مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان /دوره هجدهم/تابستان ۱۳۹۲/ ۱۲۰-۱۱۴

بررسی فراوانی ژن کد کننده ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک در ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری

زهرا پاکباز[۱]، محمدحسن شیرازی[۲]، محمدرضا پورمند[۳]، رضا رنجبر[۴]، مصطفی حسینی[۵]، زیبا ویسی ملک شاهی[۶]، سارا حاجی خانی[۷]

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲. دانشیار گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (مولف مسوول) تلفن ثابت: ۸۸۹۵۳۰۲۱-۰۲۱

mhshirazi@tums.ac.ir

۳. دانشیار گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴. دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج، تهران، ایران.

۵. استاد گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۶. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، تهران، ایران.

۷. کارشناس میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک یکی از مهمترین عوامل اتصال هلیکوباکتر پیلوری به سلول‌های اپی تلیال معده به شمار می آید. میزان فراوانی این ژن در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت است. هدف از این مطالعه ارزیابی فراوانی ژن کد کننده ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک در ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماری های گوارشی مختلف می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی می باشد و تعداد ۱۲۰ بیماران دچار اختلالات گوارشی وارد مطالعه شدند. از هر بیمار دو نمونه بیوپسی (یک نمونه به منظور انجام تست اوره از سریع و یک نمونه به منظور استخراج DNA) گرفته شد. آلودگی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه ها با استفاده از آزمون اوره از سریع و PCR ژن *ureA* مورد بررسی قرار گرفت. سپس در نمونه های دارای آلودگی هلیکوباکتر پیلوری حضور ژن *کد کننده ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن بررسی شد.

یافته ها: از ۱۲۰ نمونه مورد بررسی، آلودگی هلیکوباکتر پیلوری در ۸۲ نمونه تأیید گردید. از بین این ۸۲ نمونه، ۶۴ نمونه (۷۸٪) از نظر ژن *کد کننده ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک* مثبت بودند. فراوانی این ژن در نمونه های مختلف کلینکی به ترتیب برابر با ۸۴/۶٪ در نمونه های مربوط به سرطان معده، ۸۶/۷٪ در نمونه های مربوط به زخم معده، ۷۷/۸٪ در نمونه های مربوط به زخم دئودنال و ۷۲/۲٪ در نمونه های مربوط به گاستریت بود.

نتیجه گیری: ژن *کد کننده ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک* در نمونه های متفاوت کلینیکی، تقریباً از فراوانی یکسانی برخوردار بود. علت تفاوت فراوانی این ژن در مطالعات مختلف می تواند ناشی از تفاوت در تنوع جغرافیایی یا استفاده از پرایمرهای مختلف جهت ردیابی این ژن باشد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک، بیماری های گوارشی.

وصول مقاله :۹۱/۱/۱۷ اصلاحیه نهایی:۹۱/۶/۲۶ پذیرش:۹۱/۷/۵

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-08-14]

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری، باکتری گرم منفی، کند رشد و میکروآئروفیل است که منجر به ایجاد طیف متنوعی از بیماری‌ها از گاستریت ساده تا زخم معده، لنفوما و سرطان معده می شود. میزان عفونت ایجاد شده توسط هلیکوباکترپیلوری در جهان به طور میانگین در حدود ۵۰ درصد می باشد. با این حال میزان شیوع عفونت با این باکتری در کشورهای آسیایی بالاتر و در حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد می باشد. در ایران نیز عفونت ناشی از هلیکوباکترپیلوری از آمار بالایی برخوردار است (۴-۱).

مطالعات متعددی نشان داده است که فاکتورهای مربوط به میزبان و باکتری، هر دو در تعیین عواقب کلینیکی و پاتولوژیکی ایجاد شده توسط باکتری نقش دارند. در میان فاکتورهای باکتریایی، فاکتورهای اتصالی به علت شروع کلونیزاسیون و راه اندازی پاسخ های التهابی میزبان نقش حیاتی دارند (۶و۵). در حدود ۱۲۰ ادهسین در هلیکوباکترپیلوری شناخته شده اند. در مورد اینکه کدام ادهسین نقش مهم تری در بیماری زایی هلیکوباکتر پیلوری دارد اتفاق نظر وجود ندارد. اما با توجه به طیف محدود میزبان، تعداد زیاد ادهسین‌ها احتمالاً بیانگر اهمیت آنها برای باکتری است (۷).

ادهسین متصل شونده به اسید سیالیک (*SabA*) یکی از ادهزین‌های مهم هلیکوباکترپیلوری است که در شروع کلونیزاسیون این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد. گیرنده این ادهزین بر روی سلول‌های اپی تلیال sialyl-Lewis x/a antigens (sLex and sLea) می‌باشد (۸).

مطالعات اخیر در جوامع اروپایی نشان داده است که *sabA* ممکن است با افزایش پاتوژنیسیته هلیکوباکتر پیلوری در اپی‌تلیوم معده ارتباط داشته باشد. با این وجود مطالعات قبلی مشخص کرده است که نوع این ارتباط در جوامع مختلف متفاوت است (۱۰و۹) با توجه به آمار بالای آلودگی توسط این باکتری محققین کشورهای مختلف جهان تلاش برای شناسایی دقیق تمام فاکتورهای ویرولانس هلیکوباکترپیلوری و مهار آلودگی و یافتن راهکار دقیق شناسایی سویه‌های با خطر بالا را در دستور کار خود قرار داده اند. با توجه به اینکه اطلاعاتی در مورد میزان شیوع ژن *sabA* در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران گوارشی در ایران در دسترس نمی باشد. لذا بر آن شدیم که فراوانی این ژن را در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری و ارتباط آن را با بیماری های گاسترودئودنال به منظور غربالگری بیماران در معرض خطر بالا بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی می باشد.

جمعیت مورد مطالعه تعداد ۱۲۰ بیمار با اختلال گوارشی مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان فیروزگر تهران در سال ۱۳۹۰ بود. بیمارانی که در طی سه ماه قبل از نمونه‌گیری درمان آنتی بیوتیکی دریافت کرده بودند، از مطالعه حذف شدند. لازم به ذکر است که قبل از انجام آندوسکوپی از بیماران رضایت نامه کتبی جهت اخذ نمونه گرفته شد.

از هر بیمار دو نمونه بیوپسی از قسمت آنتروم معده جدا شد. بلافاصله بعد از نمونه گیری یکی از نمونه ها جهت انجام آزمون اوره از سریع در میکروتیوپ حاوی اوره ۱۰درصد + فنل قرار داده شد. در صورتی که نمونه مورد نظر بلافاصله بعد از قرارگیری در محیط اوره تا ۲۴ ساعت بعد ازآن باعث تغییر رنگ محیط اوره (از رنگ زرد به ارغوانی) می شد، به عنوان نمونه اوره از مثبت تلقی می گردید. یکی دیگر از نمونه ها جهت استخراج DNA در میکروتیوپ حاوی نرمال سالین استریل قرار داده شد که بعد از انتقال به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-08-14]

آزمایشگاه تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

استخراج DNA مستقیماً از روی نمونه بیوپسی انجام گرفت. برای این منظور، از کیت DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) استفاده شد. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد. نمونه هایی که آزمون اوره از سریع مثبت داشتند و دارای باند اختصاصی برای ژن حفاظت شده *ureA* بودند به عنوان نمونه های دارای هلیکوباکترپیلوری در نظر گرفته شدند.

PCR **جهت شناسایی ژن *ureA* و *sabA*:** ابتدا جهت تأیید حضور هلیکوباکتر پیلوری از تکثیر بخشی از ژن محافظت شده ژن *ureA* استفاده شد. نمونه های دارای ژن *ureA* محصولی با اندازه ۴۱۱ جفت باز را تکثیر می کنند. در مرحله بعد جهت تعیین حضور ژن *sabA* از یک جفت پرایمر که قادر به تکثیر قطعه ای با اندازه ۱۳۳۰ جفت باز بود استفاده گردید. توالی پرایمرها برای ژن *ureA* و *sabA* به ترتیب عبارتند از:

ژن *ureA* (۱۱)

*ureA*F 5'-CCCAATGGTAAATTAGTT-3'
*ureA*R 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'

ژن *sabA*

*sabA*F 5'-CGCTAGTGTCCAGGGTAAC- 3'
*sabA*R 5'-CGCGCTGTAAGGGTTATTA-3'

جهت انجام PCR یک حجم ۵۰ میکرولیتری شامل ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲۵ میکرولیتر HotStarTaq Master Mix Kit، ۴ میکرولیتر پرایمر (Forwardand Reverse primer) (400ng) و ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده استفاده گردید.

برنامه مورد استفاده برای ژن *ureA* و *sabA* عبارت بود از: یک دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه اولیه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی شامل: سیکل ۹۵ درجه برای ۱ دقیقه، ۴۵ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه و در نهایت یک دمای ۷۲درجه برای ۱۰ دقیقه.

آنالیز محصولات PCR در ژل الکتروفورز ۱ درصد آگاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. داده ها در نرم افزار SPSS v19 وارد گردید و با استفاده از آزمون آماری مجذور کای (x^2) مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

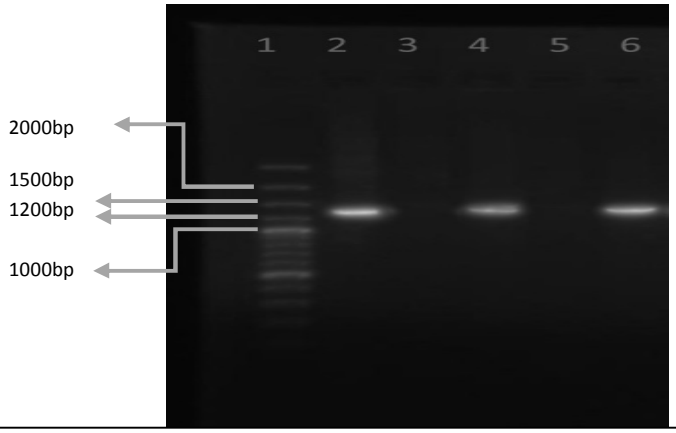
یافته ها

در این مطالعه ۱۲۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند که ۷۲ نفر مرد و ۴۸ نفر زن بودند و میانگین سنی آنها ۴۶ سال بود. در بین این تعداد نمونه، آلودگی هلیکوباکتر پیلوری در ۸۲ نمونه (۱۳ نمونه سرطان معده، ۱۸ نمونه زخم دئودنال، ۱۵ نمونه زخم معده و ۳۶ نمونه گاستریت) تشخیص داده شد و ۳۸ نمونه به عنوان نمونه های فاقد هلیکوباکتر پیلوری، از مطالعه خارج شدند.

سپس حضور ژن *sabA* در ایزوله‌های کلینیکی ۸۲ بیمار گوارشی مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش PCR بررسی شد. در صورت حضور این ژن قطعه ای به طول ۱۳۳۰ جفت باز تکثیر می شد (شکل ۱). به طور کلی، ژن *sabA* در ۶۴ نمونه (۷۸٪) مشخص گردید. فراوانی ژن *sabA* برحسب وضعیت بالینی بیماران در جدول ۱ آمده است.

ژن *sabA* در گروه‌های مختلف بیماری های گوارشی ناشی از هلیکوباکترپیلوری تقریباً از فراوانی یکسانی برخوردار بود. ارتباط حضور ژن *sabA* با وضعیت بالینی بیماران مورد بررسی قرار گرفت که ارتباط معنی داری بین این ژنوتیپ و نوع بیماری کلینیکی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-08-14]



شکل ۱: تصویر الکتروفورز ژل آگارز محصول ۱۳۳۰bp ژن *sabA*
چاهک ۱: مارکر 100bp، چاهک ۲و ۳: به ترتیب کنترل مثبت و منفی، چاهک۴و ۶: نمونه های دارای این قطعه ژنی، چاهک ۵: نمونه فاقد این قطعه ژنی

جدول۱- فراوانی ژن *کد کننده ادهسین متصل شونده به سیالیک اسید* در نمونه های هلیکوباکترپیلوری

ژن *sabA*	وضعیت بالینی			
	سرطان معده	زخم معده	زخم دئودنال	گاستریت
مثبت	۱۱ (٪۸۴/۶)	۱۳ (٪۸۶/۷)	۱۴ (٪۷۷/۸)	۲۶ (٪۷۲/۲)
منفی	۲ (٪۱۵/۴)	۲ (٪۱۴/۳)	۴ (٪۲۳/۲)	۱۰ (٪۲۸/۸)
جمع	۱۳	۱۵	۱۸	۳۶

P=0.47

بحث

هلیکوباکتر پیلوری از عوامل مهم اتیولوژیک بیماری‌های گوارشی شناخته شده می باشد. با وجود اینکه تعداد زیادی از افراد به این ارگانیسم آلوده می شوند اما تنها ۱۵ درصد از این افراد به انواع بیماری های گوارشی مبتلا می شوند. با توجه به آمار بالای آلودگی توسط این باکتری محققین در کشورهای مختلف جهان تلاش برای شناسایی دقیق تمام فاکتورهای ویرولانس هلیکوباکتر پیلوری و مهار آلودگی و یافتن راه‌های جدید و درمان بعد از آلودگی را در دستور کار خود قرار داده اند (۱۲). عوامل ویرولانس متعددی در هلیکوباکتر پیلوری معرفی شده اند اما ادهسین های این باکتری مانند BabA, iceA, alpA, SabA و SabB همواره مورد توجه بوده اند (۱۳). بعد از شناسایی sialyl-Lewis x/a antigens) sLex and sLea) به عنوان یکی دیگر از گیرنده های هلیکوباکتر پیلوری، مشخص شد که یکسری از پروتئین های غشای خارجی با وزن ۷۰ کیلو

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-08-14]

دالتون قادر است به این گیرنده متصل شود، این پروتئین *sabA* نامیده شد. با این وجود تمام سویه های هلیکوباکترپیلوری دارای ژن کد کننده این آنتی ژن نمی‌باشند و به علاوه تمام سویه هایی که این ژن را دارند نیز پروتئین عملکردی را تولید نمی کنند (۱۴و۱۰و۸). ژن *sabA* در کشورهای مختلف دارای فراوانی های متفاوتی است و مطالعه ارتباط این ژن با نوع بیماری کلینیکی و تشخیص پاتولوژی نیز در کشورهای مختلف نتایج متفاوتی را نشان داده است.

این مطالعه به بررسی حضور ژن *sabA* پرداخته است و ارزش این ژن را به منظور غربالگری بیماران در معرض خطر بالا مورد بررسی قرار داده است. در صورت حضور ژن *sabA* محصول PCR با اندازه ۱۳۳۰جفت باز تکثیر می‌شد. بررسی حضور ژن *sabA* در بیماران مورد بررسی نشان داد که ۷۸ درصد از افراد دچار بیماری های گوارشی این ژن را حمل می کنند. ژن *sabA* در سویه های هلکیوباکتر پیلوری ایرانی در مقایسه با کشورهای فرانسه (۸۶٪) و هلند (۹۳٪) و ژاپن (۹۱/۳٪) از فراوانی کمتری برخوردار بود (۱۷-۱۵) ولی فراوانی مشابهی با مطالعه انجام شده در تایوان (۸۰٪) نشان داد (۱۸). اختلاف فراوانی ژن *sabA* در این مطالعه و سایر مطالعات درکشورهای دیگر را می توان به اختلاف جغرافیایی یا استفاده از پرایمرهای متفاوت برای ردیابی این ژن مرتبط دانست.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن *sabA* در نمونه های مختلف کلینکی به ترتیب برابر بود با ۸۴/۶٪ در نمونه های مربوط به سرطان معده، ۸۶/۷٪ در نمونه های مربوط به زخم معده، ۷۷/۸٪ در نمونه های مربوط به زخم دئودنال و ۷۲/۲٪ در نمونه های مربوط به گاستریت. در این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین حضور این ژن و اشکال مختلف بیماری گوارشی (گاستریت، زخم معده، زخم دئودنال، سرطان معده) مشاهده نگردید که از این نظر مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده در تایوان و ژاپن مطابقت دارد (۱۸و۱۷). با این حال مطالعه انجام شده در آمریکا فراوانی ژن *sabA* را در بیماری گاستریت ۶۶٪، در زخم دئودنال ۴۴٪ و در سرطان معده ۷۰ ٪ گزارش داد و ارتباط معنی داری بین حضور ژن *sabA* و سرطان معده در این مطالعه نشان داده شد (۱۹). علت این تفاوت مشاهده شده درخصوص ارتباط ژن *sabA* با نوع بیماری گوارشی در مطالعات مختلف می تواند ناشی از این واقعیت باشد که در ایجاد شکل نهایی بیماری ناشی از هلیکوباکتر پیلوری علاوه بر فاکتور های ویرولانس، سایر عوامل مانند ژنتیک میزبان و فاکتورهای محیطی نیز نقش دارند.

در مطالعه حاضر، ژن *sabA* در نمونه های مختلف کلینیکی تقریباً از فراوانی مشابهی برخوردار بوده است که ارزش ردیابی این ژن را به منظور غربالگری انواع مختلف بیماری گوارشی زیر سوال می برد.

نتیجه گیری

اختلاف بدست آمده از فراوانی ژن *sabA* در مناطق مختلف دنیا می تواند ناشی از تفاوت در تنوع جغرافیایی و یا استفاده از پرایمرهای مختلف برای ردیابی این ژن باشد. مطالعات بیشتر به منظور دستیابی به فراوانی دقیق تر این ژن در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران ایرانی و تعیین دقیق ارتباط این ژن با نوع بیماری در چند منطقه دیگر ایران و با استفاده از روش‌های دیگر توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات پزشکان و پرستان محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان فیروزگر تهران که در تهیه نمونه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-08-14]

References

1. Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. ASM News 1995, 61: 21–6.
2. Bittencourt PFS, Rocha GA, Penna FJ, Queiroz DMM. Gastroduodenal peptic ulcer and Helicobacter pylori infection in children and adolescents. J Pediatr (Rio J) 2006; 82: 325-34.
3. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter 2004; 9 :1-6
4. Nassrolahei M, Khalilian A. Seropositivity of antibodies against Helicobacter pylori and hepatitis A virus in Iran. Ann Saudi Med 2004; 24: 61-4.
5. Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JI, Sobala G, Rathbone BG, Axon AT, and et al. Bacterial adhesion and disease activity in Helicobacter-associated chronic gastritis. Gut 1990; 31: 134–38.
6. Covacci A, Telfod JL, Parsonnet GJ, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science 1999; 284: 1328-33.
7. Doig P, Trust TJ. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of Helicobacter pylori. Infect Immun 1994; 62:4526-33
8. Aspholm M, Olfat FO, Norde´n J, Sonde´n B, Lundberg C, Sjo R,and et al. SabA is the H. pylori hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. PLoS Pathogens. 2006; 2: e110.
9. Yamaoka Y. Increasing evidence of the role of Helicobacter pylori SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. J Infect Developing Countries 2008; 2: 174-81.
10. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, and et al. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science 2002;297: 573-8.
11. Podzorski RP, Podzorski DS, Wuerth A, Tolia V. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in Helicobacter pylori from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. Diag Microbiol Inf ect Dis 2003;46: 83-8.
12. Makola D, Peura D, Crowe S. Helicobacter pylori infection and related gastrointestinal diseases. J Clin Gastroenterol 2007; 41: 548-58.
13. Erzin Y, Koksal V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, and et al. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. Helicobacter 2006;11:574-80.
14. Ota H, Nakayama J, Momose M, Hayama M, Akamatsu T, Katsuyama T, and et al. Helicobacter pylori infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. Virchows Arch 1998; 433: 419-26.
15. Lehours P, Menard A, Dupouy S, Bergey B, Richy F, Zerbib F, and et al. Evaluation of the association of nine Helicobacter pylori virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Infect Immun 2004;72: 880-88.
16. de Jonge R, Pot RG, Loffeld RJ, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. The functional status of the Helicobacter pylori sabB adhesin gene as a putative marker for disease outcome. Helicobacter 2004; 9: 158-164.
17. Shao L, Takeda H, Fukui T, Mabe K, Han J, Kawata S, and et al. Genetic diversity of the Helicobacter pylori sialic acid-binding adhesin (sabA) gene. Bio Science Trends 2010;4: 249-53.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-08-14]

18. Sheu BS, Odenbreit S, Hung KH, Liu CP, Sheu SM, Yang HB, and et al. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and H. pylori SabA enhances H. pylori density in patients lacking gastric Lewis B antigen. Am J Gastroenterol 2006;101: 36-44.
19. Yamaoka Y, Fujimoto O, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, Zimaity HM, and et al. Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease. Helicobacter 2006; 55: 775–81.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-08-14]