

## بررسی تغییرات بیان سایتوکاین‌ها در موش‌های BALB/c واکسینه شده با واکسن ژنی pEGFP-C2-leoA

زهرا احمدزاده چالشتی<sup>۱</sup>، علی اصغر رستگاری<sup>۱\*</sup>، هاشم نیری<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

**مقدمه:** هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*) باعث ایجاد تغییرات متوالی در دیواره معده می‌شود که با التهاب مخاط معده شروع می‌شود و در برخی موارد به سرطان معده منجر می‌گردد. ژن *leoA* با کد کردن GTPase در بیماری‌زایی این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد. وزیکول‌های ترشحی محصول ژن *leoA* باعث انتشار سم و تحریک سیستم ایمنی در بدن میزبان می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی واکسن ژنی pEGFP-C2-leoA بر تغییرات بیانی سایتوکاین‌هایی نظیر IL6، IL4 و اینترفرون گاما در التهاب ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری در مدل موشی بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی ابتدا پلاسمید نو ترکیب (pEGFP-C2-leoA) از طریق ترانسفورماسیون به سلول‌های مستعد باکتریایی، تولید، تکثیر و استخراج شد. سپس غلظت‌های مناسب از محلول یک درصد نانو ذرات کیتوزان جهت تزریق به عضله چهار سر ران موش‌های BALB/c تهیه گردید. در نهایت بیان ژن و تغییرات سایتوکاین‌های نام‌برده توسط روش Real Time RT-PCR اندازه‌گیری شد، نتایج به‌دست آمده به‌وسیله نرم‌افزار SPSS version 16 مورد تحلیل آماری قرار گرفت؛ از آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون متعاقب LSD و نیز آزمون t-test مستقل، جهت بررسی و وجود ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها استفاده گردید.

**نتایج:** پس از تزریق واکسن درون عضله چهار سر ران موش‌ها در طول دوره درمان، سایتوکاین‌های IFN $\gamma$  ( $P < 0.038$ ) و IL6 ( $P < 0.049$ ) به‌طور معنی‌داری افزایش بیان نشان دادند. از طرفی سایتوکاین IL4 و ژن *leoA* نیز کاهش بیان معنی‌داری نشان دادند ( $P < 0.042$ ).

**نتیجه‌گیری:** بر پایه نتایج حاصل، ژن *leoA* کلون شده در وکتور بیانی pEGFP-C2، توان بیان و تولید محصول پروتئینی اختصاصی این ژن در سلول‌های یوکاریوتی را دارد و با توجه با نتایج به‌دست آمده در مدل حیوانی و با توجه به خصوصیت ایمنی به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA از پتانسیل لازم برای بررسی ایمنی‌زایی در مدل انسانی به‌عنوان واکسن ژنی برخوردار است.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان معده، هلیکوباکتر پیلوری، سایتوکاین، واکسن ژنی، BALB/c، *leoA*.

**ارجاع:** احمدزاده چالشتی زهرا، رستگاری علی‌اصغر، نیری هاشم، دوستی عباس. بررسی تغییرات بیان سایتوکاین‌ها در موش‌های BALB/c واکسینه شده با واکسن ژنی pEGFP-C2-leoA. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۱۲): ۶۲۱۰-۶۱۹۹.

۱- گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۴۹۳۶۸۰۹۱۳۱، پست الکترونیکی: aarastegari@gmail.com، صندوق پستی: ۸۴۵۱۵۱۵۵

## مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*) یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های انسانی است زیرا مخاط معده حدود ۵۰ درصد از جمعیت جهان را آلوده می‌کند (۱). اکثر عفونت‌های ایجاد شده بدون علامت هستند و بیشتر در جمعیت اطفال ایجاد می‌شوند که عفونت را بدون ریشه‌کنی مؤثر باکتریایی مادام‌العمر می‌سازد. علاوه بر این، مطالعات اپیدمیولوژیک که عفونت را با خطر بالاتر بدخیمی معده مرتبط می‌کند، سازمان بهداشت جهانی را برای تحقیقات سرطان جهت طبقه‌بندی هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان سرطان‌زای کلاس I هدایت می‌کند (۲). عفونت هلیکوباکتر پیلوری یک عامل خطر اصلی برای توسعه سرطان معده است زیرا باعث ایجاد یک توالی گام‌به‌گام در مخاط معده می‌شود که با گاستریت سطحی شروع می‌شود، که می‌تواند به گاستریت مزمن، گاستریت آتروفیک، متاپلازی روده، دیسپلازی و درنهایت کارسینوم معده تبدیل شود (۳،۴). باکتری‌ها پاسخ ایمنی میزبان (ذاتی و سازگار) را القا می‌کنند، اما تداوم عفونت نشان می‌دهد که پاسخ دراز بین بردن عفونت مؤثر نیست. علاوه بر این، شواهد متعدد نشان می‌دهد که پاسخ ایمنی به پاتوژن مرتبط با عفونت کمک می‌کند. در طول دو دهه گذشته، چندین مدل تجربی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری برای بررسی پاتوژن این عفونت ایجاد شده است. با استفاده از سویه هلیکوباکتر پیلوری سازگار با موش (*Sidney* *SS1 Strain*)، لی و همکاران. مدلی از کلونیزاسیون باکتریایی طولانی‌مدت و بالا را در موش‌ها ایجاد کردند (۳). اگرچه هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان سویه غیرتهاجمی شناخته شده است، اما باعث ایجاد یک واکنش التهابی گسترده در مخاط معده می‌شود (۵). این واکنش با نفوذ مخاطی سلول‌های التهابی، به‌ویژه نوتروفیل‌ها، مشخص می‌شود که با افزایش بیان کموکاین‌ها و سیتوکین‌های پیش التهابی انجام می‌شود (۶،۷). با توجه به شیوع بالای عفونت هلیکوباکتر پیلوری در سراسر جهان، هزینه‌های بالای درمان آنتی‌بیوتیکی و افزایش نرخ مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تلاش‌های قابل توجهی برای تولید واکسن علیه هلیکوباکتر پیلوری انجام شده است. با این حال،

واکسیناسیون کارآمد تا به امروز در انسان به دست نیامده است (۸). بنابراین، یافتن درمان‌های جایگزین ضروری است (۹). ژن *leoA* یکی از عوامل بیماری‌زایی *GTPase* هلیکوباکتر پیلوری است که در جزیره بیماری‌زایی کدگذاری می‌شود و بالقوه از طریق وزیکول ترشحی باعث افزایش انتشار سم می‌شود (۱۰). وزیکول‌های غشاء نقش مهمی در عملکرد حفاظت‌شده اعضای خانواده دی‌آمینی، دارند. گزارشات نشان داده‌اند که این ژن توانایی ایمنی‌زایی بالقوه در بدن میزبان را دارد؛ لذا آن را نامزد مناسبی برای تولید یک واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری، معرفی نموده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن‌های *IL4*، *IL6* و اینترفرون گاما در سطح mRNA به روش *real time PCR* در خون موش‌های BALB/c واکسینه شده با واکسن ژنی *pEGFP-C2-leoA* بوده است. همچنین میزان بیان و ماندگاری *leoA* در بافت محل تزریق واکسن (عضله ران موش‌ها) در یک دوره زمانی ۴۵ روزه بررسی شده است.

## روش بررسی

کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی: در این مطالعه، قطعه ژن *leoA* هلیکوباکتر پیلوری درون وکتور بیانی *pEGFP-C2* طراحی و توسط شرکت *Generay* سنتز گردید. باکتری *E. coli* سویه *Top10F* به‌منظور ترانسفورماسیون و تکثیر سازه‌های ژنی نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب و غربالگری باکتری‌های دریافت‌کننده پلاسمید نو ترکیب در حضور آنتی‌بیوتیک کانامایسین انجام شد. صحت وکتور نو ترکیب (*pEGFP-C2-leoA*) به روش *PCR* و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *KpnI* و *SacII* تأیید گردید. همچنین صحت توالی ژن کلون شده درون وکتور بیانی *pEGFP-C2* توسط شرکت سازنده و با روش تعیین توالی سانگر مورد بررسی قرار گرفت.

انتقال سازواره نهایی *pEGFP-C2-leoA* به سلول‌های جانوری: به‌منظور بررسی بیان ژن *leoA* در سلول جانوری، از سلول *CHO* استفاده شد و برای ترانسفورمیشن این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن (مدل *Gene Pulser Xcell* ساخت شرکت *Rad*) بهره گرفته شد. تعداد دو میلیون سلول‌های *CHO* به

میلی لیتر PBS) باهم مخلوط شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

گروه بندی و زمان بندی تزریق به موش ها

۱۸ سر موش های ماده BALB/c شش هفته ای با وزن ۳۰-۲۲ گرم به سه گروه ۶ تایی دسته بندی شدند:  
- گروه اول: پلاسمید نوترکیب (واکسن ژنی) + نانو ذرات کیتوزان

- گروه دوم: پلاسمید نوترکیب (واکسن ژنی)

- گروه سوم: پلاسمید فاقد ژن هدف (گروه شاهد)

تزریق گردید. تزریق ها بافاصله زمانی ۰، ۷ و ۱۵ روز انجام گرفت.

**تزریق به موش:** موش های گروه اول مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر (حاوی ۱۰۰ میکروگرم DNA)، و موش های گروه دوم ۱۰۰ میکرو لیتر (حاوی ۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر PBS را به صورت تزریقی دریافت کردند. به گروه شاهد نیز محلولی به صورت ۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر PBS تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از آن تزریق گردید.

**نمونه برداری:** در روزهای پانزدهم، سی ام و چهل و پنجم پس از آخرین مرحله تزریق، تعداد ۲ سر موش از هر گروه، کشته و نمونه برداری شد.

بافت عضله ران موش (دقیقاً در محل تزریق)، و مونوسیت های خون کامل با استفاده از فایکول جداسازی شد.

**استخراج RNA:** با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت یکتا تجهیز)، RNA کلی بافت طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص شد و آن با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده باندهای 18S و 28S بررسی گردید. هم چنین غلظت RNAها با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد. بلافاصله جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

**ساخت Cdna:** برای سنتز cDNA، یک میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از آغازگر الیگومر تیمیدین (Oligo dT) و کیت شرکت تاکارا ژاپن، در حجم ۱۰ میکرو لیتر طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل گردید.

همراه ۸۰۰ نانوگرم در هر میکرو لیتر از وکتور نو ترکیب pEGFP-C2-leoA و وکتور pEGFP-C2 بدون ژن در دو گروه مختلف در حجم ۴۰۰ میکرو لیتر در کورت ۰/۴ میلی متری ریخته شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه سازی شده ۰/۱۷۴ کیلوولت و ۴۰۰ میکرو فاراد به سلول ها داده شد و سلول های حاصل در حضور آنتی بیوتیک نئومایسین کشت داده شدند.

**انجام SDS-PAGE:** وزن مولکولی و محل قرار گرفته پروتئین بیان شده درون سلول های یوکاریوتی CHO، به وسیله آزمون SDS-PAGE تأیید شد. سلول های CHO ترانسفورم شده به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه رسوب داده شدند. به رسوب سلولی مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر PBS اضافه شد و در نهایت سلول های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز و با کوماسی بلو رنگ آمیزی انجام گرفت.

**تهیه نانو ذرات کیتوزان به روش Ionic Gelation:** ابتدا محلول کیتوزان (حل کردن صد میلی گرم کیتوزان در ۵۰ میلی لیتر اسید استیک به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق با pH = ۵/۵ و فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری جهت حذف کیتوزان های حل نشده) تهیه شد. سپس محلول TPP (۲۰ میلی گرم در ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه) به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان در حال چرخش روی همزن در مدت ۱ ساعت با دور ۱۰۰۰ rpm اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول رویی حاوی نانو ذرات کیتوزان جمع آوری گردید و با دستگاه فریز - درایر خشک و پودر گردید. از روش های زتا آنالایزر (دستگاه Nanozeta Sizer ساخت کشور آمریکا) برای ارزیابی ویژگی های فیزیکوشیمیایی، شاخص پراکندگی و اندازه نانو ذرات کیتوزان تولید شده استفاده شد و از دستگاه Malvern Instruments ساخت کشور انگلستان و میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای پراکندگی نوری دینامیک (Dynamic Light Scattering) استفاده گردید. **تهیه مخلوط پلاسمید و نانو ذرات:** نسبت مساوی از محلول کیتوزان (۱ درصد) و پلاسمید (۲۰۰۰ میکروگرم در هر

داده‌ها به صورت  $\text{means} + \text{S.E.M}$  در سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از متد  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  انجام شد. مزیت روش  $\Delta\Delta Ct$  در سهولت مراحل کار است و یک‌بار رسم منحنی استاندارد کافی می‌باشد و در صورتی از این روش استفاده می‌شود که کارایی PCR در نمونه‌های کنترل و هدف نزدیک به ۱۰۰٪ باشد.

#### ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر از نوع تجربی می‌باشد که در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان با کد IR.IAU.FALA.REC.1400.023 به تصویب رسیده است.

واکنش **RT-qPCR**: پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Oligo 7 و برنامه Blast طراحی شدند (جدول ۱). هر واکنش PCR (شامل SYBR Green Master Mix، پرایمر، cDNA و آب مقطر) در ۴۵ سیکل انجام شد و از ژن GAPDH به عنوان ژن رفرنس در تمام آزمایشات بیان ژن استفاده شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS version 16 مورد تحلیل آماری قرار گرفت؛ از آزمون one way ANOVA و آزمون متعاقب LSD و نیز آزمون t-test مسد ت‌قل، جهت بررسی و وجود ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها استفاده گردید. تمام

جدول ۱: توالی پرایمر استفاده شده در این تحقیق

اسم ژن	توالی	سایز باند	دمای اتصال
GAPDH	5'- TCCCGTAGACAAAATGGTGAAGG -3'	261 bp	65 C
	5'- ATGTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG -3'		
IFN $\gamma$	5'- GCCTAGCTCTGAGACAATGAACG -3'	188 bp	64 C
	5'- GCCAGTTCCTCCAGATATCCAAG -3'		
IL6	5'- CTTGGGACTGATGCTGGTGAC -3'	162 bp	61 C
	5'- TCTTTTCTCATTTCACGATTTC -3'		
IL-4	5'- TCACAGGAGAAGGGACGCCATG -3'	246 bp	67 C
	5'- TGGACTTGGACTCATTCATGGTGC -3'		
LeoA	5'- AAGGGTACCGCAATGAATGAAACGCTAGAAC-3'	1757 bp	64 C
	5'- TCACCGCGGAACACAAATTCAGTTCATTC-3'		

حضور آنتی‌بیوتیک تأیید شد. بیان ژن *leoA* در این سلول‌ها، با واکنش SDS-PAGE انجام شد. محصول پروتئینی حاصل از ژن *leoA* به وزن ۱۲۴ کیلو دالتون نشان‌دهنده بیان این پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی CHO بود (شکل ۱).

تأیید نانو ذرات کیتوزان: اندازه نانو ذرات کیتوزان (وزن مولکولی پایین) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی کمتر از ۲۰۰ نانومتر به دست آمد و میانگین اندازه نانو ذرات به دست آمده توسط پراکنگی نوری دینامیک (DLS) ۱۱۱/۷ نانومتر و هم‌چنین شاخص پراکنگی اندازه ذرات توسط آنالیز زتا (۲۰/۸mV) تعیین شد.

#### نتایج

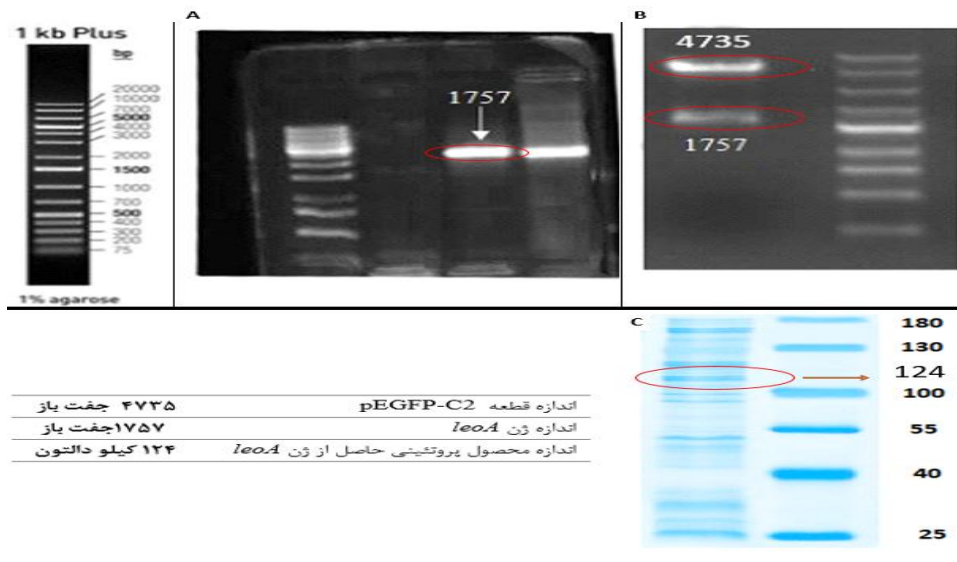
**صحت کلون شدن ژن leoA:** درستی سازواره طراحی شده با روش‌های PCR و هضم آنزیمی (*SacII* و *KpnI*) مورد تأیید قرار گرفت. برش وکتور pEGFP-C2-leoA با دو آنزیم فوق‌الذکر سبب تشکیل دو قطعه، با اندازه‌های ۶۴۹۲ جفت باز و ۱۷۵۷ جفت باز گردید که نشان‌دهنده تشکیل سازواره نهایی بود (شکل ۱).

الکتروپوریشن و بیان ژن: درستی ورود سازواره pEGFP-C2-leoA در سلول‌های CHO با واکنش PCR و رشد در

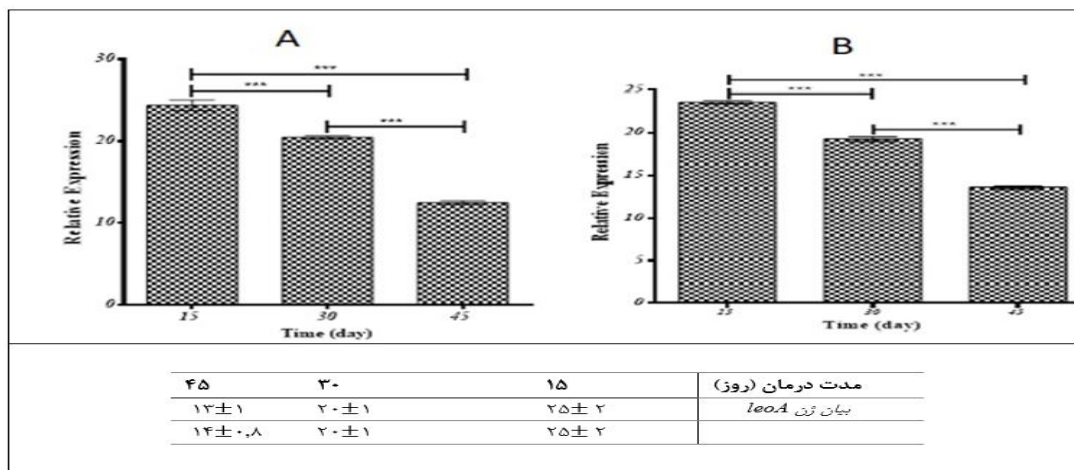
اندازه‌گیری شد. منحنی‌های ذوب مربوط به ژن‌های *IFN $\gamma$* ، *IL6* و *IL4* به صورت تک قله به دست آمد که بیانگر وجود یک محصول خاص در PCR است. مقایسه میانگین بیان نسبی این ژن‌ها نشان داد *IFN $\gamma$*  در نمونه‌های پلاسمید و نمونه پلاسمید به همراه نانو ذرات کیتوزان نسبت به نرمال، افزایش بیان دارد. همچنین *IL6* در نمونه‌های پلاسمید و نمونه‌های پلاسمید به همراه نانو ذرات کیتوزان نسبت به نرمال، کاهش بیان نسبت به نرمال نشان داد (نمودار ۱).

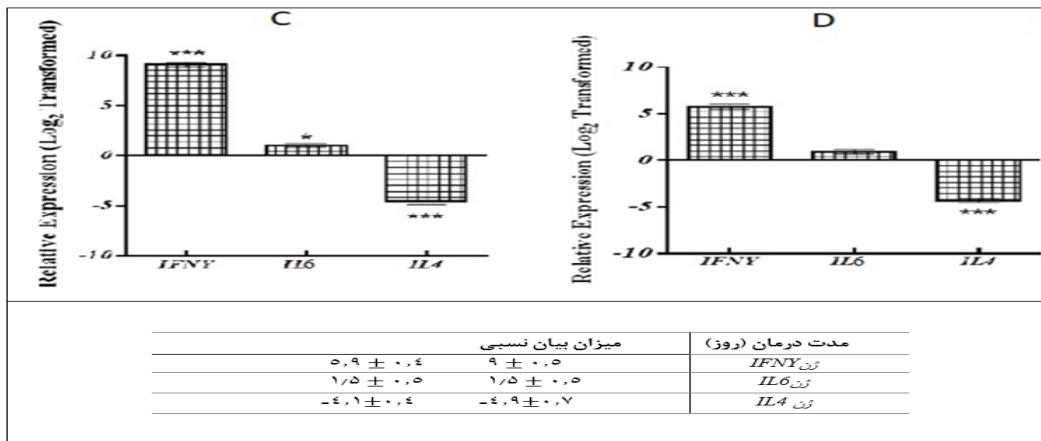
بررسی بیان ژن‌ها: ژن *leoA* بیان این ژن در نمونه بافت به دست آمده از عضله ران موش‌های واکنش داده شده به روش real time RT-PCR انجام شد. منحنی‌های ذوب مربوط به ژن‌های *leoA* و *GAPDH* به صورت تک قله به دست آمد که بیانگر وجود تنها یک محصول خاص در PCR است. مقایسه بیان ژن *leoA* در بافت موش‌های گروه حاوی پلاسمید با گروه حاوی نانو ذرات کیتوزان در روز ۱۵ افزایش بیان داشت و در روز ۴۵ کاهش بیان را نشان داد (نمودار ۱).

بیان ژن‌های *IL6*، *IFN $\gamma$*  و *IL4*: بیان این ژن‌ها در نمونه خون موش‌های واکنش داده شده با روش real time RT-PCR



شکل ۱: (A) تکثیر ژن *leoA* به روش PCR، (B) هضم آنزیمی سازواره نهایی pEGFP-C2-*leoA* با دو آنزیم *KpnI* و *SacII* و (C) محصول پروتئینی حاصل از ژن *leoA*





نمودار ۱: A: بررسی بیان ژن *leoA* در بافت موش‌های حاوی پلاسمید همراه با ژن که در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ به صورت معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) اختلاف دارند. B: بررسی بیان ژن *leoA* در بافت موش‌های حاوی پلاسمید همراه با ژن همراه با نانوذره کیتوزان که در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ به صورت معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) اختلاف دارند. C: بررسی بیان سایتوکاین‌ها در مونسیت استخراج‌شده از خون کامل موش‌های حاوی پلاسمید همراه با ژن همراه با نانوذره که در گروه حاوی pEGFP-C2-*leoA* + Nanoparticle بیان ژن *IFN $\gamma$*  به صورت معنی‌دار افزایش یافته است ( $P < 0.01$ ). در گروه حاوی pEGFP-C2-*leoA* + Nanoparticle بیان ژن *IL6* به صورت معنی‌دار افزایش یافته است ( $P < 0.5$ ). در گروه حاوی pEGFP-C2-*leoA* + Nanoparticle بیان ژن *IL4* به صورت معنی‌دار کاهش یافته است ( $P < 0.01$ ). بررسی بیان سایتوکاین‌ها مونسیت استخراج‌شده از خون کامل موش‌های حاوی پلاسمید همراه با ژن که در گروه pEGFP-C2-*leoA* بیان ژن *IFN $\gamma$*  به صورت معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) افزایش یافته است، در گروه pEGFP-C2-*leoA* بیان ژن *IL6* به صورت معنی‌دار ( $P < 0.5$ ) تغییر نداشته است و در گروه pEGFP-C2-*leoA* بیان ژن *IL4* به صورت معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) کاهش یافته است.

دهد. تفاوت معناداری بین گسترش این عفونت در کشورهای غربی و کشورهای در حال توسعه به چشم می‌خورد. شیوع سرولوژی مثبت هلیکوباکتریلوری در کشورهای در حال توسعه ۹۰ درصد جمعیت است، در حالیکه در کشورهای توسعه یافته، به استثنای ژاپن، شیوع زیر ۴۰ درصد است (۱۶). این سرطان که مسئول مرگ ۶۵۰۰۰ نفر در جهان در سال ۲۰۰۰ بوده است، چهارمین بدخیمی رایج در دنیا است و ۱۰ درصد از کل مرگ‌ومیر سالیانه سرطان را به خود اختصاص می‌دهد (۱۷). عفونت هلیکوباکتریلوری در ایران نیز شایع بوده و این شیوع بین ۶۰ تا ۹۰ درصد است، به خصوص سرطان معده از آمار بالایی برخوردار است (۱۸). این مطلب نشان می‌دهد که ایران یک منطقه بسیار خطرناک برای عفونت هلیکوباکتریلوری است. با توجه به این که هلیکوباکتریلوری به عنوان یک پاتوژن انسانی خطرناک به شمار می‌آید بنابراین ضرورت بررسی راه‌های پیشگیری از آن روشن است. در مسیر ابتلا به عفونت، آنتی‌ژن‌های این باکتری سبب شکل‌گیری واکنش‌های دستگاه ایمنی میزبان می‌شوند

## بحث

هلیکوباکتریلوری یک باکتری گرم منفی، متحرک، میله‌ای شکل و میکروآئروفیل (باکتری‌هایی که اکسیژن را به عنوان گیرنده نهایی الکترون نیاز دارند و در شرایط بی‌هوازی به مقدار خیلی کمی رشد می‌کنند) است، که در سطح مجرای پوشش معده دیده می‌شود (۱۱). این باکتری دلیل اصلی گاستریت فعال و مزمن، زخم معده و دوازدهه است. همچنین موجب التهاب طولانی در مخاط معده به وسیله نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها می‌شود (۱۲). از آنجایی که این باکتری در لایه عمقی موکوس پوشاننده سلول‌های اپی‌تلیال معده رشد کرده و تشکیل کلنی می‌دهد، یافته‌های آندوسکوپی خاصی نداشته و در نتیجه تشخیص بالینی آن مشکل است (۱۳-۱۵). با بررسی‌های انجام‌شده، نقش هلیکوباکتریلوری در ایجاد بدخیمی و سرطان معده تأیید شده است و همین امر موجب شده است که آژانس پژوهش سرطان سازمان بهداشت جهانی نام این باکتری را در ردیف عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار

نشان داد که ژن *leoA* با موفقیت کلون شده است. سپس برای به دست آوردن مقادیر کافی از این پلاسمیدها، ابتدا با استفاده از باکتری *E. coli* سویه TOP10F، سلول مستعد تهیه شد و پلاسمیدهای مذکور به صورت جداگانه به این سلول‌های مستعد منتقل می‌شوند. از آنجاکه پلاسمید pEGFP-C2-*leoA* دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (به‌عنوان مارکر انتخابی) است، در محیط کشت باکتری‌های مستعد ترانسفورم شده با این پلاسمیدها، از آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت باکتری) استفاده گردید. پس از رشد باکتری‌های دارای پلاسمید، استخراج پلاسمید انجام گرفت و غلظت پلاسمیدهای تخلیص شده، با نانودراپ سنجیده شد. به‌منظور واکنش‌سناسیون موش‌های آزمایشگاهی نژاد BALB/c محلول‌های تزریقی همان‌طور که توضیح داده شد ساخته و به عضله چهار سر ران در موش‌ها تزریق شد. این تزریقات در طی ۳ مرحله (روزهای ۰، ۷ و ۱۵) انجام می‌شود. سپس سه گروه موش مختلف تعیین و به یک گروه پلاسمید نوترکیب به همراه نانو ذرات کیتوزان، به گروه دوم پلاسمید نوترکیب و به گروه سوم پلاسمید فاقد ژن کلون شده (گروه شاهد) تزریق گردید. پس از پانزده روز از آخرین مرحله تزریق واکسن، حیوانات آزمایشگاهی به‌منظور نمونه‌گیری تشریح شد، سپس خون آن‌ها در تیوپ جمع‌آوری گردید. بافت مورد تزریق واکسن نیز جدا و در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از خون (گلبول‌های سفید) و بافت، استخراج RNA و سپس تهیه cDNA انجام گرفت. با استفاده از روش real time RT-PCR میزان بیان سایتوکاین‌هایی مثل IL-6، IL-4 و اینترفرون گاما بررسی شد و هم‌چنین میزان بیان ژن *leoA* به‌عنوان ژن به‌کاررفته به‌عنوان واکسن، در بافت مربوطه به همین روش بررسی گردید. از ژن *GAPDH* هم به‌عنوان ژن رفرنس در کنار سایر آزمایشات استفاده شد. در نهایت اطلاعات به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد بررسی آماری قرار گرفت. میاشیتا و همکاران در سال ۲۰۰۲ پاسخ ایمنی در موش بعد از واکسن ژنی کدکننده کاتالاز هلیکوباکتریپیلوری را بررسی نمودند. در این آزمایش واکسن

بنابراین می‌توان از ژن‌های کدکننده این آنتی‌ژن‌ها به‌صورت واکسن‌های DNA بهره جست (۱۹). واکسیناسیون هلیکوباکتریپیلوری می‌تواند بار عفونت و پیامدهای آن را کاهش دهد. یک واکسن ایده‌آل نه‌تنها باید ایمنی اثبات‌شده و سابقه بهره‌وری خوبی داشته باشد بلکه باید ارزان قیمت بوده و ایمنی درازمدت ارائه دهد و کمترین تکرار دوز را نیاز داشته باشد. واکسیناسیون هلیکوباکتریپیلوری، هم از منظر درمان این بیماری و هم از منظر جلوگیری از بروز آن، یک روش مناسب برای رفع این مشکل به نظر می‌آید (۱۹). واکسن‌های ژنی در مقایسه با سایر واکسن‌ها دارای مزایایی چون تولید ساده‌تر، خالص‌تر بودن محصول، ذخیره‌سازی و نگهداری آسان می‌باشند. DNA واکسن از یک پلاسمید تشکیل‌شده که در واقع یک DNA کوچک حلقوی است و می‌تواند در داخل سلول شروع به تکثیر کند، DNA واکسن به لحاظ ژنتیکی قابلیت دست‌کاری شدن را دارد و می‌توان به کمک آن یک یا چندین آنتی‌ژن اختصاصی از انواع مختلف عوامل عفونی و پاتوژن‌ها را در سلول میزبان تولید و بیان کرد. وقتی DNA واکسن به سلول میزبان تزریق می‌شود میزبان شروع به خوانش از روی این پلاسمید کرده و پروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌های بیگانه در داخل سلول میزبان تولید می‌شود و این آنتی‌ژن‌ها توسط سلول میزبان پردازش‌شده و در سطح سلول عرضه می‌گردد که به‌این ترتیب سلول‌های ایمنی از حضور آن‌ها آگاه و سیستم ایمنی علیه آن‌ها فعال می‌شود. هم‌چنین وقتی سیستم ایمنی جهت پاسخ اولیه بر ضد آنتی‌ژن بیگانه آماده می‌شود ایمنی محافظتی و خاطره‌ای نیز بر ضد آن پاتوژن تولید و منجر به مصونیت در مواجهه با پاتوژن می‌گردد (۲۰). در پژوهش حاضر، قطعه ۱۷۵۷ جفت بازی ژن *leoA* با موفقیت از هلیکوباکتریپیلوری استخراج و درون وکتور PTZ کلون و واکنش کلونینگ تأیید گردید. در مرحله بعد، قطعه درون وکتور بیانی pEGFP-C2 با موفقیت ساب‌کلون گردید. پس از تأیید ساب‌کلونینگ با آزمون‌های تأییدی PCR و هضم آنزیمی، پروتئین نوترکیب ژن *leoA* در سلول‌های CHO با وزن ۱۲۴ کیلودالتون بیان شد. نتایج حاصل از واکنش SDS-PAGE

ژنی *pcDNA3.1-kat* استفاده شد، در این آزمایش موش‌های C57/BL6 با ۱۰ میکروگرم از *pcDNA3.1-kat* مورد آزمایش قرار گرفتند. آنتی‌بادی IgG مخصوص کاتالاز در سرم موش‌ها مشاهده شد که باعث حفاظت آن‌ها در برابر کلون شدن هلیکوباکتریپیلوری گردید و سبب کاهش شدید درجه التهاب معده شد (۲۱). مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳ توسط اونیت همکارانش به منظور ارزیابی ایمنی در واکسن ژنی کدکننده سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) انجام گرفت. با تزریق داخل عضلانی سازواره *pcDNA-SOD* به موش‌های BALB/C انتقال یافت و سبب ایجاد پاسخ ایمنی هومورال و سلولی شد که سبب یک پاسخ ایمنی به Th-1 در موش و تولید اینترفرون گاما شد. این سازواره سطح قابل‌توجهی از حفاظت در موش BALB/C در مقابل عفونت بروسلا آبورتوس نوع خطرناک ۲۳۰۵ القا کرده است. در مجموع این داده‌ها نشان داد که این سازواره کاندید خوبی برای استفاده در مطالعات آینده واکسیناسیون علیه بروسلاز است (۲۲). در این مطالعه باکتری و نوع ژن مورد بررسی با مطالعه ما متفاوت است. در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای که توسط بایا و همکارانش انجام گرفت، ژن *Baba2* توسط PCR تکثیر شد و وارد وکتور بیانی پروکاریوتی pET-22b(+) شد و در باکتری *E. coli* بیان شد. علاوه بر این، ایمنی‌زایی *Baba* با آزمایش‌هایی در حیوانات مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین نو ترکیب *Baba* سهمی حدود ۳۴/۸ درصد از کل پروتئین باکتریایی را به خود اختصاص داده بود. نتیجه‌گیری دست آمده از این مطالعه نشان داد که پروتئین نو ترکیب *Baba* ممکن است یک واکسن بالقوه برای کنترل و درمان عفونت هلیکوباکتریپیلوری باشد (۲۳). در پژوهشی در سال ۲۰۰۵ کاساتارو و همکاران به ساخت واکسن ژنی علیه بروسلا پرداختند. در این پروژه پروتئین خارج سلولی ۳۱ (*omp31*) مورد توجه قرار گرفت و این پژوهشگران به بررسی اثرات این واکسن علیه *B. melitensis* و *B. ovis* پرداختند. *Omp31* در وکتور بیانی pcI کلون شد و به موش‌های BALB/C تزریق گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که این واکسن موجب واکنش‌های سایتوتوکسیک می‌شود که توانایی

مواجهه با عفونت بروسلا را دارد. این واکنش‌ها به القای سلول‌های CD8T می‌شود که سلول‌های آلوده بروسلا را از طریق مسیر پرفورین حذف می‌کند (۲۴). این پژوهش از لحاظ زیادی مشابه با پژوهش حاضر است تنها با این تفاوت که در مطالعه ما از ژن *leoA* استفاده شد. در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۰۹ دوستی و همکاران با کلون سازی ژن *omp31* در پی تولید واکسن ژنی برآمدند. نتایج این تحقیق و بررسی ایمنی‌زایی آن در موش‌های BALB/C نشان‌دهنده فعالیت مناسب این واکسن ژنی بود که باعث واکنش سلول‌های Th-1 در موش‌ها گردید (۲۵). در این مطالعه تنها ژن بررسی شده با مطالعه ما متفاوت است. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۳ جای و همکاران اقدام به جداسازی و کلون‌سازی بخش *ureI* از مجموعه ژن‌های اوره آزی نمودند. این محققان با هدف ساخت واکسن ژنی، ژن *ureI* را در وکتور بیانی PCDNA3.1 وارد نمودند و سازواره نهایی *ureI(+)-PCDNA3.1* را به دست آوردند. این پژوهشگران نتیجه کار خود را این‌گونه اعلام کردند که این سازواره قادر به بیان محصول پروتئینی *ureI* بوده و محرک سیستم ایمنی موش‌های نژاد C57BL/6 به صورت واکسن ژنی می‌باشد. نتیجه‌گیری این کار موفقیت این سازواره ژنی در ایجاد پاسخ ایمنی بسیار قوی از نوع سلولار و همولار به‌طور هم‌زمان بود (۲۶). این مطالعه از چند جنبه مشابه و مؤید مطالعه حاضر است، هرچند نوع نژاد موش‌های مورد استفاده متفاوت می‌باشد. در سال ۲۰۱۴ نیز تحقیق مشابه دیگری توسط المریری و همکاران انجام گرفت که به کلون سازی ژن *B39* و *Sp41* از بروسلا ملاتنسز پرداختند و در پی تولید واکسن ژنی و بررسی ایمنی‌زایی آن در BALB/C به این نتیجه رسیدند که واکسن ژنی می‌تواند روش موثری برای مبارزه علیه بروسلا باشد (۲۷). این پژوهش نیز تا حدودی مشابه با مطالعه حاضر می‌باشد، هرچند نوع باکتری و ژن مورد نظر متفاوت می‌باشد. در پژوهشی که توسط محمودی و اشیان و همکارش در سال ۲۰۱۶ انجام گرفت، نخست DNA هلیکوباکتریپیلوری استخراج شد و ژن *ureG* با استفاده از پرایمرهای ویژه تکثیر یافت. محصول PCR وارد وکتور PTZ



بررسی بیان ژن موردنظر در بافت عضله ران موش‌های هر دو گروه در طی ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از تزریق نشان داد که بیان باگذشت زمان کاهش می‌یابد و تفاوت معنی‌داری هم در دو گروه موش‌های واکسینه از این جنبه دیده نشد. روی هم رفته نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده مؤثر بودن سازواره ژنی طراحی‌شده به‌عنوان یک کاندید واکسن مناسب در درمان التهابات ناشی از هلیکوباکتر پیلوری از جمله کارسینوم معده می‌باشد.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت علمی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند. و مطالعه حاضر منتج از پایان‌نامه است که با کد ۱۷۲۴۸۱۲۸۳۵۸۱۰۶۱۱۴۰۱۶۲۴۲۸۵۵۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تصویب شده است.  
**حامی مالی:** ندارد.  
**تعارض در منافع:** وجود ندارد.

شد و سپس با آنزیم‌های *Sall* و *xbal* برش داده شد و در وکتور بیانی *pcI-neo* ساب کلون گردید. سپس *pcI-ureG* به روش الکتروپوریشن وارد سلول *CHO* کرده و بیان ژن *ureG* بر ژل SDS-PAGE مشاهده شد. نتایج نشان داد که ژن *ureG* کلون‌سازی شده توانایی بیان و تولید فرآورده پروتئینی اختصاصی این ژن در سلول جانوری *CHO* را دارد بنابراین این سازواره ژنی را می‌توان به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای بررسی‌های بعدی در مورد واکنش‌های نوترکیب علیه هلیکوباکترپیلوری در الگوی حیوانی دانست. در این مطالعه ژنی از مجموعه اوره‌آز هلیکوباکتر مورد بررسی قرار گرفته است و از وکتور بیانی متفاوتی استفاده شده است (۲۸).

### نتیجه‌گیری

آنالیزهای آماری نشان‌دهنده افزایش سطح بیان سایتوکاین اینترفرون گاما و کاهش سطح بیان *IL4* در منوسیت‌های خون هر دو گروه از موش‌های واکسینه شده بود. از طرفی سایتوکاین *IL6* تغییر معنی‌داری در موش‌های حاوی پلاسمید همراه ژن نشان نداد، درحالی‌که در گروه حاوی پلاسمید همراه ژن همراه با نانو ذرات افزایش داشت. به‌طور کلی این تغییرات نشان‌دهنده تحریک معنی‌دار سیستم ایمنی موش‌ها می‌باشد. از طرف دیگر

### References:

- 1-Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. *Immune Response to H Pylori*. World J Gastroenterology: WJG 2006; 12(35): 5593-8.
- 2-Meliş LE, Mărginean CO, Săsăran MO. *The Challenges of Eradicating Pediatric Helicobacter Pylori Infection in the Era of Probiotics*. Children 2022; 9(6): 795.
- 3-Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B , Daskalopoulos G, Dixon MF. *A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain*. Gastroenterology 1997; 112(4): 1386-97.
- 4-Correa P. *Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep And Multifactorial Process—First American Cancer Society Award Lecture On Cancer Epidemiology And Prevention*. Cancer Res 1992; 52(24): 6735-40.
- 5-Verbeke H, Geboes K, Van Damme J, Struyf S. *The Role of CXC Chemokines in the Transition of Chronic Inflammation to Esophageal and Gastric Cancer*. Biochim Biophys Acta 2013; 1835(2): 117-29.

- 6-Backert S, Naumann M. *What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by Helicobacter pylori*. Trends Microbiol 2010; 18(11): 479-86.
- 7-Koosirirat C, Linpisarn S, Changsom D, Chawansuntati K, Wipasa J. *Investigation of the Anti-Inflammatory Effect of Curcuma Longa in Helicobacter Pylori-Infected Patients*. International immunopharmacology 2010; 10(7): 815-8.
- 8-Rad R, Brenner L, Krug A, Voland P, Mages J, Lang R, et al. *Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2007; 133(1): 150-63. e3.
- 9-Bengmark S, Mesa MD, Gil A. *Plant-Derived Health-The Effects of Turmeric and Curcuminoids*. Nutricion Hospitalaria 2009; 24(3): 273-81.
- 10-Yang YJ, Chen PC, Lai FP, Tsai PJ, Sheu BS. *Probiotics-Containing Yogurt Ingestion and H. pylori Eradication Can Restore Fecal Faecalibacterium prausnitzii Dysbiosis in H. pylori-Infected Children*. Biomedicines 2020; 8(6): 146.
- 11-Shakhatreh MAK, Khabour OF, Alzoubi KH, Banihani MN, Abu-Siniyeh A, Bashir NA, et al. *The Influence of IL-1B Gene Polymorphisms on H. Pylori Infection and Triple Treatment Response among Jordanian Population*. Appl Clin Genet 2020; 13: 139-45.
- 12-Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J. *Helicobacter pylori and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem*. Helicobacter 2016; 21(5): 349-63.
- 13-Nejati S, Karkhah A, Darvish H, Validi M, Ebarhimpour S, Nouri HR. *Influence of Helicobacter Pylori Virulence Factors Caga and Vaca on Pathogenesis of Gastrointestinal Disorders*. Microb Pathog 2018; 1; 117: 43-8.
- 14-Wu D, Cao M, Peng J, Li N, Yi S, Song L, et al. *The Effect of Trimethylamine N-Oxide on Helicobacter Pylori-Induced Changes of Immunoinflammatory Genes Expression in Gastric Epithelial Cells*. Int Immunopharmacol 2017; 43: 172-8.
- 15-Roszczenko-Jasińska P, Wojtyś MI, Jagusztyn-Krynicka EK. *Helicobacter Pylori Treatment in the Post-Antibiotics Era—Searching for New Drug Targets*. Appl Microbiol Biotechnol 2020; 104(23): 9891-905.
- 16-El-Shouny WA, Ali SS, Hegazy HM, Abd Elnabi MK, Ali A, Sun J. *Syzygium Aromaticum L.: Traditional Herbal Medicine Against Caga and Vaca Toxin Genes-Producing Drug Resistant Helicobacter Pylori*. J Tradit Complement Med 2019; 10(4): 366-77.
- 17-Banga Ndzouboukou JL, Lei Q, Ullah N, Zhang Y, Hao L, Fan X. *Helicobacter pylori adhesins: HpaA a potential antigen in experimental vaccines for H. pylori*. Helicobacter 2021; 26(1): e12758.
- 18-Mirzaei N, Poursina F, Moghim S, Rashidi N, Ghasemian Safaei H. *The Study of H. Pylori Putative Candidate Factors for Single- and Multi-Component Vaccine Development*. Crit Rev Microbiol 2017; 43(5): 631-50.
- 19-Aliramaei MR, Khorasgani MR, Rahmani MR,

- Zarkesh Esfahani SH, Emamzadeh R. *Expression of Helicobacter Pylori CagI Gene In Lactococcus Lactis MG1363 and Evaluation of Its Immunogenicity as an Oral Vaccine in Mice.* Microb Pathog 2020; 142: 103926.
- 20-Pan X, Ke H, Niu X, Li S, Lv J, Pan L. *Protection Against Helicobacter Pylori Infection in BALB/C Mouse Model by Oral Administration of Multivalent Epitope-Based Vaccine of Cholera Toxin B Subunit-HUUC.* Front Immunol 2018; 9: 1003.
- 21-Czinn SJ, Blanchard T. *Vaccinating Against Helicobacter Pylori Infection.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011; 8(3): 133-40.
- 22-Miyashita M, Joh T, Watanabe K, Todoroki I, Seno K, Ohara H, et al. *Immune Responses in Mice to Intranasal and Intracutaneous Administration of a DNA Vaccine Encoding Helicobacter Pylori-Catalase.* Vaccine 2002; 20(17-18): 2336-42.
- 23-Oñate AA, Céspedes S, Cabrera A, Rivers R, González A, Muñoz C, et al. *A DNA Vaccine Encoding Cu,Zn Superoxide Dismutase Of Brucella Abortus Induces Protective Immunity In BALB/C Mice.* Infect Immun 2003; 71(9): 4857-61.
- 24-Bai Y, Zhang YL, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY. *Cloning and Expression and Immunogenicity of Helicobacter Pylori Baba2 Gene.* World J Gastroenterol 2004; 10(17): 2560-2.
- 25-Cassataro J, Velikovsky CA, De La Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, et al. *A DNA vaccine coding for the Brucella outer membrane protein 31 confers protection against B. melitensis and B. Ovis Infection by Eliciting a Specific Cytotoxic Response.* Infect Immun 2005; 73(10): 6537-46.
- 26-Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Javadi GR, Sardari S, Shokrgozar MA. *DNA Vaccine Encoding The Omp31 Gene Of Brucella Melitensis Induces Protective Immunity In BALB/C Mice.* Res J Biol Sci 2009; 4(1): 126-31.
- 27-Zhao YX, Qi JH, Zhang H, Duan GC, Xi YL. *Construction, Expression and Purification of UreB-Omp11 Fusion Protein of Helicobacter Pylori and its Immunocompetence.* Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 2007; 23(10): 906-10.
- 28-Al-Mariri A, Akel R, Abbady AQ. *A DNA Vaccine Encoding P39 and Sp41 of Brucella Melitensis Induces Protective Immunity in BALB/C Mice.* Arch Med Vet 2014; 46(1): 53-62.

## Evaluation of the Cytokine Genes Expression in Vaccinated BALB/c Mice with pEGFP-C2-leoA DNA Vaccine

Zahra Ahmadzadeh Chaleshtori<sup>1</sup>, Ali Asghar Rastegari<sup>\*1</sup>, Hashem Nayeri<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2</sup>

### Original Article

**Introduction:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) causes successive changes in the stomach wall, which starts with inflammation of the stomach mucosa and in some cases leads to stomach cancer. The *leoA* gene, by encoding GTPase, plays a vital role in the pathogenicity of this bacterium in the gastric mucosa. The secretory vesicles produced by the *leoA* gene release poison and stimulate the immune system in the host's body. The aim of the present study was to evaluate the gene vaccine pEGFP-C2-leoA on the expression changes of cytokines such as IL6, IL4, and interferon-gamma in inflammation caused by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model.

**Methods:** In this interventional experimental study, recombinant plasmid (pEGFP-C2-leoA) was produced, propagated, and extracted through transformation into susceptible bacterial cells. Then, suitable concentrations of 1% chitosan nanoparticles solution were prepared for injection into the quadriceps muscle of BALB/c mice. Finally, the gene expression and changes of the mentioned cytokines were measured by Real-Time RT-PCR method, the obtained results were statistically analyzed by SPSS version 16 software; One way ANOVA test and subsequent LSD test, as well as independent t-test, were used to check the existence of correlation and the significance level of the data.

**Results:** After the injection of the vaccine into the quadriceps muscle of mice during the treatment period, cytokines IFN $\gamma$  (<0.038) and IL6 (<0.049) showed a significant increase in expression. On the other hand, cytokine IL4 and the *leoA* gene also showed a significant decrease in expression (<0.042).

**Conclusion:** Based on the results, the *leoA* gene cloned in the expression vector pEGFP-C2 has the ability to express and produce the specific protein product of this gene in eukaryotic cells, and according to the results obtained in the animal model and the immune characteristic obtained in this research it is shown that the final construct pEGFP-C2-leoA has the necessary potential to investigate immunogenicity in a human model as a gene vaccine.

**Keywords:** Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, cytokine, vaccine, *leoA*, BALB/c.

**Citation:** Ahmadzadeh Chaleshtori Z, Rastegari A.A, Nayeri H, Doosti A. **Evaluation of the Cytokine Genes Expression in Vaccinated BALB/C Mice with Pegfp-C2-Leoa DNA Vaccine.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2023; 30(12): 6199-6210.

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

<sup>2</sup>Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 09131049368, email: aarastegari@gmail.com