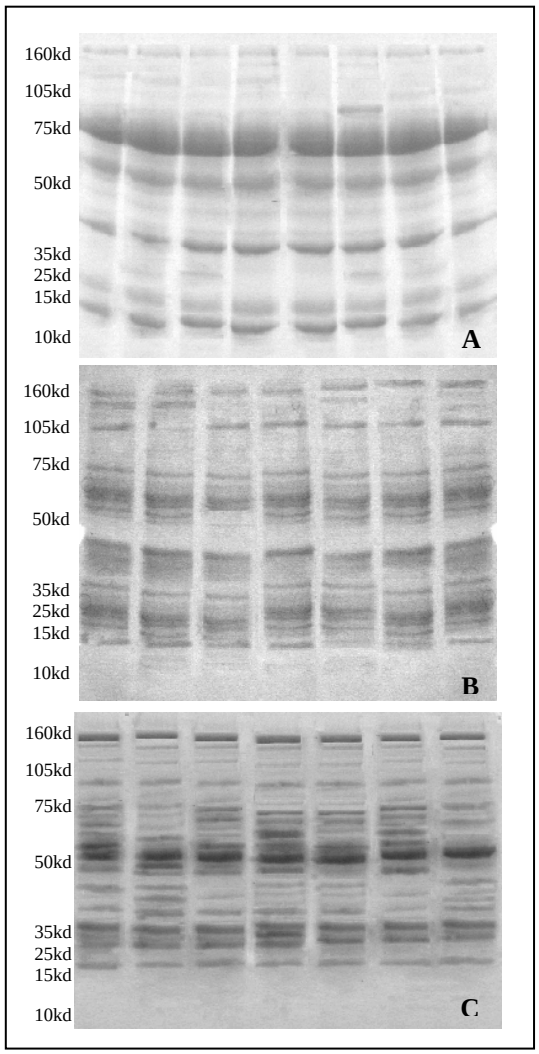
گروه بیماران	طیف سنی	میانگین سن	مذکر	مؤنث	تعداد موارد مثبت هلیکوباکترپیلوری پاتولوژی Antrum	پاتولوژی Body	کشت Antrum	کشت Body
فاقد زخم	۸۰-۱۶	۱۵±۴۸	۳۲	۴۵	۳۵	۳۱	۳۷	۳۱
دارای زخم	۷۴-۱۷	۱۴±۴۵/۵	۲۷	۱۰	۳۰	۲۸	۳۱	۳۰
سرطان معده	۷۵-۲۹	۱۴±۵۲	۱۸	۱۲	۱۳	۱۱	۱۴	۱۱

الگوهای پروتئینیSDS-PAGE: الگوهای پروتئینی سوشـهای مختلف جدا شده از بیماران مبتلا بـه بیماریهـای مختلـف گوارشـی کـه بوسـیله الکتروفـورز ژل پلـی اکریـل آمیـد بدسـت آمدنـد تفاوتهـائی را دربـین الگوهـا نـشان دادنـد. اعضای هر گروه برحـسب شـباهتهای الگوهایـشان ارتبـاط بـالایی داشـتند و بنـابراین در یـک دسـته مـشابه قـرار گرفتند. شکلهای a ۱ تا c ۱ الگوهای پروتئینی نمونه هایی از سوشـهای شـاخص ۳ گـروه بیمـاران را نـشان می دهند. بالاترین تعدادباندها در گروه بیمـاران سـرطانی (۲۰ باند) و کمترین تعداد باند در گروه بیماران فاقد زخـم (۱۴ باند) مشاهده گردید. باندهای اختصاصی برای اعضای هر گروه شـامل بانـدهای ۱۰۶، ۶۱/۵ ، ۴۵، ۳۶، ۳۴ و ۳۰ کیلو دالتونی برای گروه بیمـاران دارای سـرطان، بانـد ۲۲ کیلـو دالتـونی بـرای گـروه بیمـاران دارای زخـم و بانـد ۱۳ کیلـو دالتـونی بـرای گـروه بیمـاران فاقـد زخـم بودند. هـیچ اخـتلاف معنـی داری بـین الگـوی پروتئینـی گونه های جدا شده از body و antrum بیمـاران مـشاهده نشد.



شکل ۱: 1D-SDS-PAGE پروتئین تام ۷ نمونه از سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری بدون زخم (A)، زخم دار(B) و سرطان معده (C)

آنالیز ایمونوبلاتها: به منظور یافتن کاندیدهای پروتئینی آنتی ژنی مورد استفاده در تستهای تشخیصی یا واکسیناسیون، الگوی پروتئینی نمونه های بالینی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم یا سرطان معده که با سرمهای میزبانان آلوده مربوطه شان واکنش داده بودند با الگوی حاصل از بیمارانی که به بیماری معده بدون زخم مبتلا بودند مقایسه شدند. الگوهای ایمونوبلات (شکلهای ۲a-۲c) با الگوهای بدست آمده از ژلهای رنگ شده با Commassie Brilliant Blue (شکلهای ۱a-۱c) متفاوت بودند. برخی از باندهای پروتئینی بدست آمده در روش SDS-PAGE در روش بلاتینگ ظاهر نشدند. تست آماری نشان داد که تنها باندهای ۱۰۶ و ۴۵ کیلو دالتونی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران سرطانی بطور معنی داری (P< ۰/۰۵) با سرم بیماران مربوطه شان شناسایی شدند (۸۰٪) و باند ۱۳ کیلو دالتونی بطور اختصاصی با سرمهای بیماران فاقد زخم شناسایی شد. بجز این باندها ، هیچ تفاوت معنی داری در الگوی بلاتینگ سرم تمام بیماران مشاهده نشد. باندهای ۱۶۰ ، ۹۴، ۶۳، ۶۰، ۵۸/۵، ۴۷، ۴۴ و ۱۴ کیلو دالتونی شایع ترین پروتئین های آنتی ژنی در بین سوشهای هلیکوباکتر پیلوری بودند که بطورعمده با سرم میزبانان مربوطه شان شناسایی شدند.



شکل۲: پروتئینهای آنتی ژنیک سوشهای کلینیکی هلیکوباکتر پیلوری که با سرمهای بیماران مبتلا به بیماری بدون زخم(A)، زخم دار(B) و سرطان معده(C) واکنش داده اند

بحث:

باکتری گرم منفی هلیکوباکتر پیلوری یک پاتوژن انسانی است که مخاط گوارشی را آلوده کرده و سبب یک پروسه التهابی منجر به ورم معده ، زخم معده و سرطان

می شود. مطالعات زیادی برای یـافتن پاسـخ آنتـی بـادی نسبت به پروتئینهای H. pylori بیان شـــده در وضعیتهای بالینی مختلف گوارشی انجام گرفته اند اما در تمـامی آنهـا پروتئینهای تنها یک سوش خاص هلیکوبـاکتر پیلـوری بـا سرمهای بیماران مختلف بلات شده اند(۲۸-۲۳). در اینجا برای یافتن مارکرهای آنتی ژنی که با ظهور علائم اختصاصی بیماریهای وابسته به H. pylori مرتبط می باشند، الگوهای آنتی ژنی سوشهای بالینی هلیکوباکتر پیلوری که باسرمهای میزبانان انسانی مربوطه شان واکنش دادنـد مـورد بررسـی قرار گرفتند. روش ایمونوبلات بسیار حـساس و اختـصاصی اسـت و تنهـا بانـدهایی را نمایـان مـی کنـد کـه بوسـیله آنتی بادی های موجود در سرم بیمار شناسایی می شوند.

در SDS-PAGE الگوی پروتئینی اعضاء هـر گـروه از نظر شباهت در الگویشان ارتباط زیادی را نشان دادند کـه سبب شد در یک دسته مشابه قرار گیرند. بـالاترین تعـداد باندها در گروه بیماران سرطانی (۲۰ باند) و کمترین تعداد باند در گروه بیماران فاقد زخم (۱۴ باند) مشاهده شد.

باندهای اختصاصی برای اعضای هر گروه شامل باندهای ۱۰۶، ۶۱/۵، ۴۵، ۳۴ و ۳۰ کیلـو دالتـونی بـرای بیمـاران دارای سرطان، باند ۲۲ کیلو دالتونی بـرای گـروه بیمـاران دارای زخم و باند ۱۳ کیلو دالتونی برای گروه بیماران فاقد زخم بودند. اگرچه تفاوتهای بسیار کمی بین سوشهای جدا شده از body و antrum هر بیمار مشاهده گردید اما بنظـر نمی رسد که در الگوی تولید پروتئینهـایی کـه بتـوان بـه محل جدا کردن هلیکوباکتر پیلـوری از معـده نـسبت داده شود تفاوت معنی داری وجـود داشـته باشـد. معهـذا ، در بلاتینگ فقط باند های ۱۰۶و ۴۵ کیلو دالتـونی سوشـهای هلیکوباکترپیلوری جداشده از بیماران با سرطان معده بطور معنی داری بطور اختصاصی با سرم بیماران مربوطـه شـان (۸۰٪) شناسـایی شـدند و بانـد ۱۳ کیلـو دالتـونی بطـور اختصاصی با سـرم بیمـاران فاقـد زخـم (۸۵٪) شناسـایی شدند. به استثناء این باندها در الگوی بلاتینگ سـرم تمـام بیماران تفاوت معنی داری مشاهده نشد. این یافتـه نـشان داد که برخی پروتئینهای یافت شده در SDS-PAGE سـه گروه سوش H. pylori برای میزبانـــــان خود ایمونوژنیک نبودند. بنابراین دو پـروتئین ۱۰۶ و ۴۵ کیلـو دالتـونی در سوشهای H. pylori جدا شـده از بیماران مبتلا به سرطان معده و یک پروتئین۱۳ کیلو دالتونی در سوشهایH. pylori جداشده از بیماران فاقد زخم می توانند درالقاء خصوصیـــت پاتوژنیسیتی به سوشهای H. pylori در هر گروه از بیماران تـاثیر گـذار باشـند. بـا اسـتفاده از 2D-Immunoblotting کیمـل و همکـاران(۲۶) رابطـه ای بـین آنتـی ژن G27 هلیکوباکتر پیلوری و آنتی بادی ها در بیماران با آسیبهای بافتی خاص دستگاه گوارش پیـدا نکردنـد. در حالیکـه در یک مطالعه دیگر در نقـشه بلاتینـگ دو بعـدی ۱۴ نقطـه آنتی ژن پروتئینی شناسایی شد که بطور قابل ملاحظه ای در گروه بیمـاران دارای زخـم و بیمـاران سـرطانی تفـاوت داشتند(۲۸). در یک مطالعه مینی و همکارانش پروتئینهای مختلـف ۳ سـوش H. pylori کـه از بیمـاران مبـتلا بـه بیماریهای مختلف معده جدا شده بودنـد را مـورد مطالعـه قرار دادند و مشاهده کردند که سوشهای جدا شده از نمونه های سرطانی نسبت به سوشهای جدا شده از نمونـه هـای زخم معده و گاستریت دارای آنتی ژنهای بیـشتری بـوده و سرم این بیماران نیز پاسخهای ایمنی بیشتری نـسبت بـه دو گروه دیگر بیماران ایجاد کرده بودند(۱۱).

ازطرف دیگر هس و همکارانش نیزدریافتند که بیماران زخم دار بیشتر از بیماران مبتلا به گاستریت آنتی بادی تولید می کنند(۲۳). پس میتوان اذعان نمود که همانطور که مـا نیز در مطالعه حاضر مشاهده نمودیم طیف واکـنش آنتـی ژن/ آنتی بادی به ترتیب در بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده و سرطان معده بیشتر می شود. این یافتـه همچنـین نشانگر این است که یک طیـف مـشابه از واکـنش ممکـن است در هر سه حالت بیماری ایجاد واکنش التهابی کند.

برای تعیین نقش دقیق این پروتئین ها و آنتی ژنهای مـورد شناسـائی در بیمـاری زایـی اختـصاصی سوشـهای H. pylori لازم اسـت مطالعـات دقیـق in vivo وin vitro صـورت گیـرد. بهـر حـال ثابـت شـده اسـت کـه بیـشتر پروتئینهـای ایمونوژنیـک housekeeping هـستند(۲۷). حال این واقعیت که پروتئین هـا ی ایمونوژنیـک شـاخص عمدتاً دارای عملکرد housekeeping برای سلول هـستند می تواند در تفسیر نتایج محدودیت ایجـاد کنـد چـرا کـه تنها پروتئینهائی کـه در سـلول بـه مقـدار زیـاد هـستند می تواننـد شناسـایی شـوند. بعـلاوه دامنـه آنتـی ژنهـای اختـصاصی قابـل شناسـایی بـا روش 1D SDS-PAGE محدود به پروتئینهـایی مـی باشـد کـه وزنهـای مولکـولی مشابه دارند و دریک باند قـرار مـی گیرنـد هـر چنـد کـه امکان دارد اعمال یا خصوصیات آنها بایکدیگرمتفاوت باشد. بعنوان مثال آنتی بادی های علیه پروتئینهای بیمـــاری زا

و housekeeper که وزن مولکولی یکسانی دارند تنها یک باند را در بلاتینگ برای سوشهای مختلف شناسایی می کنند. این محـ{دودیتها را می توان تا حدودی با استفاده از روش 2D SDS-PAGEیا(IEF) Iso Electro Focusing برطرف کرد. علیرغم اثبات اینکه روش ایمونوبلاتینگ روش مفیدی جهت شناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک می باشد اما یافتن شاخصهای آنتی ژنیک مرتبط با علائم بالینی خاص دستگاه گوارش به عللی نمی تواند موفقیت آمیز باشد :

الف ـ پاسخ ایمنی میزبان : در برخی موارد بعلت نقص ایمنی ، سیستم ایمنی میزبان نمی تواند به پروتئینهای آنتی ژنیک باکتری پاسخ دهد و بنابراین هیچ هیبریداسیونی در بلا تینگ قابل مشاهده نخواهد بود.

ب ـ عوامل ژنتیکی : احتمالاً عوامل ژنتیکی باکتری و میزبان می تواند نتیجه بالینی عفونت هلیکوباکتر پیلوری را تحت تاثیر قرار دهد.

ج ـ بیان عوامل بیماریزا : شرایط کشت in vitro می تواند بیان برخی عوامل بیماریزا را که بیان آنها به فاکتورهای تحریک کننده in vivo بستگی دارد سرکوب کند.

د ـ سن در زمان عفونت و دوره عفونت : بیماران مبتلا به سرطان معده به طور میانگین از لحاظ سن مسن تر از بیماران دارای زخم معده هستند و بنابراین احتمالاً برای مدت طولانی تری در زمان حیاتشان هلیکوباکتر پیلوری را با خود حمل می کنند.

نتیجه نهایی :

در این مطالعه با استفاده از روشD-blotting1 توانستیم دو باند پروتئینی آنتی ژنی ۱۰۶ و ۴۵ کیلودالتونی را در سوشهای H. pylori جدا شده از بیماران سرطانی و یک باند ۱۳ کیلو دالتونی رادر سوشهای جدا شده از بیماران فاقد زخم جدا کنیم که بطور اختصاصی با سرم بیماران مربوطه شان قابل شناسایی بودند. برای نشان دادن ارزش آنتی ژنهایی که در اینجا شرح داده شده اند در پیشگویی وضعیتهای بالینی خاص به مطالعات بیشتری نیاز می باشد.

سپاسگزاری:

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز تحت طرح تحقیقاتی شماره ۵-۸۱ انجام گرفته است. نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از سرکار خانم دکتر فاطمه امام قریشی برای همکاری در بررسی آماری این مطالعه ابراز می دارند.

منابع :

1. Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the “slow” bacterium Helicobacter pylori leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. J Clin Inves 1994; 94: 4-8.
2. Tompkins LS, Falkow S. The new path to preventing ulcers. Science 1995; 267: 1621-1622.
3. IARC working Group on the Evaluation of Carcinogenic risks to humans. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC. Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994; 61:1-241.
4. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastrodudenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol 2000; 615-40.
5. Haas R, Meyer TF, Van Putten JPM. Aflagellated mutants of Helicobacter pylori generated by genetic transformation of naturally competent strains using shuttle mutagenesis. Mol Microbiol 1993; 8: 753-760.
6. Cussac V, Ferrero RL, Labigene A. Expression of Helicobacter pylori urease genes in Escherichia coli grown under nitrogen limiting conditions. J Bacteriol 1992; 174: 2466-2473.
7. Ilver D, Arnqvis A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science 1998; 279: 373-377.
8. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacoulating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995; 270: 17771-17777.
9. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991; 325: 1127-31.
10. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaghushi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper R.J. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001; 345: 784-9.
11. Mini R, Bernardini G, Maria Salzano A, Renzone G, Scaloni A, Figura N, Santucci A. Comparative proteomics and immunoproteomics of Helicobacter pylori related to different gastric pathologies. J Chromatography 2006;833:63-79.
12. Jungblunt PR, Bumann D, Haas G, Zymny-Arndt U, Holland P, Lamer S, et al. Comparative proteome analysis of Helicobacter pylori. Mol Microbiol 2000; 36: 710-25.
13. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature 1999; 397: 176-80.
14. Bumann D, Meyer TF, Jungblunt PR. Proteome

analysis of the common human pathogen Helicobacter pylori. Proteomics 2001; 1: 473-9.
15. Westblom TU, Unge P. Drug resistance of Helicobacter pylori: memorandum from a meeting at the Sixth International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and related organisms. J Infect Dis 1992; 165: 974-975.
16. Corthesy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, Saraga E, Vaney AC, Haas R, et al. Oral. Immunization with Helicobacter pylori urease B subunit as a treatment against Helicobacter infection in mice. Gastroenterology 1995; 109: 115-121.
17. Rapouli R, Covacci A, Ghiara P, Telford J. Pathogenesis of Helicobacter pylori and perspectives of vaccine development against an emerging pathogen. Behring INS Mitt 1994; 95:42-48.
18. Mini R, Annibale B, Lahner E, Bernardini G, Figura N, Santucci A. Western blotting of total lysate of helicobacter pylori in cases of atrophic body gastritis. Clin Chemis 2006; 52: 220-226.
19. Farshad Sh, Alborzi A, Malek Hosseini SA, Oboodi B, Rasouli M, et al. Identification of Helicobacter pylori DNA in Iranian patients with gallstones. Epidemiol Infect 2004;132:1185-1189
20. She FF, Su DH, Lin JY, Zhou LY. Virulence and potential pathogenicity of coccoid Helicobacter pylori induced by antibiotics. Word J Gastroenterol 2001; 7: 254-8.
21. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Natuer 1970; 227: 680-685.
22. Sambrook J, Russell, DW. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Vol 3. New York: Cold Spring Harbor, 2001: A8.40-A8.51.
23. Hass G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, et al. Immunoproteomics of Helicobacter pylori infection and relation to gastric disease. Proteomics 2002; 2: 313-24.
24. Iaquinto G, Todisco A, Perri F, Rega C, de Chiara G, Landi M, et al. Antibody response to Helicobacter pylori Cag A and heat-shock proteins in determining the risk of gastric development. Dig Liver Dis 2000; 32: 378-83.
25. Krah A, Mihlke S, Pleissner KP, Zimny-Arndt U, Kiesch C, Lehn N, et al. Identification of candidate antigens for serologic detection of Helicobacter pylori - infected patients with gastric carcinoma. Int J Cancer 2004; 108: 456-63.
26. Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from Helicobacter pylori and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. Infect Immun 2000; 68:915-20.
27. Nilsson I, Utt M. Separation and surveys of proteins of Helicobacter pylori. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 771: 251-260.
28. Nilsson Cl, Larsson T, Gustafsson E, Karisson KA, Davidsson P. Identification of protein vaccine candidates from Helicobacter pylori using a preparative Two-Dimentional Electrophoretic procedure and Mass Spectrometry. Anal Chem 2000; 72: 2148-2153.