Development of a *Helicobacter Pylori* Mouse Model

Mohammadi M
Pasteur Institute of Iran, Biotechnology Research Center

Oghalaei A
Pasteur Institute of Iran, Biotechnology Research Center

Zamaninia L
Pasteur Institute of Iran, Biotechnology Research Center

Talebkhan Y
Pasteur Institute of Iran, Biotechnology Research Center

Eshagh Hosseini M
Amiralam Hospital –Tehran

Corresponding Author:
Marjan Mohammadi PhD, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin St., Pasteur St., Pasteur Sq., Tehran, Iran.
Telefax: +98 21 6480780
E-mail: marjan@institute.pasteur.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori (H. pylori)* is a gastric pathogen of primates and causes active chronic gastritis as well as peptic ulcers. A wide range of studies is in effect to prevent or cure Helicobacter infection and thus its associated disorders. In order to test various drug regimens as well as potential vaccines against *H. pylori* infection, a suitable animal model is required which should be cost-effective, easy to handle, and available in statistically significant numbers. In addition the induced disease should closely mimic that of human disease in both nature and chronicity. Since *H. pylori* is not a feline pathogen, it does not readily colonize the feline stomach. Various groups have been able to adapt different *H. pylori* strains to the mouse stomach and create varying degrees of Helicobacter-associated gastritis. However, increasing evidence has demonstrated that there are significant differences among *H. pylori* strains infecting various populations in the world. Therefore, in order to test different drug treatments or potential vaccines for use in a particular population, it is crucial for the animal model to be inhabited by strains from the target population. Hence the model shall mimic the actual environmental situation very closely.

Materials and Methods: In order to perform this task, through repeated attempts various clinical isolates of *H. pylori* have been adapted to the stomach of C57BL/6 mice and the colonization have been confirmed via PCR.

Results: Clinical isolates of *H. pylori* have been adapted to the stomach of C57BL/6 mice and represented different levels of gastric inflammation. Induced infection was treated with routine anti-*H. pylori* drugs regimens and the histopathological changes were removed.

Conclusions: Histopathologic studies demonstrated that the resulting gastric inflammation mimics that of humans and consists of both an active as well as a chronic inflammatory component. Furthermore application of anti-*H. pylori* antibiotic treatment in the *H. pylori* infected mice resulted in the eradication of infection and the resolution of the gastritis. Therefore, the resulting mouse model possesses most if not all of the required characteristics for a suitable animal model for *H. pylori* infection and can thus be used for testing various preventive and / or therapeutic regimens. *Govaresh* 2003; **8**: 147-52

Keywords: *Helicobacter pylori*, Animal model, Histopathology, Gastric inflammation

گوارش،۱۳۸۲؛ سال هشتم: ۵۲-۱۴۷

ایجاد مدل حیوانی هلیکوباکتر پیلوری

دکتر مرجان محمدی[۱]*، اکبر عقلایی[۱]، لیلی زمانی نیا[۱]، یگانه طالب خان گروسی[۱]، دکتر سید محمود اسحاق حسینی[۲]

[۱] انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

[۲] بیمارستان امیر اعلم، تهران

خلاصه

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*)، یک پاتوژن گوارشی انسان است و موجب التهاب مزمن و فعال معده و نیز زخمهای گوارشی می‌گردد. مطالعات زیادی در زمینه پیشگیری و یا درمان عفونت هلیکوباکتر و بیماریهای مرتبط با آن صورت گرفته و می‌گیرد. به منظور بررسی آزمایش رژیم‌های دارویی مختلف و نیز واکسن‌های کاندیدا علیه عفونت *H. pylori*، وجود یک مدل حیوانی مناسب ضروری است. این مدل حیوانی باید مقرون به صرفه و قابل نگهداری بوده، از طرفی جهت مطالعات آماری به تعداد زیاد در دسترس باشد. به علاوه باید بیماری القا شده در آن مدل، در هر دو شکل کیفیت طبیعی و مزمن بودن مشابه بیماری انسانی باشد. از آنجا که *H. pylori* پاتوژن گربه‌سانان نمی‌باشد، بنابراین معده موش را به صورت طبیعی کلونیزه نمی‌کند. گروههای تحقیقاتی متعددی قادر به کلونیزه کردن سویه‌های مختلف *H. pylori* در معده موش هستند و درجاتی از التهاب معده ناشی از عفونت *H. pylori* را در معده موش به وجود آورده‌اند. مطالعات انجام شده، تفاوتهای مشخصی را در میان سویه‌های *H. pylori* جدا شده از جمعیتهای مختلف در جهان، به اثبات رسانده است. بنابراین به منظور آزمایش رژیم‌های درمانی یا کاندیدهای مختلف واکسن در یک جمعیت خاص، باید مدل حیوانی توسط سویه‌های جدا شده از جمعیت انسانی هدف، آلوده شوند و این مدل باید به شرایط محیطی واقعی بسیار نزدیک باشد.

مواد و روشها

به این منظور، با تلاشهای مکرر و فراوان، سویه‌های *H. pylori* کلینیکی جدا شده از بیماران گوارشی در محیط معده موشهای C57BL/6 کلونیزه شده و این کلونیزاسیون با روش PCR مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج

سویه‌های *H. pylori* جدا شده از بیماران، در معده موش کلونیزه شده و درجات مختلفی از التهاب معده را نشان دادند. عفونت ایجاد شده با رژیم‌های دارویی معمول علیه *H. pylori*، درمان شد و تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از آن، بهبود یافت.

نتیجه‌گیری

مطالعات هیستوپاتولوژیک نشان داد که التهاب معده حاصل، مشابه التهاب معده انسانی است و شامل التهاب از نوع فعال و نیز فرم مزمن می‌باشد. به علاوه، به کارگیری درمان آنتی بیوتیکی روتین علیه *H. pylori* در موشهای آلوده به این باکتری منجر به حذف عفونت و بهبود التهاب معده می‌گردد. بنابراین، مدل موشی حاصل، بیشترین ویژگیهای مورد نیاز یک مدل حیوانی را در عفونت *H. pylori* داراست و می‌تواند برای ارزیابی رژیم‌های پیشگیری و یا درمانی مورد استفاده قرار گیرد. *گوارش*،۱۳۸۲؛ سال هشتم: ۵۲-۱۴۷

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، مدل حیوانی، هیستوپاتولوژی، التهاب معده

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، متحرک، میله‌ای شکل و میکروآئروفیل است که اغلب در دوران کودکی معده انسانها را آلوده می‌کند و برای مدت طولانی در آن باقی می‌ماند[۱]. در کشورهای توسعه یافته، عفونت *H. pylori* در کمتر از ۵۰٪ جمعیت بالغ و در کشورهای در حال توسعه مانند ایران میزان این عفونت بالاتر است و نزدیک به ۸۰٪ جمعیت بالغ را در بر می‌گیرد[۲].

عفونت *H. pylori* با بیماریهای شدید گوارشی از جمله التهاب مزمن معده، زخمهای معده و دوازدهه (PUD, DUD) و آدنوکارسینومای معده و لنفومای معده‌ای سلول‌های B در ارتباط است.

* *نویسنده مسئول: دکتر مرجان محمدی- تهران، میدان پاستور، خیابان پاستور، خیابان دوازده فروردین، انستیتوپاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تلفن و نمابر: ۶۴۸۰۷۸۰*

E-mail: marjan@institute.pasteur.ac.ir

بنابراین در حال حاضر ریشه کنی عفونت *H. pylori* در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به عنوان یک اولویت مطرح است.

به دلیل محدودیت طیف میزبانی *H. pylori* به انسانها، ایجاد یک مدل حیوانی جایگزین برای مطالعات در زمینه رژیم‌های آنتی‌بیوتیکی و فرآیندهای ایمن‌سازی مؤثر علیه این میکروارگانیسم ضروری است. از طرف دیگر، استفاده از مدل‌های حیوانی مناسب، جوانب مختلف پاتولوژی و واکنشهای میان باکتری و میزبان را روشن می سازد.

اولین کلونیزاسیون موفق معده موشها با گونه‌هایی از هلیکوباکتر در سال ۱۹۹۰ توسط A. Lee انجام شد که از *H. felis* برای آلوده کردن موشها استفاده نمود[۳]. این باکتری به طور معمول معده گربه‌ها را آلوده می‌کند و با وجود شباهت این گونه با هلیکوباکتر پیلوری در برخی موارد آنتی ژنیک از جمله پروتئین‌های شوک حرارتی، تفاوتهایی در مورد برخی دیگر از پروتئین‌های ایمونوژنیک از جمله سیتوتوکسین واکوئله کننده (VacA) و یا CagA بین آنها وجود دارد[۴].

بعد از اولین کلونیزاسیون *H. felis* در معده موشها، تلاشهای بعدی در جهت کلونیزه نمودن *H. pylori* در معده موشهای BALB/c و C57BL/6 صورت گرفت و نشان داده شد که ضایعات پاتولوژی معده در موشهای C57BL/6 شدیدتر از موشهای BALB/c می‌باشد[۵] که این مطلب بیان کننده اثرات احتمالی پاسخهای ایمنی میزبان در برابر زخمهای معده‌ای موضعی است.

کلونیزاسیون *H. pylori* در موشهای آزمایشگاهی سفید بزرگ (Rats)، خوکچه هندی و گوریل گزارش شده است[۶،۷،۸]، اما استفاده از این مدلها برای تحقیقات در زمینه طراحی واکسن معمول نمی‌باشند. زیرا قیمت بالای این حیوانات و شیوع طبیعی عفونت در آنها، استفاده از آنها را در مقیاس بزرگ محدود ساخته است. در این مطالعه پس از کلونیزه نمودن معده موشهای C57BL/6 با سویه‌های کلینیکی *H. pylori*، با بررسیهای هیستوپاتولوژیک نشان داده شد که این حیوان می‌تواند به عنوان مدل مناسبی در بررسی عفونتهای *H. pylori* و نیز در بررسی رژیم‌های دارویی تجویز شده علیه این میکروارگانیسم به کار رود.

مواد و روشها

حیوانات و باکتری‌ها

گروههایی از ۴۰-۳۰ موش ماده C57BL/6 ۸-۶ هفته در حیوان‌خانه انستیتو پاستور مستقر در کرج پرورش داده شده، سپس برای انجام آزمایشها به تهران منتقل شدند و در قفسهای کوچک حاوی غذا و آب اتوکلاو شده نگهداری شدند. سویه‌های *H. pylori* از بیماران ایرانی با اختلالات گوارشی که به مراکز آندوسکوپی مراجعه کرده بودند، جدا شد. این سویه‌ها روی پلیت‌های بروسلا آگار حاوی ۷- ۵٪ خون گوسفندی و آنتی‌بیوتیک‌های مربوط کشت داده شد و تحت شرایط میکروآئروفیل در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷-۵ روز گرماگذاری شد. سویه‌های جدا شده *H. pylori* بر اساس شکل کلنی‌ها، رنگ آمیزی گرم، تولید اوره آز، کاتالاز و اکسیداز شناسایی شدند.

القای عفونت در موشها

پلیت‌های حاوی *H. pylori* رشد یافته، شسته شده و تحت سه دوز حاوی10^9 CFU از طریق لوله‌های پلی‌اتیلنی به درون معده موشها تلقیح شد. دو، چهار، هشت و دوازده هفته بعد از عفونت، موشها به روش قطع نخاع کشته شدند و چندین بیوپسی از معده موشهای کنترل و آلوده برای تعیین حضور باکتری‌ها از طریق تستهای سریع اوره‌آز، کشت، بافت‌شناسی و PCR، بررسی شد. برای سنجش بافت‌شناسی، یک لایهٔ طولی از بافت در امتداد خم بزرگ معده از مری تا دوازدهه بریده و در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد و در پارافین ذخیره گردید و قطعات ۵ میکرومتری جهت مطالعات بافت‌شناسی بریده شد. این قطعات طولی امکان مطالعه و درجه بندی منطقه بزرگی از معده هر موش را فراهم می‌کنند. اسلایدها با رنگهای هماتوکسیلین و ائوزین و گیمسا جهت مطالعه التهاب و وجود باکتری رنگ آمیزی شدند. موشهای با تست اوره‌آز مثبت، کشت و یا مشاهده مستقیم باکتری‌ها در اسلایدهای بافت‌شناسی به عنوان موارد مثبت گزارش گردیدند.

درجهٔ التهاب

شدت التهاب معده در مقیاس صفر تا سه و تعداد سلولهای التهابی بر اساس بزرگنمایی ۲۰x میکروسکوپ نوری درجه بندی شد. سلول‌های التهابی بر اساس فراوانی این سلول‌ها در کل اسلاید از صفر تا سه درجه‌بندی شد. این سلول‌ها شامل سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs)، لکوسیت‌های چند هسته‌ای (PMNs)، سلول‌های تک هسته‌ای فعال شده (Activated MNCs) (با هسته‌های بزرگ و هستکهای ائوزینوفیلی)، پلاسماسل‌ها (Plasma cells)، آبسه‌های کریپتی (Crypt Abceses) (لکوسیت‌های پلی مورفونوکلئر در حفره‌های اپتیلیوم) و تجمعات لنفوئیدی (Lymphoid Follicles) (مجموعه‌ای از لنفوسیت‌های کوچک با مرکزیت متشکل از سلول‌های تک هسته‌ای بزرگتر)، می‌باشند.

استخراج DNA و تکثیر آن با روش PCR

DNA کروموزومی *H. pylori* آلوده کنندهٔ بافت معده، با روش هضم تریپسینی بافت اپیتلیالی و آزاد سازی باکتری‌ها استخراج شد. به طور خلاصه، ابتدا بافت معده موش، خرد شده و سپس در محلول تریپسین (۰/۵٪ تریپسین، EDTA) به مدت ۱۵ دقیقه گرما گذاری شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و NaOH (۵۰mM) به رسوب اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. سپس Tris-HCl به محلول اضافه شده و پس از سانتریفوژ، مایع رویی که حاوی DNA ژنومی است به تیوب جدید منتقل گردید. تکثیر DNA با استفاده از Taq DNA Polymerase بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده پروتئین شوک حرارتی (hsp) انجام شد. توالی این پرایمرها به قرار زیر است: پرایمر فوروارد
(hsp1): 5'-TGC GCT ATA GTT GTG TCG C-3'،
و پرایمر معکوس
(hsp2):5'-GCT ATC TGA AAA TTT GAT TTC TTT TGC- 3'.
برنامه دمایی و زمانی PCR طی ۳۵ سیکل به قرار زیر بود: واسرشتی در ۹۴ درجه سانتی گراد (۲ دقیقه)، اتصال پرایمرها در ۵۶ درجه سانتی گراد (۲ دقیقه) و مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۲ دقیقه). محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با روش الکتروفورز مشاهده گردید.

درمان دارویی

نیمی از موشهای آلوده علیه عفونت *H. pylori* با تجویز درون معده‌ای رژیم دارویی زیر، به مدت ۱۴ روز تحت درمان قرار گرفتند و با نیم دیگر موشهای آلوده و گروه کنترل مقایسه شدند:

مترونیدازول (۸ میکروگرم به ازای هر گرم وزن موش)، اریترومایسین (۱۶ میکروگرم به ازای هر گرم وزن موش)، بیسموت ساب سیترات (۸ میکرو گرم به ازای هر گرم وزن موش).

مجموع این داروها در PBS (pH ۷) حل شدند و در حجمهای ۰/۵ میلی‌لیتری به موشها خورانده شدند. موشها یک ماه و سه ماه بعد از درمان کشته شدند و اثرات درمان دارویی بر عفونت و التهاب، مورد مطالعه قرار گرفت.

آنالیز آماری

مقایسه کلونیزاسیون باکتری‌ها با درجهٔ التهاب در میان گروههای تجربی مورد آزمایش از طریق واریانس با تست فیشر T انجام شد.

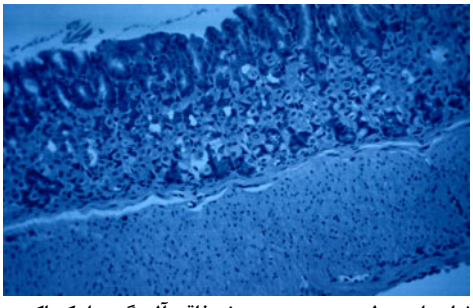
نتایج

سویه‌های *H. pylori* از بیماران دارای علائم گوارشی، جدا شدند و استقرار آنها در معده موش مورد آزمایش قرار گرفت. گروههای ۳۰ تا ۴۰ تایی از موشهای C57BL/6 با ۳ دوز *H. pylori* به صورت درون معده‌ای (Intragastric)، آلوده شدند. در هفته دوم و همچنین هفته دوازدهم بعد از ایجاد عفونت، تقریباً نیمی از حیوانات هر گروه کشته شدند و از نظر ایجاد عفونت و التهاب‌زایی معده مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر بار، تعداد ۲۰-۱۰ موش کنترل هم کشته شدند و به طور همزمان مورد ارزیابی قرار گرفتند.

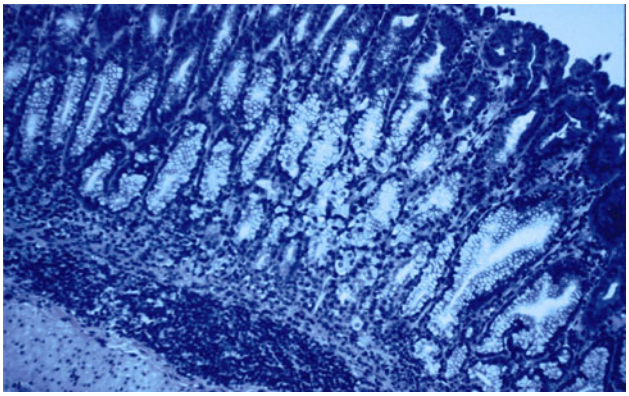
سطح آلودگی و التهاب

به دنبال آزمایشهای متعدد، تعدادی از سویه‌های بالینی برای کلونیزه کردن موش و ایجاد التهاب معده مناسب تشخیص داده شدند. شکل ۱ اپیتلیوم معده طبیعی یک موش کنترل بدون آلودگی را نشان می‌دهد، در حالی‌که شکل ۲ تغییرات هیستوپاتولوژیک را ۳ ماه بعد از القای عفونت در همان گونهٔ موشی نشان می‌دهد. میزان کلونیزه شدن باکتری در آنتروم بیشتر و متنوعتر از قسمت فوندوس مشاهده شد. هیچ‌یک از موشهای کنترل (فاقد آلودگی)، با روشهای تست اوره‌آز یا بافت‌شناسی، *H. pylori* مثبت نبودند.

شدت التهاب در یک مقیاس نسبتاً کیفی در بزرگنمایی ۲۰x میکروسکوپ در مورد هر نمونه بافت‌شناسی از صفر تا سه درجه بندی شد (جدول ۱). در هفته‌های دوم و دوازدهم بعد از عفونت، تمامی موشها آثاری از درجات مختلف التهاب معده را نشان می‌دادند که میزان آن ارتباط مشخصی را با میزان باکتری موجود در آن بافت نشان نمی‌داد. ۱۲ هفته پس از ایجاد عفونت، موشها التهاب شدیدتری را نسبت به مراحل قبلی نشان دادند ($P<0.01$). موشهای مورد مطالعه، التهاب مزمن پیشرونده‌ای را در هفته دوازدهم بعد از القای عفونت داشتند (شکل ۲ و جدول ۱)، در حالی‌که در هفته‌های اول تنها پاسخ التهابی محدودی بروز دادند.



شکل ۱: اپتیلیوم طبیعی معده در موش فاقد آلودگی هلیکوباکتر پیلوری رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین (بزرگنمایی ۵۰).



شکل ۲: اپتیلیوم معده موش آلوده سه ماه بعد از آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری، که دارای التهاب شدید حاد و مزمن، هیپرپلازی سلولی و فولیکول‌های سلولی در لایه مخاطی و زیر مخاطی است که نشانگر عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. رنگ‌آمیزی اسلاید با هماتوکسیلین و ائوزین (بزرگنمایی ۵۰).

جدول ۱: ترکیب سلولی ارتشاحات التهابی و شدت کلی (مقیاس درجه بندی از صفر تا سه)

هفته‌های بعد از آلودگی	سلول‌های تک هسته‌ای	سلول‌های چند هسته‌ای	آبسه‌های کریپتی	پلاسما سل‌ها	تجمعات لنفوئیدی	شدت کلی
دو هفته	۰/۹ +/- ۰/۷	۱/۴ +/-۱/۴	۰/۱ +/-۰/۴	۰/۱ +/-۰/۴	۰/۳ +/-۰/۸	۲/۰ +/-۰/۳۵
دوازده هفته	۱/۴ +/-۰/۹	۲/۰ +/-۰/۸	۰/۲ +/-۰/۵	۱/۴ +/-۰/۷	۱/۴ +/-۰/۹	۲/۵ +/-۰/۲۵

پاسخ التهابی در هفته دوازدهم اثر مشخصی بر ساختار موکوسی معده داشت. یک تغییر قابل ملاحظه تغییر بارز ضخامت لایه موکوسی به دلیل تکثیر زیاد سلول‌های موکوسی (شکل ۲) و تجمع سلول‌های التهابی بود. ضخامت موکوس با ظهور التهاب افزایش یافت. سایر علائم تخریب لایهٔ موکوسی شامل تحلیل غدد ترشح کننده اسید معده و نکروز، فیبروز بافت لامینا پروپریا و تحلیل بافت اپیتلیالی سطحی بود. تحلیل بافت اپیتلیالی شاید به دلیل فعالیت سیتوتوکسیکی سویه‌های مولد زخم هلیکوباکتر پیلوری باشد که به صورت ترکیبی در ایجاد عفونت به کار رفته‌اند. موشهای آلوده با تست‌هایی همچون تست سریع اوره‌آز، کشت و PCR مثبت تلقی شدند. تکثیر ژن کد کننده پروتئین شوک حرارتی هلیکوباکتر پیلوری با روش PCR، کلونیزه شدن *H. pylori* را در معده در میان سایر باکتری‌های کلونیزه شونده در معده متمایز می‌کند.

ویژگیهای التهاب ایجاد شده

محتوای سلولی در طی پاسخهای التهابی در بافت معدی در هفته دوم و دوازدهم بعد از عفونت، تعیین شد. این نتایج در جدول ۱ ارائه شده‌اند. مطابق با نتایج به دست آمده در مطالعات انسانی انجام شده، لنفوسیت‌های تک هسته‌ای در تجمع سلول‌های التهابی معده در هر دو هفته دوم و دوازدهم مشاهده شد. پلاسماسل‌ها در هفته دوازدهم بعد از ایجاد عفونت، جزء سلول‌های غالب در لایه موکوسی ملتهب معده بودند. حضور تجمعات لنفوئیدی که به طور گسترده‌ای در تخریب ساختار موکوسی شرکت دارند در هفته دوازدهم مشهود بود.

درمان دارویی

به منظور تست مدل حیوانی در رابطه با پاسخگویی به درمان دارویی انسانی علیه *H. pylori*، موشهای آلوده که دارای عفونت و التهاب مزمن بودند، به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه، داروهای سه گانه معمول علیه *H. pylori* شامل مترونیدازول، اریترومایسین و بیسموت ساب سیترات را به مدت دو هفته دریافت کردند و گروه دیگر به علاوه یک گروه از موشهای آلوده نشده، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. هرکدام از گروهها به دو زیر گروه تقسیم شدند و در ماه اول و سوم بعد از تکمیل دورهٔ درمان کشته شدند. یک ماه بعد از درمان (یا ماه چهارم بعد از القای عفونت) ۱۰۰٪ گروه آلوده و درمان نشده، همچنان آلوده و شدیداً ملتهب بودند (جدول ۲)، در حالی‌که تنها ۳۸٪ گروهی که با دارو درمان شده بودند، آلوده بودند و میزان التهاب در این گروه بسیار کمتر از گروه درمان نشده بود ($P<0.05$). در ماه سوم بعد از درمان (یا هفت ماه بعد از القای عفونت)، تمامی

موشهای گروه درمان نشده، همچنان آلوده مانده بودند اما شدت التهاب به طور مشخصی کاهش یافته بود ($P<0.05$). این مطلب می‌تواند مؤید سازگاری موش نسبت به یک پاتوژن غیر موشی (انسانی) و بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از آن باشد. گروه درمان شده با دارو، در انتهای دوره، هیچ علامتی از آلودگی یا التهاب را نشان ندادند که این مطلب تأثیر درمان دارویی را در این مدل حیوانی و در بهبود تغییرات آسیب‌شناسی به دنبال ریشه‌کن کردن باکتری‌ها اثبات می‌کند و نظریه کخ را در مورد علت و معلول تکمیل می‌نماید. موشهای همسن و آلوده نشدهٔ گروه کنترل هم هیچ علامتی از آلودگی یا التهاب را در این دو زمان بررسی نشان ندادند.

جدول ۲: میزان عفونت و التهاب بعد از درمان دارویی (مقیاس درجه بندی از صفر تا سه)

گروهها	عفونت / بدون درمان		عفونت / درمان		بدون عفونت / بدون درمان	
زمان کشتن موشها بعد از درمان	یک ماه	سه ماه	یک ماه	سه ماه	یک ماه	سه ماه
عفونت	%۱۰۰	%۱۰۰	%۳۸	%۰	%۰	%۰
التهاب	۲/۵ +/-۰/۱	۰/۲ +/-۰/۱	۰/۲ +/-۰/۲	۰ +/-۰	۰ +/-۰	۰ +/-۰

بحث

هلیکوباکتر پیلوری که منجر به آلودگی اکثریت جمعیت بالغ جهان می‌شود به توجه دقیق برای طراحی روشهای مطمئن جهت جلوگیری از عفونت و درمان نیاز دارد. شواهد صریح در مورد ارتباط عفونت *H. pylori* با التهاب و زخم گوارشی اولین بار از مطالعاتی[۹،۱۰] به دست آمد که در تثبیت فرضیه کخ از طریق تایید بافت‌شناسی التهاب به دنبال بلع سوسپانسیون ارگانیسم‌های زنده صورت گرفت. مطالعات جهانی اکنون این ارتباط را به رسمیت شناخته است[۱۱] اما برای مطالعه این فرضیه نیاز به یک مدل حیوانی با قابلیت ایجاد عوارض گوارشی مشابه در انسان (برای مثال التهاب معده) وجود دارد. در این آزمایش ما معده موش را با سوش‌های کلینیکی انتخاب شده سازگار نمودیم و به این ترتیب یک بار دیگر تئوری علت و معلول فرضیه کخ از طریق ایجاد التهاب قابل مقایسه با بیماری انسانی در معده موش آلوده به اثبات رسید. تخمین زده می‌شود که اکثریت جمعیت بالغ جهان در کشورهای در حال توسعه مثل ایران به *H. pylori* آلوده هستند و درصدی از آنها به بیماریهای ناشی از آن، از زخمهای گوارشی گرفته تا سرطان معده مبتلا هستند[۱۲]، که شاید به واسطه استقرار *H. pylori* در منطقه‌ای منحصر به فرد درون لایه موکوسی معده و دور از دسترس پاسخهای ایمنی ذاتی و اختصاصی میزبان، عفونت مزمنی ایجاد می‌شود که طی چندین دهه باقی می‌ماند. تقریباً بعد از دو دهه از فعالیتهای علمی یک داروی واحد به دست نیامده است که جایگزین ترکیبات دو یا سه دارویی شامل آنتی بیوتیک‌ها و نمکهای بیسموت مورد استفاده، قرار گیرد[۱۳].

در این آزمایش درمان چند دارویی معمول در موشهای آلوده اجرا و نابودی کامل عفونت صورت گرفت و التهاب ناشی از آن نیز به کلی درمان شد.

علی‌رغم نابودی کامل عفونت پس از درمان دارویی، سیستم ایمنی میزبان القا نمی‌گردد و لذا امکان ابتلای مجدد در این موارد وجود دارد[۱۴].

از اوایل سال ۱۹۹۶، ما [۱۵،۱۶،۱۷] و دیگر محققان[۱۸]، تحقیقاتی را درباره واکسیناسیون به عنوان عامل کنترل عفونت *H. pylori* در موش آغاز کردیم. از آنجا که موش حیوان آزمایشگاهی ارزانی است و دارای تولید مثل آسان و عوامل ایمونولوژیکی غنی می‌باشد، به عنوان مدل حیوانی در اولین مرحله برای آزمایشهای واکسیناسیون پیش‌کلینیکی انتخاب شد. تنها از سال ۱۹۹۵ امکان آلوده کردن مؤثر موش با *H. pylori* به وجود آمد، بنابراین در بیشتر آزمایشهای مربوط به واکسن، از *H. felis* که عفونت شدیدی در بسیاری از گونه‌های موش ایجاد می‌کند استفاده شده است[۱۹].

آزمایشهای ایمونولوژیکی در موشها به دنبال عفونت و یا ایمنی‌زایی، نقش محافظتی برای پاسخ ایمنی نوع Th2 و نقش بیماریزایی برای پاسخهای ایمنی از نوع Th1 را به اثبات رسانده است. تمام محققینی که ایمنی‌زایی در موش یا حیوانات کوچک دیگر را با استفاده از *H. felis* یا *H. pylori* با موفقیت انجام داده‌اند به طور شاخص به ایجاد التهاب اشاره می‌کنند[۱۶،۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶]. با وجود اینکه ویژگی و شدت التهاب در این آزمایشها متنوع است تقریباً تمامی اطلاعات موجود در جهان پیشنهاد می‌کند که واکسیناسیون ممکن است در حذف باکتری نقش داشته باشد، در حالی‌که درمان دارویی همان‌طور که در این آزمایش نشان داده شده است به طور کلی باکتری را نابود می‌کند اما معده را به سلول‌های ایمنی محافظتی مجهز نمی‌سازد و این امر علت امکان عود بیماری پس از درمان دارویی را تشریح می‌کند. با این وجود، این مطالعه، مدل حیوانی عفونت *H. pylori* را که بسیار نزدیک به بیماری انسانی است و آزمایشهای دارویی و واکسن در آن کاملاً قابل اجرا می‌باشد، مهیا ساخته است.

مراجع

1. Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; **1**: 1273-5.
2. Masserat S, Saberi-Firoozi M, Soleimani A *et al.* Peptic ulcer disease irritable bowel syndrome and constipation in two populations in Iran. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; **7**: 427-33.
3. Lee A, Fox JG, Otto G *et al.* A small animal model of human Helicobacter pylori active chronic gastritis. *Gastroenterology* 1990; **99**: 1315-23.
4. Xiang ZY, Censini S, Bayeli PF *et al.* Analysis and expression of VacA and CagA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; **63**: 94-8.
5. Ghiara P, Covacci A, Telford JL *et al.* Helicobacter pylori: pathogenic determinants and strategies for vaccine design. In: Kaufmann SHE, editor. Concepts in Vaccine Development. Berlin/New York: Walter de Gruyter; 1996. p. 459-96.
6. Li H, Kalies I, Mellgard B *et al.* A rat model of chronic Helicobacter pylori infection. Studies of epithelial cell turn over and gastric ulcer healing. *Scand J Gastroenterol* 1998; **33**: 370-8.
7. Shomer NH, Dangler CA, Whary MT *et al.* Experimental Helicobacter pylori infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs. *Infect Immun* 1998; **66**: 2614-8.
8. Hirayama F, Takagi S, Kusuhara H *et al.* Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori. *J Gastroenterol* 1996; **31**: 755-7.
9. Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB *et al.* Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric Campylobacter. *Med J Australia* 1985; **142**: 436-9.
10. Morris A and Nicholson G. Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 1987; **82**: 192-9.
11. NIH Consensus Conference. NIH consensus panel urges antimicrobials for ulcer patients, skeptics concur with caveats. *J Am Med Assoc* 1994; **272**: 65-9.
12. Mukhopadhyay P. Gastric cancer and lymphoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **241**: 57-69.
13. Unge P. Antibiotic treatment of Helicobacter pylori infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **241**: 261-300.
14. Czinn SJ. Characterization and therapy for experimental infection by Helicobacter mustelae in ferrets. *Helicobacter* 1996; **1**: 43-51.
15. Mohammadi M, Redline R, Nedrud J *et al.* Role of the host in pathogenesis of Helicobacter associated gastritis: H. felis infection of inbred and congenic mouse strains. *Infect Immun* 1996; **64**: 238-45.
16. Mohammadi M, Nedrud J, Redline R *et al.* Murine CD4 T-cell response to Helicobacter infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1848-57.
17. Mohammadi M, Czinn S, Redline R *et al.* Helicobacter-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol* 1996; **156**: 4729-38.
18. Batchelder M, Fox JG, Hayward A *et al.* Natural and experimental Helicobacter mustelae reinfection following successful antimicrobial eradication in ferrets. *Helicobacter* 1996; **1**: 34-42.
19. Pappo J, Thomas WD Jr, Kabok Z *et al.* Effect of oral immunization with recombinant urease on murine Helicobacter felis gastritis. *Infect Immun* 1995; **63**: 1246-52.
20. Ermak TH, Ding R, Ekstein B *et al.* Gastritis in urease-immunized mice after Helicobacter felis challenge may be due to residual bacteria. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1118-28.
21. Lee CK, Soike K, Giannasca P *et al.* Immunization of rhesus monkeys with a mucosal prime, parenteral boost strategy protects against infection with Helicobacter pylori. *Vaccine* 1999; **17**: 1493-505.
22. Ferrero RL, Thiberge JM, Kansau I *et al.* The GroES homolog of Helicobacter pylori confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6499-503.
23. Eaton KA, Krakowka S. Chronic active gastritis due to Helicobacter pylori in immunized gnotobiotic piglets. *Gastroenterology* 1992; **103**: 1580-6.
24. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R *et al.* Immunization of mice with urease vaccine affords protection against Helicobacter pylori infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* 1998; **188**: 2277-88.
25. Eaton KA, Ringler SS, Krakowka S. Vaccination of gnotobiotic piglets against Helicobacter pylori. *J Infect Dis* 1998; **178**: 1399-405.
26. Dieterich C, Bouzourene H, Blum AL *et al.* Urease-based mucosal immunization against Helicobacter heilmannii infection induces corpus atrophy in mice. *Infect Immun* 1999; **67**: 6206-9.