Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:43 IRST on Tuesday November 12th 2019

بررسی ارتباط آلل‌های s ژن *vacA* در *هلیکوباکترپیلوری* با بیماری‌های گوارشی در ایران: *گزارش کوتاه*

سعید لطیفی نوید
شیوا محمدی*
صابر زهری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

*نویسنده مسئول: کرمانشاه، شهرک پردیس، بلوار پامچال، کدپستی ۶۷۱۹۷۳۶۵۴۷
تلفن: ۷۲۴۷۶۷۳-۰۸۳۱
E-mail: shivamohamadi66@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۰۱ آنلاین: ۱۳۹۲/۱۰/۱۱

زمینه و هدف: سازمان بهداشت جهانی، *هلیکوباکترپیلوری* را به‌عنوان کارسینوژن کلاس یک معرفی کرد. گزارش‌ها نشان داده‌اند که ژنوتیپ‌های مشخصی از *هلیکوباکترپیلوری* با بیماری‌های گوارشی مختلف در ارتباط است. هدف مطالعه بررسی ارتباط آلل‌های s ژن *vacA* با بروز بیماری‌های گوارشی در ایران می‌باشد.

روش بررسی: تعداد ۱۴۹ سویه باکتری از کشت بیوپسی‌های معده افراد مبتلا به بیماری‌های گوارشی جمع‌آوری و بررسی شد. پس‌از استخراج DNA، با Polymerase Chain Reaction (PCR) فراوانی آلل‌های s مورد بررسی قرار گرفت. رگرسیون خطی و لجستیک برای بررسی ارتباط این آلل‌ها با بروز بیماری‌های گوارشی استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، آنالیزهای آماری نشان داد که فراوانی آلل s1 در مقایسه با آلل s2 در سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* جدا شده از افراد مبتلا به سرطان معده ارتباط معناداری ندارد (P>۰/۰۵). فراوانی آلل s1 در بیماران جمعیت ایرانی مبتلا به سایر بیماری‌های گوارشی (گاستریت و بیماری زخم معده) ارتباط معناداری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: آلل s1 به‌تنهایی نمی‌تواند با بیماری‌های گوارشی در ایران ارتباط داشته باشد. احتمال دارد نقش بیماری‌زایی s1 زمانی بروز پیدا می‌کند که با سایر آلل‌های بیماری‌زای این ژن همراه شود.

کلمات کلیدی: *هلیکوباکترپیلوری*، زخم معده، سرطان معده، آلل‌های s ژن *vacA*.

مقدمه

همه سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* به‌طور ضروری دارای یک کپی از ژن Vacuolating cytotoxin A (*vacA*) می‌باشند. مطالعات مختلف میزان متفاوتی از فعالیت ایجاد واکوئول توسط توکسین را در سویه‌های متفاوت *هلیکوباکترپیلوری* نشان داده‌اند.[۱] این تفاوت ممکن است به‌دلیل رونویسی متفاوت *vacA*، ترشح مناسب توکسین ایجادکننده واکوئول که باعث تفاوت در میزان فعالیت ایجاد واکوئول توسط توکسین می‌شود باشد.[۲] ناحیه s در انتهای '5 ژن *vacA* قرار گرفته است و دو خانواده مهم آللی این ناحیه s1 و s2 می‌باشند.[۳]

شمار زیادی از مطالعات انجام‌شده در اروپا و آمریکای شمالی و آمریکای جنوبی نشان داده است که سویه‌هایی که شامل آلل‌های *vacA* نوع s1 هستند به‌طور معمول بیش‌تر از سویه‌های دارای آلل‌های *vacA* نوع s2 با زخم معده در ارتباط هستند. آلل s1 دارای میزان خطر بالاتری برای گسترش سرطان معده نسبت به سویه‌های *vacA* دارای آلل s2 می‌باشد.[۴]

در ایران عفونت با *هلیکوباکترپیلوری* شایع بوده و به‌خصوص سرطان معده از آمار بالایی برخوردار است. یکی‌از بالاترین آمارهای جهان در رابطه با سرطان معده مربوط به ایران و به‌طور دقیق استان اردبیل است که به‌تنهایی حدود یک‌سوم تمام موارد سرطان در اردبیل

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:43 IRST on Tuesday November 12th 2019

بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۹ مربوط به این سرطان بود.[۵] از سوی دیگر میزان عفونت با *هلیکوباکترپیلوری* در جمعیت اردبیل، بالا و در حدود ۸۹٪ بود.[۶] با توجه به این‌که تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه دشوار است و در اکثر موارد تشخیص پس‌از پیشرفت بیماری صورت گرفته و کار درمان سخت می‌شود راه اصلی مبارزه با این سرطان نیز هم‌چون التهاب و زخم معده، نابود کردن عفونت *هلیکوباکترپیلوری* شناخته می‌شود. تعیین ژنوتیپ آل‌های بیماری‌زای ژن *vacA* *هلیکوباکترپیلوری* در بیماران گوارشی می‌تواند نتایج ارزشمندی را برای طراحی استراتژی‌های جدید برای کاهش وقوع سرطان معده و ضایعات پیش‌سرطانی در نواحی با وقوع بالا سرطان معده در کشور فراهم کند. هدف این مطالعه بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های بیماری‌زای آل‌های s1 و s2 ژن *vacA* *هلیکوباکترپیلوری* با بیماری‌های گوارشی در ایران بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مقطعی درون‌گونه‌ای می‌باشد. تعداد ۱۴۹ سویه *هلیکوباکترپیلوری* از سال ۱۳۸۶ تا سال ۱۳۹۰ از کشت‌های بیوپسی معده بیمارانی که به مراکز آندوسکوپی در استان‌های مختلف ایران مراجعه کرده بودند، به‌دست آمد. از هر بیمار دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم توسط آندوسکوپیست اخذ شد و برای یکی‌از نمونه‌ها تست اوره آز سریع در محل انجام شد. بیوپسی‌ها داخل محیط انتقال و تحت زنجیره سرد در مدت کم‌تر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شده (بانک سلولی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- مولکولی اردبیل) سپس این سویه‌ها روی محیط کشت بروسلا آگار (مرک، آلمان) انتخابی که با ۷-۵٪ خون گوسفند دفیبرینه غنی شده بود، کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط کم هوازی حاوی CO_2 ۵٪ و رطوبت بالای ۹۸٪ به‌مدت چهار تا ۱۰ روز در دمای ۳۷ °C گرم‌خانه‌گذاری شدند. هویت سویه‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی تایید شد.

استخراج DNA با استفاده از کیت Genomic DNA Purification kit #K0512 Fermentas, Germany انجام و واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction, PCR) انجام شد. پس‌از تخلیص محصول PCR با کیت خالص‌سازی DNA ژنومی (Genomic DNA Purification kit)، جذب آن در ۲۶۰ نانومتر خوانده شد و غلظت آن محاسبه گردید. به‌منظور همسانه‌سازی ژن و واکنش تعیین توالی، مخلوط الحاق تهیه گردید. واکنش الحاق با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر حاوی ۲۰۰ نانوگرم از قطعه‌ی مورد نظر و ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید هضم‌شده و دو واحد آنزیم لیگاز T4 و بافر آنزیم در دمای ۱۲ °C به‌مدت ۱۲ ساعت انجام شد. محصول واکنش به باکتری اشریشیاکلی DH5α منتقل شد. غربالگری همسانه‌های حاصل روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین انجام شد. به‌منظور تایید همسانه‌سازی، تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد، سپس با انجام هضم آنزیمی قرارگرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید و در نهایت با انجام تعیین توالی از همسانه‌ها، صحت همسانه‌سازی تأیید شد.

برای بررسی این‌که آیا فراوانی آللی- ژنی با خطر بروز سرطان معده و سایر بیماری‌های گوارشی در ارتباط می‌باشد و آیا این تفاوت از نظر آماری معناداری است از آنالیز χ^2 و Fisher's exact test در SPSS ویراست ۱۹ استفاده شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. رگرسیون چندگانه خطی پس‌از کنترل متغیرهای سن و جنس برای بررسی این‌که کدام فاکتور یا فاکتورهای بیماری‌زای باکتری با خطر بروز بیماری‌های گوارشی در ارتباط می‌باشند، به‌کار برده شد.

در این آنالیز از روش Stepwise به‌عنوان مدل ورود متغیرهای مستقل و ایجاد مدل نهایی استفاده شد. احتمال F و F-value به‌ترتیب ۰/۰۵ و ۳/۸۴ بود. P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. رگرسیون چندگانه لجستیک برای بررسی تاثیر هر فاکتور در خطر بروز سرطان معده و سایر بیماری‌های گوارشی به‌کار برده شد. در این آنالیز از روش Enter به‌عنوان مدل ورود متغیرهای مستقل استفاده شد. بیماران مبتلا به گاستریت در همه آنالیزهای مقایسه‌ای به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

برای اغلب آل‌های ژن *vacA*، علاوه‌بر انجام PCR، تعیین توالی محصول PCR به‌طور مستقیم یا از طریق کلون‌سازی و انجام واکنش تعیین توالی انجام شد. پس‌از آن، توالی به‌دست‌آمده در سایت NCBI

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:43 IRST on Tuesday November 12th 2019

و با استفاده از نرم‌افزار Blast آنالیز شد. در مورد آلل‌های ژن *vacA*، نتایج نشان داد که توالی حاصل بیش‌از ۹۷٪ با توالی ژن‌های موجود در ژن بانک (GenBank) هم‌خوانی دارد. در این بررسی ۱۴۹ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد، ۱۰۹ نفر مبتلا به گاستریت (التهاب معده)، ۲۸ نفر مبتلا به بیماری زخم معده و ۱۲ نفر مبتلا به آدنوکارسینومای معده بودند. در این مطالعه با بررسی فراوانی آلل‌های مختلف ژن *vacA* مشخص شد که آلل s1 فراوان‌ترین آلل ژن *vacA* با فراوانی ۹۴/۶٪ (۱۴۱/۱۴۹) در مقایسه با آلل s2 با فراوانی ۵/۳۶٪ (۸/۱۴۹) بود. نتایج این مطالعه فراوانی بالای آلل s1 *vacA* و میزان پایین آلل s2 را در بیماران ایرانی را نشان داد. s2 تنها در هشت سویه یافت شد. در این مطالعه نشان داده شد که فراوانی آلل s1 در مقایسه با آلل s2 در سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* جداشده از افراد مبتلا به سرطان معده و سایر بیماری‌های گوارشی (گاستریت و زخم معده) ارتباط معناداری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

بحث

ارتباط بین آلل‌های s1 و m1 با بیماری‌های گوارشی در سایر کشورها در بسیاری از مطالعات قبلی به اثبات رسیده است. در مطالعه Cavalcante ژنوتیپ‌های *vacA* را در ۱۳۴ بیمار آلوده به *هلیکوباکترپیلوری* در ناحیه شمال شرق برزیل که از نواحی بسیار سرطان‌خیز در این کشور است مورد مطالعه قرار گرفت. این بیماران مبتلا به زخم‌های گوارشی، سرطان معده و التهاب معده بودند. s1m1 به‌عنوان ژنوتیپ غالب در این بیماران شناخته شد و آلل s1 بیش‌ترین فراوانی را در بیماران با وضعیت حاد گوارشی داشت (P=۰/۰۳).[۷] هم‌چنین در مطالعه Boukhris، s1m1 با زخم‌های گوارشی و s2m2 با گاستریت ارتباط معناداری نشان داده است.[۸]

اما در این مطالعه هیچ تفاوت معناداری در فراوانی آلل s1 در بین بیماران مختلف ایرانی یافت نشد. این موضوع نشان‌دهنده این امر است که آلل s1 به‌تنهایی نمی‌تواند نقش تعیین‌کننده در ایجاد بیماری‌های گوارشی در ایران داشته باشد و احتمال دارد که نقش بیماری‌زایی s1 وقتی بروز پیدا کند که در کنار سایر آلل‌های بیماری‌زای این ژن قرار گیرد به‌هرحال به‌نظر می‌رسد این آلل به‌تنهایی نقشی در ایجاد بیماری در ایران ندارد. پیشنهاد می‌شود که ترکیبات آللی که شامل ژن *vacA* s1 با سایر نواحی بیماری‌زای این ژن ازجمله ناحیه m1، i1 و d1 مورد مطالعه و ارتباط این ترکیبات آللی با بیماری‌های گوارشی بررسی شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تیپ‌بندی آلل‌های ژن *vacA* *هلیکوباکترپیلوری* از مناطق جغرافیایی مختلف در ایران" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۱ و کد ۲۱۲۰۷۹۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شده است.

References

1. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, et al. Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994;179 (5):1653-58.
2. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270(30):17771-7.
3. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, et al. Expanding allelic diversity of Helicobacter pylori vacA. *J Clin Microbiol* 1998;36(9):2597-603.
4. Czajkowsky DM, Iwamoto H, Szabo G, Cover TL, Shao Z. Mimicry of a host anion channel by a Helicobacter pylori pore-forming toxin. *Biophys J* 2005;89(5):3093-101.
5. S Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based cancer registry from Iran. *Int J Cancer* 2003;107 (1):113-8.
6. Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, et al. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. *J Clin Pathol* 2004;57(1):37-42.
7. Cavalcante MQ, Silva CI, Braga-Neto MB, Fialho AB, Nunes Fialho A, Barbosa AM, et al. Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107(4):561-3.
8. Alaoui Boukhris S, Benajah DA, El Rhazi K, Ibrahimi SA, Nejjari C, Amarti A, et al. Prevalence and distribution of Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes in the Moroccan population with gastric disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(8):1775-81.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:43 IRST on Tuesday November 12th 2019

Relationship between s alleles of *vacA* gene of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases in Iran: *a brief report*

Saeid Latifi-Navid Ph.D.
Shiva Mohammadi M.Sc.*
Saber Zahri Ph.D.

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Received: 05 Jun. 2013 Accepted: 23 Oct. 2013 Available online: 01 Jan. 2014

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* has been classified as the class I carcinogenic agent by world health organization. Colonization of the human stomach with *H. pylori* is a risk factor for gastroduodenal diseases. The secreted *vacA* toxin is an important *H. pylori* virulence factor that causes multiple alterations in gastric epithelial cells and T cells. Several families of *vacA* alleles have been described, and *H. pylori* strains containing certain *vacA* types (s1 and m1) are associated with an increased risk of gastric disease, compared to strains containing other *vacA* types (s2 and m2). We examined the association between *H. pylori vacA s* alleles and gastroduodenal diseases in Iran.

Methods: A total of 149 *H. pylori* strains were obtained from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer referring to endoscopy units of several cities in Iran. Biopsy culture and DNA extraction were performed and the frequency of *vacA s* alleles was investigated by using PCR amplification. Linear regression and binary logistic regression models were used to analyze the association between *vacA* (vacuolating cytotoxin A) *s* alleles and gastroduodenal diseases.

Results: There was no significant association between the frequency of *vacA s* alleles and gastroduodenal diseases (gastritis or peptic ulcer disease and gastric adenocarcinoma ($P > 0.05$)).

Conclusion: It is proposed that the *H. pylori vacA s1* genotype could not be considered as an important determinant of gastroduodenal diseases in Iranian population and probably if s1 allele is associated with other virulence alleles of this gene, it will cause diseases.

Keywords: gastric cancer, *Helicobacter pylori*, peptic ulcer disease, *vacA* s alleles.

* Corresponding author: Pardis St., Pamchal Blvd., Kermanshah, Iran. Postal Code: 6719736547
Tel: +98-831-7247673
E-mail: shivamohamadi66@yahoo.com