بسم الله الرحمن الرحيم

**تعهدنامه‌ی اصالت اثر و رعایت حقوق دانشگاه**

تمامی حقوق مادّی و معنوی مترتب بر نتایج، ابتکارات، اختراعات و نوآوری‌هایِ ناشی از انجام این پژوهش، متعلق به **دانشگاه محقق اردبیلی** می‌باشد. نقل مطلب از این اثر، با رعایت مقرّرات مربوطه و با ذکر نام دانشگاه محقق اردبیلی، نام استاد راهنما و دانشجو بلامانع است.

اینجانب سمیه صرامی دانش‌آموخته‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی دانشکده‌ی علوم دانشگاه محقق اردبیلی به شماره‌ی دانشجویی ۹۰۲۲۳۶۳۱۰۷ که در تاریخ ۱۳۹۲/۱۲ /۱۴ از پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود تحت عنوان تیپ بندی موتیف‌های انتهای کربوکسیلی پروتئین CagA هلیکوباکترپیلوری از نواحی جغرافیایی مختلف در ایران
دفاع نموده‌ام، متعهد می‌شوم که:

۱) این پایان‌نامه را قبلاً برای دریافت هیچ‌گونه مدرک تحصیلی یا به عنوان هرگونه فعالیت پژوهشی در سایر دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزشی و پژوهشی داخل و خارج از کشور ارائه ننموده‌ام.
۲) مسئولیت صحّت و سقم تمامی مندرجات پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود را بر عهده می‌گیرم.
۳) این پایان‌نامه، حاصل پژوهش انجام شده توسط اینجانب می‌باشد.
۴) در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران استفاده نموده‌ام، مطابق ضوابط و مقرّرات مربوطه و با رعایت اصل امانتداری علمی، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در متن و فهرست منابع و مآخذ ذکر نموده‌ام.
۵) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده یا هر گونه بهره‌برداری اعم از نشر کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان‌نامه را داشته باشم، از حوزه‌ی معاونت پژوهشی و فنّاوری دانشگاه محقق اردبیلی، مجوزهای لازم را اخذ نمایم.
۶) در صورت ارائه‌ی مقاله‌ی مستخرج از این پایان‌نامه در همایش‌ها، کنفرانس‌ها، سمینارها، گردهمایی‌ها و انواع مجلات، نام دانشگاه محقق اردبیلی را در کنار نام نویسندگان (دانشجو و اساتید راهنما و مشاور) ذکر نمایم.
۷) چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن (منجمله ابطال مدرک تحصیلی، طرح شکایت توسط دانشگاه و ...) را می‌پذیرم و دانشگاه محقق اردبیلی را مجاز می‌دانم با اینجانب مطابق ضوابط و مقرّرات مربوطه رفتار نماید.

نام ونام خانوادگی دانشجو:
امضا
تاریخ

دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد
در رشته‌ی زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی

**عنوان:**

# تیپ بندی موتیف‌های انتهای کربوکسیلی پروتئین CagA هلیکوباکترپیلوری از نواحی جغرافیایی مختلف در ایران

**استاد راهنما:**
دکتر سعید لطیفی نوید

**استاد مشاور:**
دکتر صابر زهری

**پژوهشگر:**
سمیه صرامی

زمستان ۹۲

دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد
در رشته‌ی در رشته‌ی زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی

# عنوان:
# تیپ بندی موتیف های انتهای کربوکسیلی پروتئین CagA هلیکوباکترپیلوری از نواحی جغرافیایی مختلف در ایران

**پژوهشگر:**
سمیه صرامی

**ارزیابی و تصویب شده‌ی کمیته‌ی داوران پایان‌نامه با درجه‌ی .....**

| نام و نام خانوادگی | مرتبه‌ی علمی | سمت | امضاء |
|---|---|---|---|
| | | **استاد راهنما و رییس کمیته‌ی داوران** | |
| | | **استاد مشاور** | |
| | | **داور** | |

اسفند ۹۲

تقدیم به:

خدایی که آفرید

جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به پدر و مادرم که از نگاهشان صلابت را ، از رفتارشان محبت و از صبرشان ایمانگی را آموختم

به برادر و خواهران مهربانم که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه‌ی آرامش من است

و

استادان ارجمندم

به این امید که نشانی باشد از سپاس

# سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علـم و دانـش رهنمونمـان شـد و بـه همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

**خداوندا:**

**جان ما را صفای خود ده و دل ما را هوای خود ده ، و چشم ما را ضیای خود ده، وما را از فضل و کرم خود آن ده که آن به.**

از پدر و مادر عزیزم که دعای خیرشان در تمام زندگی بدرقه راهم بوده و موفقیت‌هـایم مرهـون زحمـات بیکرانشان می‌باشد و همچنین برادر و خواهران عزیزم که سنگ صبور روزهای سـخت زنـدگی‌ام بودنـد، بی‌نهایت سپاسگزارم و آرزوی سلامتی و سعادت ایشان را از درگاه خداوند متعال، خواستارم.

برخود لازم می‌دانم از استاد راهنمای بزرگوار و گرانقدرم، جناب آقای دکتر سعید لطیفی نوید که راهنمایی این پایان‌نامه را بر عهده داشتند و در تمام سختی‌ها و مشکلات، قدم به قدم همراه و پشتیبانم بوده و دلسوزانه و با صبر و حوصله بسیار اینجانب را راهنمایی نمودند مراتب تشکر و سپاسگزاری را داشته باشم. از جناب آقای دکتر صابر زهری ، که بنده رااز مشاوره‌های ارزشمندشان بهره‌مند فرمودند، واز همکاری صمیمانه‌اشان در اجرای پایان‌نامه سپاسگزارم. از جناب آقای دکتر بایرامی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند کمال تشکر را دارم. از سایر اساتید گروه زیست‌شناسی، آقایان دکتر سید مهدی رضوی، دکتر اسدالله اسدی و دکتر حمیدی که دو سال از محضرشان کسب فیض نموده‌ام، نیز کمال تشکر و سپاس را دارم که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید. از سایر افرادی که یاری‌بخش پایان‌نامه‌ام بوده‌اند، سرکار خانم‌ها خیراندیش و زهری سپاسگزارم و برای همگی آرزوی سلامتی و سربلندی را از خداوند متعال خواستارم. همچنین از آقای عبدی و سلیمانی که دلسوزانه مرا در اجرای این پایان نامه یاری نمودند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

با سپاس بی‌دریغ خدمت هم اتاقی‌های گران مایه‌ام خانم‌ها فرزانه شهابی، سید فرخنده حسینی، فاطمه حبیبی که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری داده اند. و با تشکر خالصانه خدمت همه‌ی همکلاسی‌ها و دوستان مهربانم خانم‌ها فرزانه شهابی، ندا شفیعی، زهرا سعادتی، نسیم علیزاده، پریچهر ملکی، شیوا محمدی، منصوره نوروزی، مریم حسینی، سمانه نعیمی و حدیث هاشمی و آقای حمید لطیفی نوید، دیگر دوستان عزیزم که هر کدام به نحوی یار و یاور من بوده‌اند، کمال سپاس و قدردانی را دارم و برای همه عزیزان آرزوی سلامتی و توفیق را از خداوند متعال خواستارم.

نام خانوادگی دانشجو: سمیه نام: صرامی

عنوان پایان‌نامه: تیپ بندی موتیف های انتهای کربوکسیلی پروتئین CagA هلیکوباکترپیلوری از نواحی جغرافیایی مختلف در ایران

استاد راهنما: دکتر سعید لطیفی نوید

استاد مشاور: دکتر صابر زهری

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: زیست شناسی

گرایش: سلولی و مولکولی دانشگاه: **محقق اردبیلی**

دانشکده: علوم تاریخ دفاع: ۱۳۹۲/۱۲/۱۴ تعداد صفحات: ۱۳۲

چکیده:

CagA یک پروتئین باکتریایی ۱۲۰ تا ۱۴۵ کیلو دالتون است که نقش بسیار مهمی در بروز بیماری‌های گوارشی دارد و باعث افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های زخم معده، آتروفی معده و سرطان معده می‌شود. پروتئین CagA دارای ناحیه‌ی تکرارپذیر EPIYA (گلوتامین- پرولین- ایزولوسین- تیروزین-آلانین) بسیار پلی‌مورف در ناحیه‌ی انتهای کربوکسیلی می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین تعداد و انواع موتیف EPIYA در ناحیه‌ی متغیر '۳ از میان سویه‌های هلیکوباکترپیلوری می‌باشد که به وسیله‌ی تکنیک PCR و تعیین توالی DNA ارتباط بین موتیف‌ها و بیماری‌های گوارشی مشخص شد. سویه‌های هلیکوباکترپیلوری از ۱۷۰ بیمار مبتلا به گاستریت، ۳۶ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۵۸ بیمار که دارای عارضه‌ی زخم معده بودند و به مراکز آندوسکوپی شهرهای مختلف ایران مراجعه کرده بودند به دست آمد. در مجموع ۱۴۹ نمونه از سویه‌های جدا شده *cagA*+ بودند و انواع مختلفی از موتیف‌ها را در ناحیه‌ی C ترمینال نشان دادند. آنالیز آماری ارتباط معنی دار قوی بین حضور ژن *cagA* و بروز بیماری زخم معده نشان داد (*P*= ۰/۰۰، ۲/۸۲۹-۱۵/۱۳۳، ٪۹۵ CI، ۶/۵۴۳ (odds ratio (OR)). فراوانی کلی EPIYA-AB ۳/۳٪، EPIYA-ABC ۷۱/۵٪، EPIYA-ABCC ۱۵/۴٪ و EPIYA-ABCCC ۷/۳٪ بدست آمد. آزمون‌های آماری ارتباط معنی دار بین حضور موتیف EPIYA-ABCC با زخم معده (*P*=۰/۰۱) و نیز ارتباط معکوس بین حضور موتیف EPIYA-ABC را با زخم معده نشان داد(*P*=۰/۰۰۷). نتایج تحلیل رگرسیون ارتباط معنی دار قوی بین حضور موتیف EPIYA-ABCCC و بروز سرطان معده نشان داد (*P*= ۰/۰۰۳، ۲/۱۷-۴۵/۸۸، ٪۹۵ CI، ۹/۹۹ (odds ratio (OR)). آنالیز رتبه ای واریانس مولکولی برای انواع موتیف ها تفاوت معنی داری بین مناطق جغرافیایی مختلف در ایران نشان نداد (*P*> ۰/۰۵). نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که عفونت با سویه‌های هلیکوباکترپیلوری *cagA*+ دارای موتیف EPIYA-ABCC با زخم معده و موتیف EPIYA-ABCCC با سرطان معده ارتباط معنی دار قوی نشان می دهد. تفاوت در ژنوتیپ *cagA* ممکن است شاخص مهمی در اپیدمیولوژی مولکولی باشد و نقش مهمی در بروز علایم بالینی متفاوت ناشی از عفونت با سویه‌های هلیکوباکترپیلوری *cagA*+ داشته باشد.

**کلید واژه‌ها:** هلیکوباکترپیلوری *cagA*، EPIYA، زخم معده، سرطان معده، بیماری گوارشی، ایران

## فهرست مطالب

**شماره و عنوان مطالب** **صفحه**

### فصل اول: مقدمه و پیشینه‌ی تحقیق


۱- ۱- مقدمه ..... ۲
۱-۱-۱- چگونگی کشف هلیکوباکترپیلوری ..... ۳
۱-۱-۲- تاریخچه نام گذاری جنس هلیکوباکترپیلوری ..... ۴
۱-۱-۳- سرطان معده ..... ۴
۱-۱-۴- فاکتورها و عوامل تاثیر گذار در سرطان معده ..... ۵
۱-۱-۵- نقش هلیکوباکترپیلوری در ارتباط با بیماری‌های گوارشی ..... ۶
۱-۱-۶- عوامل مرتبط با شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری ..... ۷
۱-۱-۷- وضعیت عفونت هلیکوباکترپیلوری در مناطق جغرافیایی مختلف ایران ..... ۹
۱-۱-۸- مورفولوژی و شناسایی هلیکوباکترپیلوری ..... ۹
۱-۱-۸-۱- خصوصیات بیولوژیکی هلیکوباکترپیلوری ..... ۱۰
۱-۱-۹- خصوصیات ژنومی، تغییرپذیری ژنتیکی و سازگاری معده‌ای ..... ۱۲
۱-۱- ۱۰-پاسخ‌های ایمنی میزبان به هلیکوباکترپیلوری ..... ۱۳
۱-۱-۱۱- عوامل بیماری‌زای هلیکوباکترپیلوری ..... ۱۴
۱-۱-۱۱- ۱- ژن *vacA* ..... ۱۴
۱-۱-۱۱-۲- ژن *babA* ..... ۱۶
۱-۱- ۱۲- جزیره بیماریزای *cag* (*cag*PAI) ..... ۱۷
۱-۱-۱۳- سیستم ترشحی نوع VI ..... ۱۸
۱-۱-۱۴- ژن *cagA* ..... ۱۸
۱-۱-۱۴- ۱- ساختمان مولکولی CagA هلیکوباکترپیلوری ..... ۱۹
۱-۱-۱۵- فعالیت‌های سلولی سم CagA ..... ۲۳
۱-۱-۱۶- اثرات سرطان‌زایی پروتئین CagA ..... ۲۳
۱-۱-۱۶-۱- مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به فسفریلاسیون CagA ..... ۲۳
۱-۱-۱۶-۲- مسیرهای پیام‌رسانی مستقل از فسفریلاسیون CagA ..... ۲۵
۱-۱-۱۶-۲-۱- بر هم کنش پروتئین CagA غیر فسفریله با zo-1 ..... ۲۶
۱-۱-۱۶-۲-۲- برهمکنش CagA غیر فسفریله باپروتئین β- کاتنین وابسته به کادهرین ..... ۲۶
۱-۱-۱۶-۲- ۳- بر هم کنش CagA با پروتئین آداپتورGRB-2 ..... ۲۶
۱-۱-۱۶-۲- ۴- برهم کنش CagA با گیرنده‌ی فاکتور رشد هپاتوسیت c-Met ..... ۲۶

۱-۱-۱۶-۲-۵- برهم کنش CagA با PAR1 کیناز..... ۲۷
۱-۱-۱۷- مروری بر مطالعات گذشته..... ۲۸
۱-۱-۱۸- اهداف مطالعه..... ۳۴

## فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲- مواد و روشها..... ۳۷
۲-۱- مواد و دستگاههای مورد استفاده..... ۳۷
۲-۲- محلول‌های مورد استفاده..... ۳۹
۲-۳- محیط کشت‌های استفاده شده..... ۴۰
۲-۳-۱- محیط کشت LB (Luria-Bertani)..... ۴۰
۲-۳-۲- محیط کشت SOB مایع..... ۴۰
۲-۳-۳- محیط کشت SOB جامد..... ۴۱
۲-۳-۴- محیط کشت SOC..... ۴۱
۲-۴- سویه‌های باکتریایی..... ۴۱
۲-۴-۱-کشت هلیکوباکترپیلوری و شناسایی آن..... ۴۳
۲-۴-۱-۱-شناسایی هلیکوباکترپیلوری با استفاده از رنگ آمیزی گرم..... ۴۳
۲- ۵- استخراج DNA..... ۴۴
۲- ۵-۱- استخراج DNA از باکتری..... ۴۴
۲-۵-۲- استخراج DNA از بافت بیوپسی معده..... ۴۵
۲-۵-۳- تعیین غلظت DNA..... ۴۶
۲-۵-۴- تهیه‌ی محلول کار..... ۴۷
۲-۶- تکثیر ژن‌های مورد نظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)..... ۴۷
۲-۷-الکتروفورز ژل آگارز..... ۴۹
۲-۸- تخلیص (خالص سازی DNA جهت تعیین توالی)..... ۵۰
۲- ۹-کلون سازی ژن و واکنش تعیین توالی..... ۵۱
۲- ۹-۱- تهیه مخلوط Ligation..... ۵۱
۲-۹-۲- سلول مستعد (Competent cells)..... ۵۳
۲-۹-۲-۱- مستعد سازی باکتری *E. coli* به روش رسوب دهی کلسیم کلراید (M ۰/۱)..... ۵۳
۲-۹-۳-ترانسفورم کردن سلول میزبان مستعد..... ۵۴
۲-۹-۳-۱- انتخاب کلنی نوترکیب..... ۵۴
۲-۹-۴- تأیید کلنی‌های نوترکیب صحیح..... ۵۵
۲-۹-۴-۱- آزمون توسپیک..... ۵۵

۲-۹-۴-۲- کلنی PCR ..... ۵۵
۲-۹-۴-۳- روش استخراج پلاسمید دستی در مقیاس کم به روش لیز قلیایی ..... ۵۵
۲- ۹-۴-۴- واکنش هضم آنزیمی و تأیید حامل نوترکیب ..... ۵۶
۲- ۱۰- تعیین توالی ..... ۵۷
۲-۱۱- آنالیز داده‌ها ..... ۵۷
۲-۱۱-۱- آنالیز ANOVA ..... ۵۷
۲-۱۱-۲- آزمون کای-اسکوئر ($\chi^2$) و آزمون دقیق فیشر ..... ۵۷
۲-۱۱-۳- رگرسیون چندگانه خطی (Multiple Linear Regression) ..... ۵۷
۲-۱۱-۴- رگرسیون چندگانه لجستیک (Multiple Logistic Regression) ..... ۵۸
۲-۱۲- نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده جهت تحلیل توالی‌ها ..... ۵۸

## فصل سوم: نتایج

۳- نتایج ..... ۶۰
۳-۱- سویه‌های باکتریایی ..... ۶۰
۳-۲- ملاحظات اخلاقی ..... ۶۶
۳-۳- جداسازی تک کلنی از سویه‌ها ..... ۶۷
۳-۴- استخراج DNA ..... ۶۸
۳-۴-۱- استخراج DNA از باکتری ..... ۶۸
۳-۴-۲- استخراج DNA از بافت بیوپسی معده ..... ۶۸
۳-۵- بررسی نمونه‌ها با استفاده از آنالیز ژن ۱۶S rDNA ..... ۶۹
۳-۶- مطالعه‌ی نمونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تعیین نمونه‌های دارای ژن *cagA* مثبت ..... ۷۱
۳-۷- بررسی نمونه‌های *cagA* مثبت با استفاده از پرایمر ناحیه‌ی ۳' ژن *cagA* برای تعیین موتیف‌های انتهای کربوکسیلی ..... ۷۲
۳-۸ تخلیص نمونه‌ها از روی ژل و واکنش تعیین توالی ..... ۷۵
۳-۹- کلون سازی ژن و واکنش تعیین توالی ..... ۷۷
۳-۹-۱- تأیید کلنی‌های نوترکیب صحیح ..... ۸۱
۳-۹-۱-۱- آزمون توسپیک ..... ۸۲
۳-۹-۱-۲- کلنیPCR ..... ۸۲
۳-۹-۱-۳-استخراج پلاسمید در مقیاس کم به روش لیز قلیایی ..... ۸۳
۳- ۱۰-نتایج حاصل از توالی‌یابی ..... ۸۴
۳-۱۰-۱-ردیف آرایی چندگانه مربوط به توالی‌ها با توالی‌های مرتبط در GenBank بر اساس آنالیز nBlast ..... ۸۶
۳-۱۱-آنالیز آماری ..... ۸۸
۳-۱۱-۱- مشخصات افراد شرکت کننده در مطالعه ..... ۸۸

۳-۱۱-۲- نتایج حاصل از بررسی اثر سن وجنس بر روی سرطان معده و زخم معده..... ۸۹
۳-۱۱-۳- ارتباط بین فراوانی ژن *cagA* و بیماری‌های سرطان معده و زخم معده..... ۸۹
۳-۱۱-۴- تأثیر ژنوتیپ ناحیه‌ی ۳' ژن *cagA* و بیماری‌های سرطان معده و زخم معده..... ۹۰
۳-۱۱-۵- آنالیز (ANOVA) موتیف‌های انتهای کربوکسیلی CagA هلیکوباکترپیلوری از مناطق جغرافیایی مختلف در ایران..... ۹۳

## فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث..... ۹۶
۴-۲- نتیجه‌گیری..... ۱۰۵
۴-۳- پیشنهادها..... ۱۰۷

فهرست منابع..... ۱۰۸
پیوست‌ها و ضمائم..... ۱۲۰
پیوست الف نتایج تعیین توالی با استفاده از پرایمر ۳' ژن*cagA* برای تعیین موتیف‌های انتهای کربوکسیلی..... ۱۲۱
پیوست ب نتایج ANOVA..... ۱۲۹

## فهرست جدول‌ها

**شماره و عنوان جدول** **صفحه**

فصل دوم

جدول ۲-۱: دستگاه‌های استفاده شده..... ۳۷
جدول۲-۲: کیت‌های استفاده شده..... ۳۸
جدول۲-۳: مواد مصرفی استفاده شده..... ۳۸
جدول ۲-۴: محلول‌های مورد استفاده..... ۳۹
جدول ۲-۵: محیط کشت LB..... ۴۰
جدول۲-۶: مشخصات سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از منابع جغرافیایی و قومیتی مختلف در ایران..... ۴۲
جدول ۲-۷: پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر قطعه *16S rDNA* هلیکوباکترپیلوری..... ۴۳
جدول۲-۸: پرایمرهای استفاده شده برای PCR..... ۴۸
جدول ۲-۹: ترکیب واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)..... ۴۸
جدول۲-۱۰: مواد لازم برای هضم آنزیمی..... ۵۶

فصل سوم

جدول ۳-۱: مشخصات سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جداشده از منابع جغرافیایی و قومیتی مختلف در ایران..... ۶۲
جدول ۳-۲: فراوانی موتیف‌های انتهای کربوکسیلی CagA سویه‌های هلیکوباکترپیلوری..... ۹۰
جدول۳- ۳: نتایج ANOVA بین بیماری‌های گوارشی ..... ۹۱
جدول ۳-۴: فراوانی موتیف‌های انتهای کربوکسیلی CagA هلیکوباکترپیلوری از مناطق جغرافیایی مختلف در ایران ۹۳
جدول۳-۵: نتایج ANOVA بین ۱۱ استان..... ۹۴

فصل چهارم

جدول ۴-۱: درصد شیوع *cagA* و ارتباط آن با بیماری‌های گوارشی در کشورهای مختلف..... ۱۰۰

پیوست و ضمائم

جدول ۳-۱: پیوست ب نتایج ANOVA ارتباط *cagA* با بیماری‌های گوارشی..... ۱۲۹
جدول ۳-۲: پیوست ب نتایج ANOVA ارتباط موتیف‌های انتهای کربوکسیلی CagA با بیماریهای گوارشی مختلف ..... ۱۲۹

## فهرست شکل‌ها

**شماره و عنوان شکل** **صفحه**


فصل اول

شکل ۱– ۱: رنگ آمیزی گرم از هلیکوباکترپیلوری..... ۳

شکل ۱– ۲ : پیشرفت طبیعی عفونت هلیکوباکترپیلوری..... ۷

شکل ۱– ۳: هلیکوباکترپیلوری یک باکتری گرم منفی به شکل استوانه‌ی مارپیچ..... ۱۰

شکل۱– ۴: شکل شماتیک از ژن‌های بیماری‌زای هلیکوباکترپیلوری..... ۱۴

شکل۱– ۵: شکل شماتیک از پروتئین VacA هلیکوباکترپیلوری..... ۱۶

شکل۱– ۶: شکل شماتیک از جزیره‌ی بیماری‌زای *cag*PAI..... ۱۷

شکل۱–۷: شکل شماتیک از ساختمان مولکولی CagA هلیکوباکترپیلوری در سویه‌ی غربی و شرقی..... ۲۰

شکل۱–۸: شکل شماتیک از تفاوت اتصال SHP2 در CagA هلیکوباکترپیلوری در سویه‌ی غربی و شرقی..... ۲۱

شکل۱–۹: شکل شماتیک از تفاوت در تعداد موتیف EPIYA-C در CagA هلیکوباکترپیلوری در سویه‌ی غربی ..... ۲۲

شکل۱–۱۰: شکل شماتیک ازمسیرهای پیام رسانی وابسته به فسفریلاسیون CagA هلیکوباکترپیلوری..... ۲۵

فصل دوم

شکل۲–۱: تأثیر اتیدیوم بروماید بر روی رشته‌های DNA..... ۵۰

شکل۲–۲: شکل شماتیک وکتور pTZ19R..... ۵۲

فصل سوم

شکل۳–۱: کلنی های هلیکوباکترپیلوری، کشت ۳ روزه..... ۶۷

شکل ۳–۲: الکتروفورز DNA استخراج شده از سویه‌ها در ژل ۱٪ آگارز..... ۶۸

شکل ۳–۳: الکتروفورز DNA استخراج شده از بافت بیوپسی معده در ژل ۱٪ آگارز..... ۶۹

شکل ۳–۴: الکتروفورز مربوط به محصولات PCR *۱۶S rDNA*..... ۷۰

شکل ۳–۵: الکتروفورز مربوط به محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر(*cagA*1-2) برای تعیین نمونه-های *cagA* مثبت..... ۷۱

شکل ۳–۶: قطعه‌های ۵۳۶، ۶۱۰ و ۴۷۱ حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر ' ۳ژن*cagA*..... ۷۲

شکل ۳–۷: قطعه‌های ۵۳۶، ۶۱۰، ۷۳۰ و ۴۷۱ حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر' ۳ ژن *cagA* ..... ۷۳

شکل ۳–۸: قطعه‌های ۵۳۶، ۶۰۰، ۷۰۰ ، ۴۷۱ و ۳۷۷حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر ' ۳ژن *cagA*..... ۷۴

شکل ۳–۹: قطعه‌های ۵۳۶، ۶۰۰، ۷۰۰ ، ۴۷۱ و ۳۷۷ حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر ' ۳ژن *cagA* که برای تخلیص از روی ژل استفاده شد..... ۷۶

شکل ۳–۱۰: قطعه‌های ۵۳۶، ۶۳۰ ، ۴۷۱ و حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر ' ۳ ژن*cagA* که برای تخلیص از روی ژل استفاده شد..... ۷۶

شکل ۳–۱۱: قطعه‌ی ۳۷۷حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر ' ۳ ژن *cagA* که برای تخلیص از روی ژل استفاده شد..... ۷۷

شکل ۳–۱۲: ژل مربوط به هضم آنزیمی توسط آنزیم *Sma*I..... ۷۸

شکل ۳-۱۳: الکتروفورز حاصل از وکتور برش خورده توسط آنزیم *Sma*I : وکتور برش خورده قبل از انجام تخلیص و وکتور برش خورده بعد از انجام تخلیص..... ۷۹
شکل ۳-۱۴: تصویر A الکتروفورز محصولات PCR حاصل از آنزیم *pfu* و تصویر B قبل از انجام تخلیص محصول PCR و تصویر C بعد از انجام تخلیص محصول PCR می‌باشد..... ۷۹
شکل ۳-۱۵: DH5α که در محیط آمپی‌سیلین رشد نکرده و کلونی‌های DH5α که بر روی محیط LB agar فاقد آمپی‌سیلین رشد کردند..... ۸۰
شکل ۳-۱۶: شاهد سلول مستعد که حاوی سلول مستعد همراه با وکتور خالی pTZ19 و کلنی‌های آبی و سفید حاصل از ترانسفرماسیون..... ۸۱
شکل ۳-۱۷: الکتروفورز حاصل از تست توسپیک کلنی‌های آبی و سفید..... ۸۲
شکل ۳-۱۸: الکتروفورز حاصل از کلنیPCR..... ۸۳
شکل ۳-۱۹: استخراج پلازمید از کلنی‌های سفید نوترکیب و آبی غیر نوترکیب..... ۸۳
شکل ۳-۲۰: ردیف آرایی مربوط به تیپ‌های موتیف‌های انتهای کربوکسیلی پروتئین CagA از سویه‌های مختلف با اثر کردهای بالینی متفاوت..... ۸۷

## فهرست علائم اختصاری

| علامت اختصاری | مفهوم یا توضیح |
|---|---|
| GC | Gastric cancer |
| PU | Peptic ulcer disease |
| NUD | Non-ulcer dyspeptic |
| *cagA* | Cytotoxin-associated gene A |
| *babA* | Blood group antigen-binding adhesion |
| IL-8 | Interleukin 8 |
| TAE | Tris- Acetic acid-EDTA |
| *VacA* | Vacuolating cytotoxin A |
| bp | base pair |
| EDTA | Ethylendiamine Tetra Acetic Acid |
| EPIYA | Glutamic acid- Proline- Isoleucine-Tyrosine- Alanine |

# فصل اول

# مقدمه و پیشینه‌ی تحقیق

## ۱-۱- مقدمه

هلیکوباکترپیلوری متداول‌ترین عامل سرطان‌های مرتبط با عفونت در نژادهای مختلف است و به عنوان کارسینوژن کلاس یک شناسایی شده است. هلیکوباکترپیلوری باکتری بیماری‌زایی است که به صورت انتخابی در اپیتلیوم معده ساکن می‌شود و عامل اصلی در ایجاد التهاب معده، زخم معده و دوازدهه بوده و یکی از عوامل اصلی در بروز سرطان معده می باشد که ۵/۵ درصد سرطان جهانی را تشکیل می‌دهد (Parkin et al, 2005).

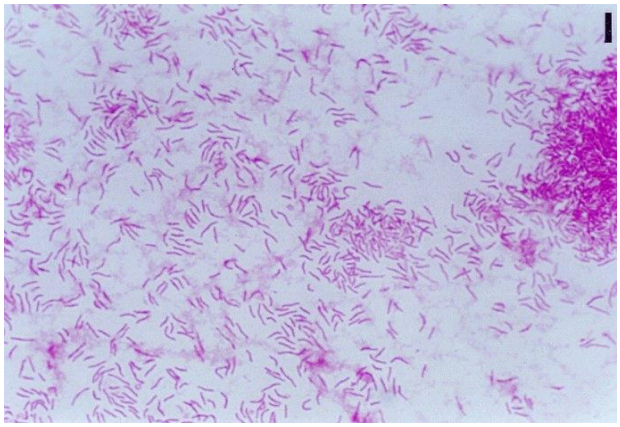
تقریباً نیمی از جمعیت جهان با هلیکوباکترپیلوری آلوده‌اند و در بیشتر اشخاص آلوده علایم خاصی مشاهده نشده است. مدارکی وجود دارد که نشان می‌دهد که این باکتری به مدت ده‌ها هزار سال با انسان هم‌زیستی داشته است. معده انسان تنها محل مناسب برای این باکتری است وانسان از دوران شیرخوارگی تا سنین پیری می تواند ناقل این باکتری باشد. هم‌چنین هلیکوباکترپیلوری واجد خصوصیات منحصربفرد است که آن را قادر ساخته تا در لومن اسیدی معده استقرار یابد. آلودگی با این باکتری در اکثر موارد فاقد هر گونه علائم بالینی می باشد (Peek et al, 2002; Linz et al, 2007). شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری در تمام مناطق دنیا یکسان نیست. در کشورهای در حال توسعه نسبت به کشورهای توسعه یافته شیوع عفونت بالاتری گزارش شده است، مثلا در ایران بخصوص مناطق شمالی و شمال‌غربی ایران آلودگی با هلیکوباکترپیلوری شایع می‌باشد (Malekzadeh et al, 2004).

چنین تصور می‌شود که عوامل متعددی بر شدت بروز اختلالات گوارشی مرتبط با هلیکوباکترپیلوری مؤثر باشند که از آن جمله می‌توان به ژنتیک میزبان، عوامل محیطی و فاکتورهای بیماری‌زای باکتری اشاره نمود این فاکتورها که در پاتوژنز و بقای میکروارگانیسم مؤثرند شامل ژن‌های *cagA*[1]، *vacA*[2]،*babA*[3] و غیره می‌باشند. این باکتری تنوع آللی و تغییرپذیری ژنتیکی بالایی را در ژن-های مرکزی (Core gene) و بیماری‌زا (virulence genes) نشان می دهد (Blaser et al, 2001).

1-Cytotoxin associated gene A
2-Vacuolating cytotoxin gene A
3-Blood group antigen binding adhesin

## ۱-۱-۱- چگونگی کشف هلیکوباکترپیلوری

بیماری‌های دستگاه گوارشی اغلب قبل از کشف هلیکوباکترپیلوری غیر قابل درمان بود. گزارش‌ها در مورد باکتری‌های مارپیچی در معده انسان و پستانداران به قرن نوزدهم بر می‌گردد. در قرن بیستم آناتومیست‌ها و پاتولوژیست‌ها به تدریج متوجه ارگانیسم‌های مارپیچی در موکوس معده‌ی انسان شدند. این باکتری مارپیچی شکل نخستین بار بیش از صد سال پیش در معده انسان و دیگر حیوانات مشاهده گردید. اما در سال ۱۹۸۱ بود که این باکتری بطور موفقیت‌آمیزی از نمونه‌های بیوپسی معده در بیمارستان Royal Perth در غرب استرالیا کشت داده شد. هلیکوباکترپیلوری توسط پاتولوژیست استرالیایی Warren Robbin که با Barry J.Marshall همکاری داشت کشف شد. آنها ارگانیسم‌ها را از نمونه-های موکوس معده‌ی انسان جدا کرده (در اوایل ۱۹۸۱) و اولین کسانی بودند که در آزمایشگاه این باکتری را کشت دادند و درسال ۱۹۸۴ گزارش کردند و ارتباط بین عفونت و التهاب مخاطی را اثبات کردند (شکل ۱-۱) (Marshall & Warren, 1984).



شکل ۱-۱: رنگ آمیزی گرم از هلیکوباکترپیلوری

به دلیل اینکه اکثر افراد در طول زندگی خود با بیماری‌های مرتبط با هلیکوباکترپیلوری مواجه هستند، بنابراین کشف هلیکوباکترپیلوری منجر به تحول بزرگی در گاستروانترولوژی گردید و مارشال و وارن موفق به دریافت جایزه نوبل در پزشکی در سال ۲۰۰۵ شدند. کشف آنها زمینه را برای درمان بیماری‌های معده توسط درمان ضد میکروبی فراهم کرد و منجر به نگرش جدید در مورد مکانیسم‌های منجر به التهاب معده، زخم معده، لنفوم و سرطان معده گردید (Suerbaum & Michetti, 2002).

در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های ژنومی منجر به درک بهتر از تکامل باکتریایی و سازگاری میزبانی شده است و مکانیسم‌های احتمالی درگیردر کلنیزه شدن باکتری، انتقال بین گونه‌ای، تنوع ژنتیکی و مسیرهای تنظیمی مورد بحث قرار گرفته است. مطالعه‌های ترانسکریپتومی نیز اطلاعات یا نظریه‌های جدیدی را مورد مکانیسم‌های سازگاری معده‌ای هلیکوباکترپیلوری که برای بیماری‌زایی آن ضروری می‌باشد، فراهم کرده است.

## ۱-۱-۲- تاریخچه نام گذاری جنس هلیکوباکترپیلوری

درابتدا هلیکوباکترپیلوری در جنس کمپیلوباکتر[1] قرار گرفته بود. در سال ۱۹۸۹ بعد از تعیین توالی ۱۶SrRNA و بررسی مورفولوژی تاژک و محتوای اسیدچرب مشخص شد که باکتری به جنس کمپیلوباکتر تعلق ندارد و به جنس جدیدی به نام هلیکوباکترپیلوری انتقال یافت. هلیکوباکتر در خانواده هلیکوباکتریاسه از راسته کمپیلوباکترال طبقه‌بندی می‌شود. هلیکوباکترپیلوری از نظر ژنتیکی بسیار متنوع است (Eppinger et al, 2004; Suerbaum et al, 2007).

## ۱-۱-۳- سرطان معده

سرطان معده ناشی از رشد بیش از حد سلول‌های بدخیم در معده است. این سرطان از دسته سرطان‌هایی است که طی سالیان و به آرامی رشد می‌کند، ولی قبل از این که سرطان به معنای واقعی ایجاد شود، تغییراتی در لایه‌های معده ایجاد می‌شود. سرطان معده از طرق مختلفی گسترش می‌یابد متأسفانه در مراحل ابتدایی علائم چندانی دیده نمی‌شود و شاید به‌همین دلیل، سرطان معده در مراحل ابتدایی به سختی تشخیص داده شده و می‌تواند از طریق دیواره معده به بافت‌ها و اعضای مجاور راه یابد. همچنین می‌تواند از طریق غدد عروق لنفاوی گسترش یابد. در مراحل پیشرفته نیز می‌تواند از طریق خون، سایر اندام و اعضا را درگیر کند. سرطان معده چهارمین سرطان متداول جهان به شمار می‌رود و دومین عامل سرطانی است که منجر به مرگ می‌شود. تقریباً یک میلیون نفر، هر سال در جهان به سرطان معده مبتلا می‌شوند و نزدیک هفتصد هزار نفر به خاطر آدنوکارسینوم معده جان خود را از دست می‌دهند (5Parkin et al, 200). هلیکوباکترپیلوری یکی از عوامل تعیین کننده در بروز سرطان معده می‌باشد. میزان شیوع سرطان معده در مناطق مختلف جغرافیا به طور یکسان نمی‌باشد مناطق با شیوع بالای

1- Campylobacter