جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۳ ، پاییز ۱۳۸۵
صفحات: ۲۶۱ - ۲۶۶

بررسی ارتباط ژن cagA در هلیکوباکترپیلوری و یافته‌های آندوسکوپی

لیلی شکوهی‌زاده[?] M.Sc. ، اشرف محبتی‌مبارز* Ph.D. ، مجید صادقی‌زاده** Ph.D. ،
محسن امینی*** M.D.

چکیـده

هدف: مطالعه تعیین میزان شیوع سویه‌های cagA+ هلیکوباکترپیلوری و بررسی ارتباط آن با یافته‌های آندوسکوپی می‌باشد.

روش بررسی: از ۱۵۲ نمونه بیوپسی در بخش آندوسکوپی بیمارستان بقیه ا... تهران، ابتدا با استفاده از روش اوره آز سریع ۵۴ مورد ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری تشخیص داده شد. سپس با روش PCR با استفاده از پرایمر ژن ureC ، نتایج مورد تایید قرار گرفت. با طراحی پرایمر جهت تشخیص ژن cagA ، سویه‌های cagA- وcagA+ شناسایی شدند و یافته‌های آندوسکوپیک در این سویه‌ها مقایسه گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه میزان شیوع cagA در مراجعین بخش آندوسکوپی بیمارستان بقیه ا... تهران ۳۵/۱۸٪ بود. میزان التهاب آتروفیک معده، زخم معده، زخم اثنی عشر، تغییر شکل اثنی‌عشر در سویه‌های cagA+ بیشتر از سویه‌های cagA- بود و شدت التهاب مری با وجود ژنcagA نسبت معکوس داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع فراوان عفونت هلیکوباکترپیلوری و عواقب خطرناک آن، می‌توان با استفاده از روش PCR بر مبنای دو ژن CagA و ureC اقدام به تشخیص سریع این باکتری از نمونه‌های کلینیکی نمود.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، اوره آز، بیوپسی معده، زخم معده، زخم اثنی‌عشر، التهاب مری، PCR, ureC, cagA .

مقـدمـه

با کشف باکتری هلیکوباکترپیلوری توسط دکتر مارشال و دکتر وارن در سال ۱۹۸۲، تحول عظیمی در شناخت بیماریهای دستگاه گوارش به وجود آمد. متعاقب بررسیهای انجام شده، مشخص گردید که این باکتری عامل ایجاد گاستریت، زخم معده و زخم اثنی‌عشر می‌باشد که این عوارض در صورت عدم درمان مناسب ممکن است به سرطان معده منجر شوند (۱).

در مطالعات مختلف مشخص شده که تمام افراد آلوده به هلیکوباکترپیلوری به زخم معده مبتلا نمی‌شوند و در واقع برخی افراد علایم گوارشی شدیدتری از خود بروز می‌دهند. مشخص

دریافت مقاله: ۸۴/۷/۱۹، اصلاح مقاله: ۸۵/۸/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۵/۸/۲۴

? کارشناس ارشد گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ـایران
* گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس
** گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس
*** گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌اله(عج)
آدرس پست الکترونیکی: ShokohizadehL@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گردیده است که ۵۰ تا ۶۰ درصد از سویه های هلیکوباکترپیلوری یک پروتئین ۱۲۸کیلو دالتونی به نام CagA را تولید می‌کنند که این پروتئین توسط ژن cagA کد می‌شود. همچنین بررسی‌های مختلف نشان داده است که سویه‌های دارای این ژن (+cagA) از قدرت بیماریزایی بیشتری برخوردار هستند و با علایم بالینی از قبیل آتروفی و زخم معده و زخم اثنی‌عشر و سرطان معده مرتبطند (۲). پروتئین CagA دارای اعمال و اثرات مختلفی است که شامل موارد زیر می‌باشد:

۱. سویه های +cagA باعث القای سیتوتوکسی‌سیتی بیشتری نسبت به سویه‌های -cagA می‌شوند (۳).

۲. سویه های+cagA می‌توانند باعث تولید IL-8 شوند که به نظر می‌رسد در تداوم زخمهای پپتیک نقش دارد (۴).

۳. پروتئین CagA یک پروتئین ایمونوژنیک است و به عنوان یک نامزد مناسب جهت طراحی واکسن مطرح می‌باشد (۵).

۴. پروتئین CagA پس از ورود به سلول میزبان باعث تغییرات ساختاری اکتین و اختلال در سیکل سلولی، القای بیان انکوژنهای c-fos و c-jun و در نهایت آسیب سلولی می‌شود و خطر ایجاد سرطان معده را افزایش می‌دهد (۶،۷).

۵. در برخی از مطالعات مشخص شده است که سویه‌های +cagA باعث مرگ سلولهای سرطانی مری می‌شوند که در مورد این اثر بحث و بررسیهای مختلفی بین دانشمندان وجود دارد. در سویه های +cagA التهاب معده باعث کاهش ترشح اسید معده و جلوگیری از بازگشت اسید به معده می‌شود و در نتیجه بروز Barrett's esophagus (بارت ازوفاگوس: متاپلازی سلولهای اپی تلیال جدار مری در اثر بازگشت اسید معده به مری) و GERD (Gastro-Esophageal Reflux Disease بیماریهای مرتبط با بازگشت اسید معده به مری)کاهش می‌یابد (۸،۹).

۶. علاوه‌بر پروتئین CagA، هلیکوباکترپیلوری دارای فاکتورهای ویرولانس متعددی است نظیر پروتئین VacA که توسط ژن vacA کد می‌شود و این ژن دارای آللهای مختلف و قدرت توکسی‌سیتی متفاوت می‌باشد و باعث واکوئل زایی در سلول، القای مرگ برنامه‌ریزی شده، بروز التهاب آتروفیک و در نتیجه سرطان‌زایی می‌شود. فاکتورهای دیگر مانند CagE و IceA و... نیز در بروز التهاب نقش دارند. همچنین مشخص گردیده است که همراهی هر کدام از این عوامل به همراه CagA باعث ایجاد تفاوت در پاسخهای میزبان می‌شود (۱۰).

با توجه به دلایل ذکر شده در مورد اهمیت CagA، تشخیص سریع و دقیق عفونت هلیکوباکترپیلوری و شناسایی سویه‌های پاتوژن آن جهت تعیین پیش‌آگهی بیماری و اقدام برای درمان ضروری به نظر می‌رسد.

روش بررسی

نمونه برداری . در مورد جامعه مورد مطالعه، انتخاب مطرح نبوده، از تمام کسانی که به صورت سرپایی یا بستری در بیمارستان از جانب پزشک دستور انجام آندوسکوپی داشته و به بخش آندوسکوپی بیمارستان بقیه ا... (عج) مراجعه کرده بودند، با رضایت بیمار از ناحیه آنتر معده دو نمونه بیوپسی جهت انجام تست اوره آز سریع و انجام PCR تهیه گردید. افراد مورد مطالعه از انجام تحقیق مطلع بودند و نتایج نهایی آزمایشگاهی در اختیار پزشک قرار می‌گرفت.

تهیه پرسشنامه . در مورد جنسیت، سن و یافته‌های آندوسکوپی مراجعه کنندگان پرسشنامه‌ای تهیه گردید که پرسشنامه پیوست می‌باشد. (علاوه بر تهران از نقاط مختلف ایران به این بخش مراجعه می‌شد).

تست اوره آز سریع . در این روش قطعه‌ای از بیوپسی معده در محیط اوره آز قرار داده شد که تغییر رنگ محیط از زرد به ارغوانی در نتیجه تجزیه اوره توسط آنزیم اوره آز باکتری دلیل بر حضور هلیکوباکترپیلوری می‌باشد. در این تحقیق از ویالهای محیط اوره که به صورت تجاری تهیه شده، استفاده گردید و در مدت کمتر از یک ساعت نتیجه آزمایش مشخص می‌شد.

استخراج DNA . از قطعه دیگر بیوپسی معده که نتیجه تست اوره آز سریع آن مثبت شد، جهت انجام PCR به روش فنل-کلروفورم –ایزوامیل الکل، DNA استخراج گردید و از نظر کیفی (الکتروفورز بر روی ژل اگارز ۱٪) و کمی (روش اسپکتروفتومتری) DNA استخراج شده، مورد بررسی قرار گرفت. در روش اسپکتروفتومتری از نمونه DNA رقت ۱/۵۰ تهیه شد و با استفاده

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

از دستگاه فتومتر در طول موج ۲۶۰nm، غلظت DNA و در طول موج ۲۸۰nm غلظت پروتئین اندازه‌گیری شد و با استفاده از نسبت ۲۶۰/۲۸۰ میزان خلوص DNA مشخص گردید (هر چه این مقدار به ۱/۸ نزدیکتر باشد، میزان ناخالصی DNA کمتر خواهد بود).

پرایمرها . به منظور تأیید وجود DNA هلیکوباکترپیلوری، از پرایمر اختصاصی ژن ureC (glmM) (سفارش به شرکت بیوتک آلمان) و برای تعیین حضور ژن cagA، از پرایمر اختصاصی این ژن (سفارش به شرکت بیونیر کره جنوبی) در روش PCR استفاده گردید و پرایمرها با مطالعه مقالات مختلف و برنامه Blast طراحی و تایید شد.

توالی نوکلئوتیدی پرایمر ژن ureC .

D008 5′-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3′

R008 5′-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3′

طول قطعه تکثیر شده: ۲۹۴bps

توالی نوکلئوتیدی پرایمر ژن cagA:

glf 5′-ATAATGCTAAATTAGACAACTTGAGCGA-3′

glr 5′-TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3′

طول قطعه تکثیر شده: ۲۹۷bps

شرایط انجام PCR .

(5µl) بافر PCR۱۰X ، (100 mM)=1µl مخلوط dNTP، (25 pmol)=1µl ،mgcl2(250 mM)= 2.5 µl پرایمر (۱) (25 pmol)=1µ l، پرایمر (۲) (25 pmol)=1µl، Taq enzyme(3 unit)، (100-450 ng)=10 µl نمونه DNA استخراج شده، (28µl) آب مقطر دیونیزه استریل. از DNA سویه استاندارد (ATCC 49503) به عنوان کنترل مثبت و از نمونه فاقد DNA به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر با شرایط زیر تنظیم گردید.

دناتوراسیون اولیه (94C° 5min)، دناتوراسیون ثانویه (93C° 1min)، اتصال (cagA=55 C°, ureC=50C°1min)، تکثیر (72C° 1min)، تکثیر نهایی (75C° 1min) در ۳۸ سیکل. پس از اتمام کار نمونه‌ها به ۲۰- درجه منتقل شدند. سپس با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و شناساگر 1 kbp و با مشاهده باندهای ۲۹۴bps و۲۹۷ bps حضور ژنهای ureC و cagA تشخیص داده شد.

یافته‌ها

استخراج DNA . طیف OD خوانده شده (۲۶۰/۲۸۰) بین ۱/۵ تا ۲ و طیف غلظت DNA بین ۱۰۰ تا ۴۵۰ نانوگرم در هر واکنش بود. تست اوره آز سریع: در این روش از ۱۵۲ مورد نمونه بیوپسی، ۳۵/۵ درصد (۵۴ مورد) تست اوره آز مثبت گزارش گردید (نمودار ۱).

PCR بر مبنای ژن ureC . در این روش تمام سویه‌های اوره آز مثبت، دارای ژن ureC بودند و بدین ترتیب وجود DNA هلیکوباکترپیلوری مورد تایید قرار گرفت.

PCR بر مبنای ژن cagA . از ۵۴ نمونه ۱۹ مورد (۳۵/۱۸٪) دارای ژن cagA بودند.

یافته‌های آندوسکوپی . نتایج به دست آمده از وضعیت سن و جنس و مشاهدات آندوسکوپی در سویه‌های cagA+ و cagA- در جدول ۱ آورده شده است. میزان زخم و التهاب معده و زخم اثنی‌عشر در سویه‌های cagA+ بیشتر و میزان التهاب مری و درجات شدید لزیونهای ایجاد شده در مری کمتر از سویه‌های cagA- می‌باشد.

جدول ۱. مقایسه وضعیت سن و جنس و یافته‌های آندوسکوپی مراجعین در نمونه‌های cagA+ و cagA-

* ضایعات ایجاد شده در مخاط مری به ترتیب شدت از درجه A (Grade) تا D تقسیم شده‌اند.

	cagA مثبت (٪)	*cagA* منفی (٪)
فراوانی جنس (زن/مرد)	۱۱/۸	۱۲/۲۳
میانگین سن	۴۲	۳۶
التهاب مری	۲۶/۳	۳۴/۲
* ضایعه مری با درجه A	۱۵/۷	۱۷
* ضایعه مری با درجه B	۱۰/۴	۱۱/۶
* ضایعه مری با درجه C	۰	۲/۹
* ضایعه مری با درجه D	۰	۲/۹
آتروفی مخاط معده	۱۰/۵	۲/۹
زخم ناحیه آنتر معده	۵/۲	۰
زخم اثنی عشر	۲۶/۳	۵/۷
تغییر شکل ناحیه ابتدایی اثنی‌عشر	۲۶/۳	۱۴

بحـــث

در بخـش آندوسـکوپی بیمارسـتان از تـست آوره آز سـریع جهـت تشخیص اولیه ابتلا به عفونت ناشی از هلیکوباکترپیلوری اسـتفاده می‌شود. این روش از نظر سرعت انجام آن و قیمت روش مناسـبی است. اما طبق بررسیهای انجـام شـده نـسبت بـه سـایر روشـهای تشخیصی از جملـه کـشت و PCR و هیـستولوژی از حـساسیت و ویژگی پایینتری برخوردار است. در این تحقیق فقط از نمونـه‌هـای اوره آز مثبت به منظور غربالگری اولیه و چند نمونـه منفـی جهـت تایید کار استفاده گردید (۱۲،۱۱).

جهت تایید وجود DNA هلیکوبـاکترپیلوری از روش PCR بر مبنای تشخیص ژن ureC استفاده گردیـد. در طـی بررسـیهای مختلف معلوم گردید که این ژن، نسبت به سـایر ژنهـایی کـه بـه عنوان هدف در تـشخیص عفونـت هلیکوبـاکترپیلوری مـورد نظـر هستند، در سطح بسیار بـالایی در سـویه‌هـای هلیکوبـاکترپیلوری حفاظت شده (conserved) است. با تعیین سـکانس ایـن ژن بـه روش PCR در نمونه‌های بیوپـسی مـشخص شـد کـه حـساسیت PCR بستگی به طول قطعه تکثیر شده دارد و هر انـدازه کـه ایـن ناحیه کوچکتر باشد، نتایج بهتری به دست می‌آید. در ایـن تحقیـق پرایمر اختصاصی ژن ureC به طول ۲۹۴bp به کـار رفـت کـه بـا استفاده از این قطعه کوتاه پرایمر و ژن هدف بسیار حفاظـت شـده ureC و کنترلهای مثبت و منفی می‌توان گفت که نتایج صـحیح و دقیقی به دست آمده است (۱۴،۱۳).

بـه منظـور تـشخیص حـضور ژن cagA، از روش PCR و پرایمر اختصاصی این ژن استفاده گردید. میـزان شـیوع ژن cagA در این مطالعه ۳۵/۵ درصد بود. طبق مطالعات انجام شـده، حـضور ژن cagA با علایم شدید گوارشی از قبیـل التهـاب شـدید معـده، زخم معده و زخم اثنی‌عشر و حتی سرطان معده مـرتبط مـی‌باشـد (۱۶،۱۵). در این مطالعه نیز در سـویه‌هـای +cagA میـزان زخـم معده، زخم اثنی‌عشر، آتروفی مخاط معده و تغییـر شـکل در ناحیـه ابتدایی اثنی‌عشر نسبت به سویه‌های -cagA بیـشتر اسـت. یافتـه جالب به دست آمده این است که میـزان التهـاب مـری و درجـات شدید لزیونهای مخاط مری در سـویه‌هـای -cagA بـالاتر اسـت. متعاقب مطالعات متعددی که در جوامع مختلف صورت گرفتـه نیـز همـین نتـایج بـه دسـت آمـده اسـت و مـشخص گردیـده کـه در سویه‌های+cagA میزان التهاب مری و در نتیجـه ایجـاد بیمـاری رفلاکس معده به مری (GERD) و بـارت ازوفـاگوس کمتـر و در نتیجه خطر سرطان مری کمتر است. یکی از دلایل ذکـر شـده در این مورد، کاهش ترشح اسید معده در اثر التهـاب شـدید معـده در سویه‌های +cagA و جلوگیری از بازگشت اسید به مری ذکر شـده است. در کشورهایی که در آن عفونت هلیکوبـاکترپیلوری در حـال ریشه‌کن شدن است، التهـاب آتروفیـک و سـرطان معـده در حـال کاهش است، در حالی که بیماریهای مربوط به رفلاکس معـده بـه مری در حال افزایش می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای که در ایالات متحـده صـورت گرفتـه، در بیمـاران مبـتلا بـه GERD و بـارت ازوفاگوس وجـود سـویه‌هـای هلیکوبـاکترپیلوری +cagA بـسیار اندک می‌باشد (۱۸،۱۷). اختلاف نظر میان برخی نتایج در مطالعات صورت گرفته، ممکن است تحت تاثیر برخی عوامل از جمله تفاوت در فاکتورهای محیطی و ژنتیکی میزبان و باکتری قرار گیرد. برای مثال پلی‌مورفیسم در ژنهـای تولیـد کننـده سـیتوکانهای التهـابی میزبان، تنوع در قسمت ′۳ ژن cagA و همراهی این ژن با آللهای مختلـف ژنهـای کـد کننـده سـایر فاکتورهـای بیمـاریزا از جملـه vacA،iceA و . . . ، تفـاوت در قـدرت سیـستم ایمنـی افـراد و محیط محل زیست در شدت پاسخ ایمنـی و بـروز علایـم بـالینی می‌تواند تاثیرگذار باشد (۲۰،۱۹). طبق تحقیقاتی که اخیـراً صـورت گرفته است می‌توان روشـهای تهـاجمی ماننـد گـرفتن بیوپـسی از معده را با روشهای غیرتهاجمی جایگزین نمود. از جمله این روشها استفاده از نمونه مدفوع است که از طریق آن می‌توان عفونت اخیـر با هلیکوبـاکترپیلوری را تـشخیص داد. در نتیجـه اسـتفاده از روش PCR بر مبنای ژنهای cagA، ureC جهت تـشخیص عفونـت و شناسایی سویه‌های پاتوژن در نمونه مدفوع پیشنهاد می‌گردد (۲۱).

نتیجه‌گیری . با توجه به شیوع فراوان عفونت هلیکوبـاکترپیلوری و عواقب خطرناک آن، تـشخیص سـریع و دقیـق ایـن بـاکتری و تعیین سویه‌های پاتوژن با استفاده از روش PCR بر مبنای ژنهای cagA، ureC در پیشگیری از عواقب عفونت و درمان مؤثر و به موقع آن، مؤثر می‌باشد.

References

1. Piny H, Hwang H. Clinical presentation in relation to diversity within the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. Gastroenterology 2002; 97: 9-15.

2. Inci Nur S, Hulya D, Doruk E, Ozge D, Yakut A, Nurten K. The cagA status of Helicobacter pylori isolated from dyspeptic children in Turkey. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2003; 36: 147-149.

3. Blazer MJ, Prez GI. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increase risk of developing adenocarcinoma of the stomach cancer 1995; 55: 2111-5.

4. Audibert C, Janvier B. Correlation between IL-8 Induction, cagA status and vacA genotypes in 153 French Helicobacter pylori isolates. Res Microbiol 2000; 151: 191-200.

5. Thomas G, Blanchar J, Elseberg C. Clearance of H. pylori infection through Immunization: the site of Tcell activation contributes to vaccine efficacy. Vaccine 2004; 22: 888-897.

6. Al-Ghoul L, Wessler S, Hundertmak T. Analysis of the type IV secretion system–dependent cell motility of Helicobacter pylori- infected epithelial cells. BBRC 2004; 322: 860-866.

7. Stem M, Rappuoh R. A tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori cagA antigen alter CagA Driven Host Cell Translocation. Pro Nall Acad Sci USA 2000; 97: 1263-1268.

8. Jones AD. Helicobacter pylori induces apoptosis in Barrett's–derived esophageal adenocarcinoma cells. J Gastrointest Surg 2003; 7: 68-76.

9. Cameron AJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. Dis Esophagus 2002; 15: 106-8.

10. Smith SI, Kirsch C, Oyedeji KS, Arigbaba AO. Prevalence of Helicobacter pylori vacA/cagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. J Med Microbiol 2002; 51: 851-854.

11. Sato TG. Evaluation of Immunological rapid urease test testing for detection of Helicobacter pylori. Eur J Clin Microbiol 2000; 19: 438-442.

12. Senturko C, Canturk Z, Cetinarsland B, Ercin P. Prevalence and comparison of five different diagnostic methods for Helicobacter pylori. Endocr Res 2001; 27: 179-189

13. Brooks HJ, Ahmed D. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by polymerase chain reaction: is it worth it? Diagnostic Microbilogy and Infection Disease 2004; 50: 1-5.

14. Wang JQ, Osato P, Lachman M. Real time quantitative PCR for detection of Helicobacter pylori. J Clim Microbiol 2002; 40: 3720-3728.

15. Guillemin K, Nina RF, Tompkins LS, Falkow S. Cag pathogenicity Island–specific responses of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori infection. PNAS 2002; 99: 15136-41.

16. Zhang W. Helicobacter pylori prevalence and cagA status among children in two countries. Ann Epidemol 2001; 11: 543-546.

17. Kudo M. CagA in Barretts esophagus in Colombia, a country with a high prevalence of gastric cancer. J clinical pathology 2005; 58: 259-262.

18. Graham DY. The changing epidemiology of GERD:

geography and Helicobacter pylori. Am J Gastroentrol 2003; 98: 1462-70.

19. Rad R, Neu B. Cytokine gene polymorphism influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonization during Helicobacter pylori infection. Gut 2004; 53: 1082-9.

20. Raymond P, Podzorski DS. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 gene in Helicobacter pylori from sixty-one pediatric patients from the mid-western United States. Bacteriology 2003; 46: 83-88.

21. Monteiro L, Demascarel A. Diagnosis of H. pylori infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. Am. J Gastroenterol 2001; 96: 353-358.