بسم الله الرحمن الرحيم

پردیس بین الملل
زیست شناسی _ ژنتیک

(عنوان)
بررسی ارتباط آلل های iceA1 و iceA2 با سرطان معده در بیماران آذربایجانی

از
سعید سلمانی
اساتید راهنما
دکتر رضا صفر علیزاده
دکتر فرزام عجمیان
اساتید مشاور
دکتر مرتضی جبارپور بنیادی
دکتر حمیدرضا وزیری

(شهریور ماه۱۳۹۲)

تقدیم به :

روح پاک پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم و به مـادرم، دریـای بـی‌کـران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست .

از اساتید فرزانه و فرهیخته‌ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند، نمی‌توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استادان خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم ، کم گفته‌ام

و با تشکر ویژه از اساتید گرامیم جناب آقایان دکتر رضا صفرعلیزاده و دکتر فرزام عجمیان به دلیل یاریها و راهنماییهای بی‌چشمداشتشان که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند.

چکیده

بررسی ارتباط بین آلل iceA1 و iceA2 با سرطان معده در بیماران آذربایجانی

سعید سلمانی

سرطان معده جزء سرطان های بسیار شایع در کل دنیا می باشد و میزان مرگ و میر بر اثر این سرطان به ویژه در آسیا و کشورهای در حال توسعه بالا است . اگر چه فراوانی سرطان معده در کشورهای غربی به آرامی در حال کاهش است ، با این حال دومین علت شایع مرگ بر اثر سرطان می باشد . هلیکوباکترپیلوری دارای توزیع جهانی است و عامل اصلی در پیشرفت زخم پپتیک و سرطان معده می باشد. هلیکوباکترپیلوری دارای مارکر های ژنتیکی می باشد که باعث بیماری زایی آن می‌شود، از جمله ی این مارکرهای ژنتیکی: جایگاه cagA، آلل های VacA و اخیراً یک ژن جدیدی به نام iceA از هلیکوباکترپیلوری کشف شده است که دارای دو آلل می باشد :iceA1 و iceA2 . هدف از این مطالعه بررسی شیوع آلل های iceA1 و iceA2 در سویه های هلیکوباکترپیلوری و ارتباط آن با سرطان معده در ۸۶ بیمار می باشد . ۶۵ نمونه (۷۵/۵٪) ، شامل ۳۰ نفر از ۳۷ بیمار مبتلا به سرطان معده (۸۱٪) و ۳۵ نفر از ۴۹ بیمار مبتلا به التهاب معده (۷۱/4٪) بودند . آللiceA1 در ۱۱ سویه از ۳۰ سویه شناسایی شده از بیماران مبتلا به سرطان معده (۳۶٪) و ۹ سویه از ۳۵ سویه شناسایی شده از بیماران مبتلا به التهاب معده (۲۵٪) وجود داشت . آللiceA2 در ۱۲ سویه از ۳۰ سویه شناسایی شده از بیماران مبتلا به سرطان معده (۴۰٪) و ۱۲ سویه از ۳۵ سویه شناسایی شده از بیماران مبتلا به التهاب معده (۳۴٪) وجود داشت . محصول PCR سویه های $iceA1^{+}$ و $iceA2^{+}$ با استفاده از پرایمرهای 16s rRNA HP1 و 16s rRNA HP2و پرایمرهای به دست آمد . در این مطالعه ارتباط معنا داری بین آللiceA1 و سرطان معده به دست نیامد (P.Value> 0/5%) . و همچنین ارتباط معنا داری بین آللiceA2 و سرطان معده وجود نداشت (P.Value <0.05%) .

واژه های کلیدی : هلیکوباکترپیلوری ، iceA ، 16s rRNA HP1، 16s rRNA HP2 سرطان معده ، التهاب معده .

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول:مقدمه

۱-۱- معرفی هلیکوباکترپیلوری ---------- ۲
۱-۲- تاریخچه کشف هلیکوباکترپیلوری ---------- ۳
۱-۳- تغذیه و متابولیسم ---------- ۵
۱-۴- اپیدمیولوژی ---------- ۵
۱-۵ - بیماری زایی هلیکو باکترپیلوری ---------- ۷
۱-۵-۱- تحرک هلیکو باکتر پیلوری ---------- ۹
۱-۵-۲- اتصال هلیکو باکتر پیلوری به سلول های اپیتلیال ---------- ۱۰
۱-۵-۳- آنزیم های هلیکوباکترپیلوری ---------- ۱۲
۱-۵-۳-۱- اوره آز ---------- ۱۲
۱-۵-۳-۲- کاتالاز و سوپر اکسیددیسموتاز ---------- ۱۳
۱-۵-۳-۳- لیپاز و پروتئاز ---------- ۱۴
۱-۵-۴- پروتئین های شوک حرارتی ---------- ۱۴
۱-۵-۵- لیپو پلی ساکارید (lps) ---------- ۱۵
۱-۶- ژنوم هلیکو باکترپیلوری ---------- ۱۶
۱-۶-۱- ژن های بیماریزای هلیکو باکترپیلوری ---------- ۱۸
۱-۶-۲- cagA (cytotoxin associated gene) ---------- ۱۸
۱-۶-۳- vacA (vacuolatingcytotoxin) ---------- ۲۰
۱-۶-۴- iceA (Induced by contact with epithelial cell) ---------- ۲۱
۱-۷- پاسخ سیستم ایمنی به عفونت هلیکوباکترپیلوری ---------- ۲۳
۱-۸- هلیکوباکترپیلوری و زخم معده ---------- ۲۴
۱-۹- معرفی سرطان معده ---------- ۲۵
۱-۹-۱- عوامل زمینه ساز سرطان معده ---------- ۲۷
۱-۹-۲- علائم و نشانه های سرطان معده (تظاهرات بالینی) ---------- ۲۸
۱-۱۰- تغییر فیزیولوژی معده در اثر عفونت با هلیکوباکترپیلوری ---------- ۲۸
۱-۱۱- تشخیص عفونت با هلیکوباکترپیلوری ---------- ۳۰
۱-۱۲- درمان عفونت با هلیکوباکترپیلوری ---------- ۳۱
۱-۱۳- اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ---------- ۳۳

فصل دوم : مواد و روش ها

۲-۱- دستگاه ها و مواد مورد استفاده ---------- ۳۶
۲-۱-۱- دستگاه های مورد استفاده ---------- ۳۶
۲-۱-۲- مواد و وسایل مورد استفاده ---------- ۳۷
۲-۱-۳- بافر ها و محلول های مورد استفاده جهت الکترو فورز افقی ---------- ۳۸

۲-۲- تهیه و جمع آوری نمونه ها ---------- ۳۹
۲-۳- استخراج DNA از بافت توسط کیت (#k DNG-plus) ---------- ۴۰
۲-۴- بررسی کیفیت DNA استخراج شده ---------- ۴۱
۲-۴-۱- ژل آگارز ---------- ۴۱
۲-۴-۲- اسپکتروفتومتری ---------- ۴۲
۲-۵- PCR (polymerase chain reaction) ---------- ۴۲
۲-۵-۱- جفت پرایمرهای مربوط به لوکوس iceA1 ---------- ۴۳
۲-۵-۲- جفت پرایمرهای مربوط به لوکوس iceA2 ---------- ۴۴
۲-۵-۳- جفت پرایمرهای مربوط به لوکوس 16s rRNA ---------- ۴۵
۲-۵-۴- رقیق سازی پرایمر ها ---------- ۴۶
۲-۵-۵- مراحل اصلی چرخه PCR ---------- ۴۶
۲-۵-۶- نحوه انجام PCR ---------- ۴۷
۲-۵-۷- چرخه حرارتی PCR ---------- ۴۹
۲-۵-۸- ارزیابی محصولات PCR ---------- ۵۰

فصل سوم : نتایج

۳-۱- ملاحظات اخلاقی ---------- ۵۲
۳-۲- جامعه ی مورد مطالعه ---------- ۵۲
۳-۳- نتایج حاصل از تست اوره آز ---------- ۵۳
۳-۴- نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ---------- ۵۴
۳-۴-۱- بررسی با استفاده از کیت DNG-plus ---------- ۵۴
۳-۴-۲- بررسی توسط روش اسپکتروفتومتری ---------- ۵۴
۳-۵- نتایج مربوط به بررسی شیوع هلیکوباکترپیلوری در نمونه های بیو پیسی معده ، از طریق روش PCR ---------- ۵۵
۳-۵-۱- set-up کردن واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ---------- ۵۵
۳-۵-۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن iceA ---------- ۵۷

فصل چهارم : بحث و پیشنهادات

بحث ---------- ۶۶
پیشنهادات ---------- ۷۲
منابع مورد استفاده ---------- ۷۳

فهرست جدول ها

عنوان صفحه

جدول ۲-۱- دستگاه های مورد استفاده ---------- ۳۶
جدول ۲-۲- مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن iceA1 ---------- ۴۳
جدول ۲-3-مشخصات پرایمرهای مربوط به ژنiceA2---------- ۴۴
جدول۲-۴-مشخصات پرایمرهای مربوط به16srRNA ---------- ۴۵
جدول ۲-۵- غلظت مواد مورد استفاده در PCR ---------- ۴۸
جدول ۲-۶- برنامه زمان حرارتی PCR برای قطعه های iceA1/iceA2 و 16sr RNA ---------- ۴۹
جدول ۲-۷- پروفایل حرارتی واکنش PCR مربوط به آللiceA1/iceA2 و 16sr RNA ---------- ۴۹
جدول ۳-۱- ژنوتیپ iceA در مبتلایان به سرطان التهاب و معده---------- ۶۱
جدول ۳-۲- نتایج بررسی بر اساس جنس در مبتلایان به التهاب وسرطان معده ---------- ۶۲

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل۱-۱-هلیکو بکتر پیلوری (بر گرفته از www.ncbi.com) ---------- ۲
شکل۱-۲-دکتر باری مارشال(چپ) ودکتر رابین وارن(راست), برندگان جایزه نوبل سال۲۰۰۶ ---------- ۴
شکل۱-۳-**درصد شیوع عفونت در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه** ---------- ۶
شکل۱-۴-عوامل بیماری زای هلیکو باکتر پیلوری ---------- ۸
شکل۱-۵-تحرک هلیکو باکتر پیلوری ---------- ۹
شکل۱-۶- هلیکو باکتر پیلوری در تماس با سلولهای اپیتلیال ---------- ۱۰
شکل۱-۷- مدل مولکولی آنزیم اوره آز هلیکوباکتر پیلوری ---------- ۱۲
شکل۱-۸- تنوع ژن vacA ---------- ۲۰
شکل ۳-۱-تست اوره‌آز جهت شناسایی هلیکوباکترپیلوری ---------- ۵۳
شکل۳-۲- نتایج حاصل از استخراج DNA با استفاده از کیت DNG-Plus ---------- ۵۴
شکل۳-۳- نتیجه PCR اللiceA1با استفاده از ژل آگاروز ---------- ۵۵
شکل۳-۴-نتیجه PCR الل iceA2 با استفاده ازژل آگاروز ---------- ۵۶
شکل۳-۵- نتیجه PCR الل iceA2 با استفاده ازژل آگاروز ---------- ۵۶
شکل۳-۶-آنالیز آللiceA1 با استفاده از PCR ناحیه ی نوکلئوتید ۱۵۱ تا ۳۷۹ ---------- ۵۷
شکل۳-۷-آنالیز آللiceA1 با استفاده از PCR ناحیه ی نوکلئوتید 168 تا 502 ---------- ۵۸
شکل۳-۸- نمودار میله ای شیوع هلیکوباکترپیلوری ---------- ۵۹
شکل۳-۹-نمودار میله ای شیوع ژنوتیپ iceA1 ---------- ۶۰
شکل۳-۱۰-نمودار میله ای شیوع ژنوتیپ iceA ---------- ۶۰
شکل ۳-۱۱- نمودار میله ای شیوع iceA1 وiceA2 بین مردان و زنان ---------- ۶۲

فصل اول

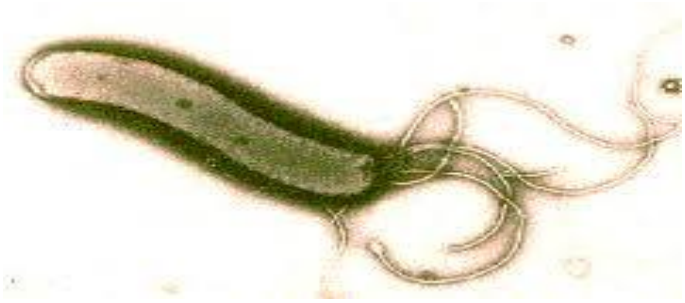
مقدمه

۱-۱- معرفی هلیکوباکترپیلوری

هلیکوباکترپیلوری یک باسیل گرم منفی، مارپیچی یا S شکل که حدود ۳/۵ میکرون طول و۰۵/میکرون عرض دارد. این باکتری میکروآئروفیلیک با متابولیسم هوازی است. و در معرض هوا به صورت اجسام کوکوئید در می آید. در محیط آزمایشگاه رشد آهسته ای دارد و آن را در محیط های کشت اختصاصی و محیط کشت ژل خونی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار اکسیژن ۵ درصد در عرض ۳ تا ۷ روز می توان کشت داد. این باکتری در بافت S شکل و در محیط کشت ترجیحاً میله ای می باشد.

این ارگانیسم متحرک و دارای ۴ تا ۶ تاژک در یک قطب (Lophotrichate) می‌باشد. مطالعات تاژک این باکتری توسط میکروسکوپ الکترونی نشان می دهد که این تاژک ها به وسیله لایه ای پیوسته به اجزائی غشاء خارجی دیواره سلولی پوشیده می شود. تاژک ها تقریباً ۳۰ نانومتر قطر و دارای فیلامانی در حدود ۱۲ تا ۱۵ نانومتر می باشند.

در مجموع کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت و اوره‌آز مثبت است و وجود اوره‌آز در باکتری برای ادامه حیات آن ضروری بوده و نقش حیاتی دارد[7] .



شکل۱-۱- هلیکو بکتر پیلوری (بر گرفته از www.ncbi.com)

گونه های هلیکوباکترپیلوری برطبق آنالیز توالی ژن های 16s r RNA ریبوزومی، اسیدهای چرب سلولی و وجود فلاژل های قطبی مشخص می شود. بیماریزایی این باکتری بسته به خصوصیات خاص ارگانیسمی، فاکتورهای ژنتیکی میزبان و فاکتورهای محیط است[8] .

بسته به نوع محیط کشت، این باکتری در محدوده pH ۵/۵ تا ۸/۵ و به طور بهتر در pH ۶/۹ تا ۸ رشد خواهد کرد.

شواهد زیادی وجود دارد که ثابت می کنند که ژنوتیپ هلیکوباکترپیلوری یکی از فاکتورهای مهم بیماریزایی آن است. چندین ژن در بیماریزایی هلیکوباکترپیلوری نقش دارند، از جمله این ژن ها vacA, cagA و iceA هستند. این باکتری با تماس مستقیم با سلول های اپی تلیال و تولید آنزیم ها و اگزوتوکسین و اکوئله کننده به تنهایی مسئول اکثر آسیب های سلول معده در افراد آلوده می باشد[9] .

این ارگانیسم در نواحی آنتروم و فوندوس معده، بین لایه های موکوسی و سطح سلول های اپیتلیوم زندگی می کند و علت اصلی التهاب معده، زخم های پپتیک (Peptic Ulcer Disease)، سرطان معده و لنفومای سلول های نوع B لنفوئیدی مرتبط با مخاط معده (mucosa- associated Lymphoid type B-cell Lymphoma=MALT) شناخته شده است، همچنین موجب سوءتغذیه در دوران طفولیت و افزایش خطر یا شدت عفونت توسط بیماری های معده ای – روده ای مثل ویبریوکلرا، به ویژه در کشورهای در حال توسعه می شود [10].

۱-۲- تاریخچه کشف هلیکوباکترپیلوری

کشف هلیکوباکترپیلوری به عنوان عامل اصلی چندین بیماری گوارشی که تصور می شد درباره‌ی آن اطلاعات کاملی وجود دارد بسیار تعجب آور بود. ریشه‌ی تاریخی این کشف به اواخر نیمه‌ی دوم قرن ۱۹ بر می گردد. بیزوزرو (Bizzozero) در سال ۱۸۹۳ باکتری مارپیچی را در موکوس معده‌ی سگ شناسایی کرد.Sulomon در ۱۸۹۶ این اسپیروکت ها را در موکوس معده‌ی موش شناسایی نمود.

پروفسور جاوورسکی (Jaworski) اولین کسی بود که بیش از ۱۰۰ سال قبل باکتری هایی مارپیچی را در ترشحات معده انسان کشف کرد. ارتباط بین التهاب معده و بیماری زخم پپتیک از دهه ۱۹۴۰ مشخص شده بود ولی کشت این باکتری ها با موفقیت همراه نبود. در سال ۱۹۲۴، لاک (Lack) و ست (Seth) گزارش کردند که معده انسان دارای فعالیت اوره‌آزی بسیاری است و در سال ۱۹۵۹ نشان داده شد که فعالیت اوره آزی معده پس از تجویز تتراسیکلین کاهش می یابد ولی ارتباط بین این آنزیم و اسپیروکت های معده تا سال ۱۹۸۴ مشخص نشد. در واقع مانع اصلی در تشخیص نقش باکتری های مارپیچی در پاتولوژی معده انسان، عدم توانایی کشت باکتری ها از معده بود. باکتریایی بودن منبع اورهآز معده در سال ۱۹۶۸ و با نشان دادن عدم فعالیت اوره آز در معده حیوانات فاقد میکروب تأیید گشت. در سال ۱۹۷۵ همراهی باکتری ها با التهاب معده در ۸۰٪ نمونه های حاصل از رزکسیون معده مبتلایان به زخم معده گزارش شد[11] .

اما دوران طلایی زمانی شروع شد که باری مارشال (Barry Marshall) در سال ۱۹۸۱ یک طرح پژوهشی را به همراه یک آسیب شناس به نام رابین وارن (Robin Warren) در استرالیا آغاز کرد. وارن نمونه های بیوپسی معده را با رنگ وارتین – استاری (Warthin- Starry) رنگ آمیزی کرد و متوجه وجود باکتری در مخاط گشت. مارشال یک بیمار مسن روسی مبتلا به التهاب معده را که در معده اش باکتری وجود داشت، با تتراسیکلین درمان نمود و متوجه از بین رفتن عفونت و بهبود التهاب شد. تلاش های بعدی برای کشت این باسیل ها ناموفق بود تا این که در آوریل ۱۹۸۲ مارشال به گونه ای غیرمترقبه موفق به این کار شد. ماجرا از این قرار بود که در عید پاک به جای اینکه ظروف پتری ۲ روز در انکوباتور بمانند، به ناچار ۵ روز باقی ماندند. وقتی این

ظروف پس از پایان تعطیلات بررسی شدند، کلنی های کوچکی با ظاهر براق دیده شدند. این اولین کشت و جداسازی موفق باکتری ها از معده یک بیمار مبتلا به التهاب معده بود. این ارگانیسم های شبیه کمپیلوباکتر، ابتدا کمپیلوباکترپیلوریدیس خوانده شدند . زیرا که ریزهوازی، خمیده و گرم منفی بودند و هم از لحاظ مورفولوژیک و هم از لحاظ محتویات گوانین/سیتوزین DNA شبیه کمپیلوباکترها بودند. به خاطر ملاحظات گرامری، این اسم در سال ۱۹۸۷ به کمپیلوباکترپیلوری تغییر یافت. سپس معلوم شد که این باکتری به جنس کمپیلوباکتر تعلق ندارد و در سال ۱۹۸۹ Good win به علت شکل Helicalrod در محیط کشت و نیز مکان شایع آن در پیلور نام جدید این ارگانیسم ها را هلیکوباکتر گذاشت. برای رفع این تردید که آیا این باکتری ها علت التهاب معده هستند یا تنها ناظری بی گناه اند که در مخاط آسیب دیده کلونیزه می شوند، مارشال و آرتورموریس (Morris) تصمیم گرفتند با نوشیدن محلولی حاوی 10^9 باکتری همراه با سرکوب اسید توسط سایمتیدین, خود را تلقیح کنند. هر دو دچار نشانه های ناخوشی حاد و شبه آنفلوآنزایی معده همراه با اتساع معده، تهوع و استفراغ شدند. پس از ۱۰ روز، آندوسکوپی ابتلا به هلیکوباکترپیلوری و التهاب را نشان داد که به تدریج طی ۳ هفته بعدی فروکش نمود. در آندوسکوپی مجدد ارگانیسمی دیده نشد و التهاب رو به بهبود بود.

شکل۱-۲- دکتر باری مارشال(چپ) ودکتر رابین وارن(راست)، برندگان جایزه نوبل سال ۲۰۰۶ به خاطر کشف هلیکو باکتر پیلوری به عنوان عامل بیماری زا در لوله گوارش.

بدین ترتیب فرضیه کخ مبنی بر اینکه در واقع خود باکتری ها عامل بیماری هستند، تأیید شد[13-12] .

۱-۳- تغذیه و متابولیسم

اطلاعات محدودی راجع به متابولیسم هلیکو باکترپیلوری و اینکه چگونه انرژی را از مواد غذایی بدست می آورد وجود دارد مواد غذایی درون معده نیز نمی توانند منبع انرژی این باکتری باشند زیرا به طور معمول هلیکوباکتر پیلوری در لایه‌ی موکوسی در اعمال معده و در ارتباط با سلول های اپی تلیال است. در آزمایشگاه نیز هلیکوباکتر پیلوری را در روی محیط های بسیار غنی کشت می دهند بدون اینکه به نیازمندهای انرژی و عوامل لازم برای رشد آن اشاره شود و تنها مشاهده‌ای که انجام گرفته این است که هلیکوباکترپیلوری روی محیط های فاقد کربوهیدرات نیز رشد می کنند.

ساختمان های پلی فسفات نیز در هلیکوباکترپیلوری مشاهده شده است. این ساختمان ها به عنوان مخزن انرژی و فسفات عمل کرده و هنگام کمبود ATP، جبران کننده آن خواهند بود. هلیکوباکترپیلوری از اسیدهای آمینه و مواد حد واسط چرخه TCA(Tricaboxylic Acid) و همینطور از چربی ها نیز استفاده می کند. خاصیت متابولیکی که بیشتر هلیکوباکتر پیلوری را مشخص می کند تولید اوره‌آز است. اهمیت اوره در تغذیه هلیکوباکترپیلوری در طی تحقیقات مختلف به اثبات شده است.پلی نوکلئوتید و پروتئین ها توسط آنزیم آوره آز تجزیه می شوند همچنین گروه گوانیدین، آرژینین و حلقه نیتروژن پورین ها نیز تحت تأثیر این آنزیم تجزیه می گردند[14] .

۱-۴- اپیدمیولوژی

میزان شیوع عفونت

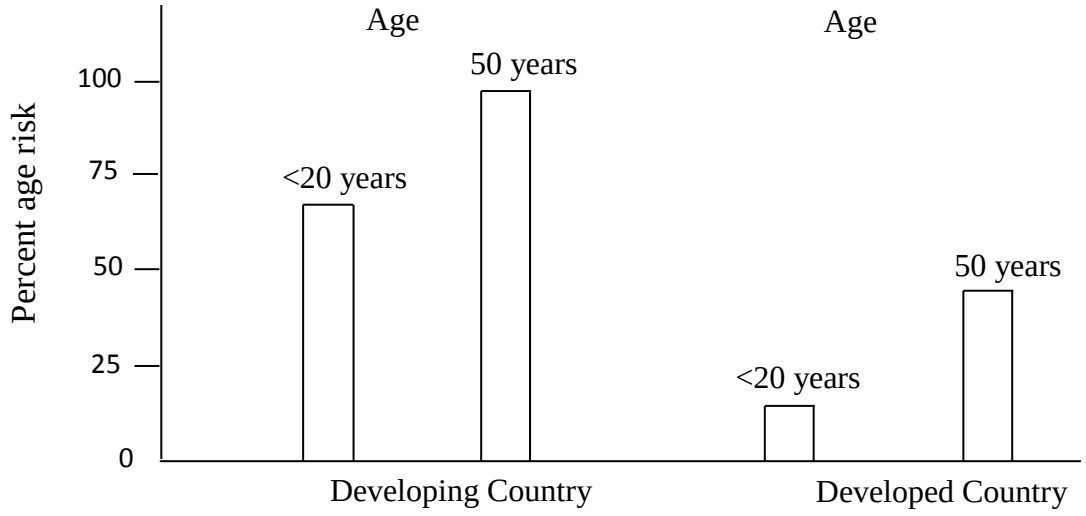
امروزه هلیکوباکترپیلوری به عنوان یک باکتری پاتوژن معده و روده شناخته می شود. این عفونت انتشار جهانی دارد و در تمام گروه های سنی، عارض می شود. ضمناً تخمین زده می شود که حدود ۵۰ درصد مردم جهان، آلوده هستند. در کشورهای توسعه یافته آلودگی در کودکی نامعمول است و اغلب در طی بزرگسالی به وجود می آید. در کشورهای در حال توسعه تعداد زیادی از کودکان قبل از ۱۰ سالگی آلوده می شوند، در حالی که افراد آلوده شده ممکن است دچار بیماری دستگاه گوارش گردند و یا اصلاً بیمار نشوند. عفونت با این باکتری در بزرگسالان مزمن است و بدون درمان داروئی بهبود نمی یابد اما حذف خود به خودی در کودکان دیده شده که احتمالاً ناشی از درمان آنتی بیوتیکی برای بیماری های دیگر در کودکان است[15] .

۱۰ درصد مردم قبل از ۵۰ سالگی به این باکتری آلوده می شوند. این عفونت در ۹۵ درصد از بیماران مبتلاً به زخم دوازدهه و در ۸۰-۷۰٪ از بیماران مبتلا به زخم معده دیده شده است. تقریباً ۱۷٪ از افراد هلیکوباکترپیلوری مثبت مبتلا به زخم گوارشی می شوند و هر ساله ۲-۱٪ از این افراد دچار خونریزی، سوراخ شدگی و یا انسداد خروجی معده می شوند. در سوءهاضمه بدون زخم

حدود ۵۰٪ از بیماران مبتلا به هلیکوباکترپیلوری می باشند. افراد مبتلا به هلیکوباکترپیلوری حداقل چهار برابر افراد دیگر بیشتر در معرض زخم گوارشی و سرطان معده هستند[16] .

مطالعات گذشته نگر و آینده نگر نشان داده اند که عفونت همزمان با هلیکوباکترپیلوری در ۹۰درصد موارد سرطان معده شامل لنفوم های معده وجود دارد. خطر سرطان معده مرتبط با هلیکوباکترپیلوری در ممالک صنعتی ۷۰٪ و در ممالک در حال توسعه ۸۰٪ تخمین زده شده است. اخیراً پیشنهاد شده که رابطه‌ای بین هلیکوباکترپیلوری و بیماری کرونر قلب وجود دارد اما مطالعات آینده نگر برای تأیید این فرضیه ضروری است[17] .

شیوع عفونت در کشورهای مختلف و در جمعیت های گوناگون یک کشور با هم تفاوت دارد و تناسب تنگاتنگی با وضعیت اقتصادی، اجتماعی مردم دارد. عواملی مثل تراکم اعضای خانواده، ازدحام جمعیت، بسترهای مشترک و نبود آب مناسب در کسب این عفونت مؤثر هستند. اعتقاد بر این است که تفاوت موجود در نسبت های کلونیزاسیون بین جوامع پیشرفته و غیرپیشرفته ناشی از بهبود وضعیت بهداشتی بوده که بعداً ایجاد شده است[18] .



شکل۱-۳-درصد شیوع عفونت در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه (برگرفته از Harrison"s et al.2008)

منابع آلودگی و نحوه انتقال

معمولاً در افراد مبتلا به عفونت هلیکوباکترپیلوری ، زمان مواجهه، منبع آن یا طریقی که باعث عفونت شده مشخصنیست. عفونت هلیکوباکترپیلوری در اغلب افراد عفونی به صورت خاموش و بی صدا می باشد و سبب التهاب سطحی معده می شود که برای سال ها ادامه می یابد و منجر به التهاب مزمن می شود[19] .عفونت هلیکوباکترپیلوری علاوه بر انسان در مخاط معده‌ی برخی حیوانات مانند گربه و خوک نیز مشاهده شده است. بنابراین حیوانات می توانند منبع انتقال آلودگی باشند[20] .

در دنیای در حال توسعه، کشت باکتری از مدفوع و شیوع بیشتر عفونت در جمعیت بدون امکانات فاضلاب دیده شده است. بنابراین احتمال عفونت با منبع مدفوعی- دهانی (Fecal – oral) هم تأیید می شود[21] .استعداد ژنتیکی در ابتلا به هلیکوباکترپیلوری مؤثر است به طوری که جنس مذکر و پلی مورفیسم ژن HLA – DQA همراه با افزایش میزان عفونت بوده است[22] .

همچنین مطالعاتی که در اسکاندیناوی, روی دوقلوهای تک تخمی و دوتخمی انجام شد نشان داد که عفونت می تواند از طریق وراثت منتقل شود. پزشکان متخصص گوارش و دیگر افرادی که در مراکز مراقبت بهداشتی کار می کنند و با ترشحات قسمت فوقانی دستگاه گوارش در تماس اند و یا از دستکش استفاده نمی کنند، در خطر بالای ابتلا به هلیکوباکترپیلوری قرار دارند[23] .

میزان بالای عفونت بین کودکان مادران آفریقای غربی که غذای نوزادان خود را از دهان خود می دهند و در بین چینی هایی که ظروف غذایی مشترک دارند، نشانه سرایت دهان به دهان (oral-oral) است. مطالعات مربوط به غرب نشان دادند که شیوع هلیکوباکتر پیلوری اغلب در میان کوچ نشین ها به طور قابل توجهی بالاتر می باشد[25-24] .

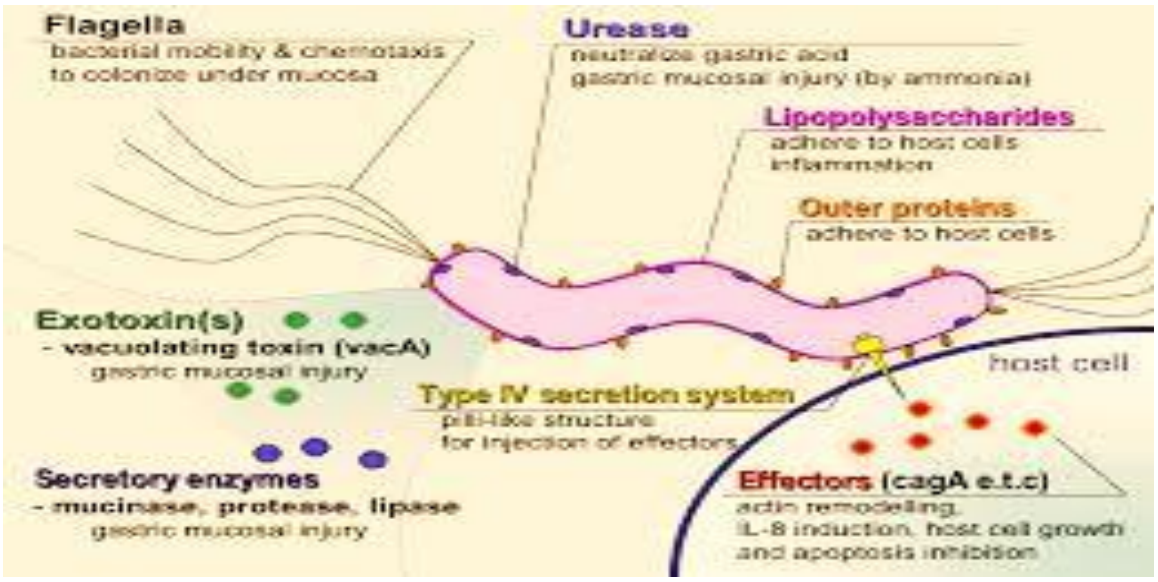
۱-۵- بیماریزایی هلیکوباکترپیلوری

اغلب تحقیقات درباره فاکتورهای بیماریزایی هلیکوباکترها، روی گونه هلیکوباکترپیلوری متمرکز شده‌اند. هلیکوباکترپیلوری یک ارگانیسم متحرک فلاژل دار است که توسط حرکت مارپیچی خود و ساختمان ویژه ای که دارد به لایه موکوسی معده نفوذ کرده و به سلول های اپی تلیال معده می چسبد اما روی سلول های پوششی روده مستقر نمی شود.

این ارگانیسم به واسطه تولید سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز از عمل فاگوسیتوز و کشته شدن داخلی سلولی محافظت می شودو متعاقب آن تولید آنزیم هایی از قبیل اوره‌آز، لیپاز، موسیناز، فسفولیپاز و سموم پروتئینی مثل VacA و CagA می کند که نهایتا باعث تخریب سلول های اپی تلیال و در معرض قرار گرفتن بافت های زیرین و ماتریکس خارج سلولی می باشد[26] .کلونیزاسیون اولیه باکتری توسط بلوکه کردن تولید اسید معده توسط پروتئین ممانعت کننده اسید (Acid – inhibitory protein) و خنثی سازی اسید معده توسط آمونیاک تولید شده از فعالیت اوره‌آز باکتری انجام می گیرد.

تغییر ژنتیکی هلیکوباکترپیلوری بالا می باشد و اثر انگشت DNA، هتروژنی مهمی را نشان می دهد. چندین ژن شناسایی شده‌اند که نشانه های بیماری هلیکوباکترپیلوری می باشد. سویه های هلیکوباکترپیلوری ، $CagA^{+}$، عامل تولید اینترلوکین 8 و التهاب غشائی مخاطی شناخته شده اند [27].عامل مسمومیت دیگر سایتوکسین می باشد که سلول های مربوط به غشاء مخاطی را با تشکیل حفره ها آسیب می رساند و این پروتئین توسط VacA کدگذاری شده است.

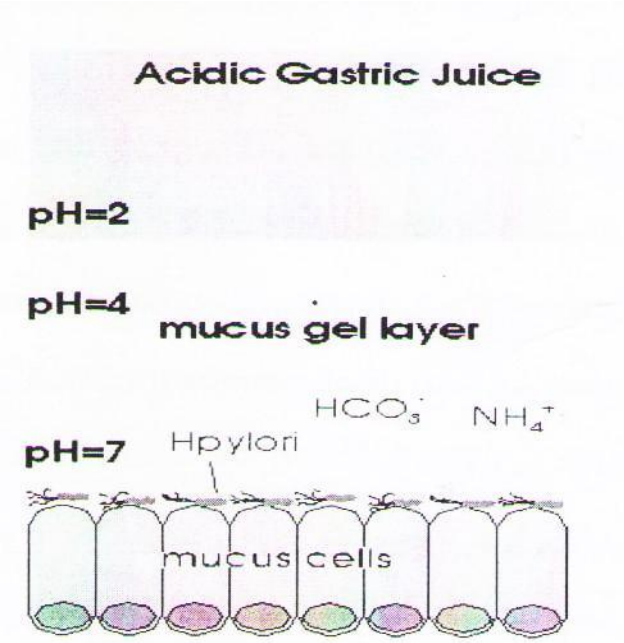
اخیراً یک ژن جدید شناسایی شده که برخورد هلیکوباکترپیلوری با غشاء مخاطی معده را موجب می شود که $iceA_1$ نام دارد [28].به تازگی علاوه بر توصیف ژنتیک سویه ها، پاسخ های مختلف میزبان به عفونت در نظر گرفته می شود تا، تاریخچه‌ی طبیعی بیماری زایی هلیکوباکترپیلوری مشخص شود[29] .



شکل۱-۴- عوامل بیماری زای هلیکو باکتر پیلوری .(بر گرفته از www.baharmedlab.com)

۱-۵-۱ تحرک

هلیکوباکترپیلوری باید بعد از ورود به بدن قادر باشد تا از واکنش ضدباکتریایی میزبان فرار نماید و در لایه موکوسی وارد شود. هلیکوباکترپیلوری توسط تاژک های تک قطبی اش درون ماده‌ی مخاطی چسبنده‌ی معده سوق داده می شود که ساختار مارپیچی ارگانیسم نیز باعث تسهیل می شود، تا ارگانیسم خود را از مناطقی که pH پایین دارند به منطقه ای که pH نزدیک طبیعی است برساند و با اتصال به سلول های اپیتلیال، محیط رشد مناسب را فراهم آورد. بررسی های مربوط به gnotobiotic piglets نشان می دهد که تحرک برای کلونیزاسیون ضروری می باشد[32-31-30] .



شکل۱-۵- هلیکو باکتر پیلوری بعد از رسیدن به سطح سلولهای اپیتلیال با تولید آنزیم اوره آز و تبدیل اوره به آمونیوم و بیکربنات اسید معده را خنثی می کند.(Dunn et al,.۱۹۹۷)

هلیکوباکترپیلوری بعد از نفوذ در موکوس ژله ای و رسیدن به سلول های اپیتلیال با تولید آنزیم اوره آز، اوره را به آمونیوم و بیکربنات تبدیل می کند و با خنثی کردن اسید معده شرایط مساعد برای کلونیزاسیون را فراهم می کند. تحرک هلیکوباکترپیلوری برای بقاء این باکتری ضروری است. تاژک های هلیکوباکترپیلوری برای محیط اسیدی معده سازگاری حاصل کرده اند. انواع جهش یافته هلیکوباکترپیلوری که دچار کمبود پروتئین لوله ای فلاژل می باشند بیماری زایی کمتری نسبت به سوش اصلی دارند[33] .

۱-۵-۲- اتصال هلیکوباکترپیلوری به سلول های اپیتلیال

از آن جایی که اکثر سلول های هلیکوباکترپیلوری در لایه‌ی ماده‌ی مخاطی به صورت آزاد زندگی می کنند، برخی از آنها به طور خاص به سلول های اپیتلیال معده می چسبند.

شکل۱-۶- هلیکو باکتر پیلوری در تماس با سلولهای اپیتلیال که به واسطه یک سری مولکولهای تخصصی مانند BabAو iceAامکان پذیر می گردد.

(Peek et al., ۱۹۹۶)

فراوانی چسبندگی های فرض شده و گیرنده های فرد شناسایی شده اند اما اینکه کدام یک علت ارتباط گسترده vivoinمی باشد، نامعلوم باقی مانده است. نقش چسبندگی در عفونت و پیدایش بیماری، و تحلیل آن توسط روش های محاسبه ای توسط Falk در سال ۲۰۰۰ بررسی شده است.

محققان لزوم بیان یکسری از ژن ها را جهت فرایند اتصال هلیکوباکترپیلوری ثابت نموده اند. از جمله‌ی این ژن ها، iceA و babA می باشند. این ژن ها دارای الل های خاصی هستند. الل های خاصی از این ژن ها کیفیت اتصال هلیکوباکترپیلوری را تحت تأثیر قرار می دهد[34] .مطالعات ساختاری روی بیوپسی ها نشان می دهد، که چسبندگی زمانی آغاز می شود که میکروب ها با گلیکوکالیکس(glycocalyx) پوشاننده‌ی روی میکرو ویلی سلول فرد برخورد داشته باشد[36-35] .

میزان تخریب بافت در هر بیمار بستگی به میزان چسبندگی باکتری به بافت پوششی معده دارد. احتمالاً چسبندگی باکتری به بافت پوششی و آزاد شدن سموم باکتری که به داخل سلول های بافت پوششی نفوذ می کند، موجب تخریب بافت پوششی شود. چسبندگی باکتری به سلول های اپیتلیال، به گیرنده های سطح باکتری(که در هر گونه متفاوت است) و نیز گیرنده های بافت پوششی که از فردی به فرد دیگر متفاوت می‌باشد، بستگی دارد[37] .

هلیکوباکترپیلوری ویژگی های چسبندگی جداگانه ای را برای سلول های اپیتلیال نشان می دهد. در سال ۱۹۸۸، Simha , Neman و Megraud چسبندگی بهتری را برای سلول های HEP-9 و سلول های Int – 407 پس از مقایسه‌ی چسبندگی میکروب ها برای چهار لاین سلول اپیتلیال توسط ایمونوفلوئورسنت و میکروسکوپ الکترونی پیدا کردند.

در سال ۱۹۹۳، Kobayashi مشاهده کرد که تنها ۵ مورد از ۳۵ سویه به خوبی به سلول های HEP-9متصل می شوند. Dunn، در سال ۱۹۹۱ اعلام کرد سلول های KATOIII برای پنج رده سلول سرطان معده مناسب تر می باشند که توسط روش های Cytometric تعیین شده اند. آنها اظهار دادند که سلول های KATOIII می توانند یک گیرنده برای هلیکوباکترپیلوری داشته باشند که فاقد خطوط سلولی دیگر می باشند، و یا این که گیرندگان در سطح سلول های KATOIII می توانند وابستگی بالایی برای هلیکوباکترپیلوری داشته باشند. قابلیت هلیکوباکترپیلوری برای چسبندگی به سلول های اپیتلیال معده براساس شناسایی یک مدل برای کلنی کردن معده‌ی انسان تشخیص داده شده است[38] .مشاهده شده است که هلیکوباکترپیلوری به رده سلولی اپیتلیال antral میمون و خوک به خوبی می چسبد اما به سلول های اپیتلیال Fundus یا سلول های اپیتلیال rodents(جانور جونده) نمی چسبد [39].

مثالهای چسبندگی به سلول های اپیتلیال حیوان شبیه به سلول های HEP-9 می باشد. از جمله گیرنده های بافت پوششی آنتی ژن های گروه خونی O هستند که هلیکوباکترپیلوری به واسطه این گیرنده ها به سطح سلول های اپیتلیال متصل می گردد. بیشتر بودن شیوع زخم های گوارشی در افراد دارای گروه خونی O نسبت به سایر افراد ممکن است به علت وجود آنتی ژن های گروه خونی O در سطح سلول های اپیتلیال این افراد و اتصال بهتر هلیکوباکترپیلوری به بافت پوششی معده در این افراد باشد و لذا آسیب سلول های اپیتلیال در این افراد شدیدتر است[40] .

Born، نشانه های بیشتری برای حمایت از نقش ضروری تعیین کننده‌ی Lewis Leb به عنوان گیرنده جمع آوری کرده است. اتصال فعال بین آنتی ژن Lewis -b روی سلول های اپیتلیال و الل babA هلیکوباکترپیلوری می باشد.از آنجایی که ۳ الل bab (babB, babA2, babA1) شناسایی شده اند، تنها محصول ژن babA2 برای عمل ترکیب Lewis -b ضروری می باشد. چندین محقق اظهار دارند که وجود babA2 مرتبط با رویداد زخم های دستگاه گوارش و سرطان معده می باشد[42-41] .

اخیراً ژنی به نام (induced by contact with epithelium) در این باکتری شناسایی شده است که در اثر تماس با سلول های اپیتلیال فعال می شود، این ژن شامل iceA1 و iceA2 می باشد که iceA1 در مقایسه با iceA2 ارتباط بسیار نزدیکتری با زخم اثنی عشر دارد[43] .