مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهارم ـ شماره چهارم ـ زمستان ۸۹
صفحات ۳ الی ۹
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی بیان پروتئین سیکلواکسیژناز-۲ در سرطان معده القایی به‌وسیله هلیکوباکتر پیلوری در موش صحرایی

فاطمه آئینی[۱]، محمدجعفر رضایی[۲]، رشید رمضان‌زاده[۳]، آرش پولادی[۴]، بهرام نیکخو[۵]

[۱]دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، زنجان، ایران.
[۲]استادیار آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
[۳]استادیار میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
[۴]دانشجوی دکتری ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۵]استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان معده یکی از مهم‌ترین سرطان‌های رایج معده- روده‌ای است که میزان مرگ و میر ناشی از آن در جهان رو به افزایش است. هلیکوباکتر پیلوری (H. Pylori)، عامل اصلی گاستریت و زخم معده می‌باشد. سیکلواکسیژناز (COX) آنزیم اصلی در بیوسنتز مسیر پروستاگلاندین‌ها به شمار می‌رود. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که در سرطان کولون و دیگر سرطان‌ها میزان COX-2 بیش از حد بیان می‌شود. به‌منظور تأیید این یافته‌ها در سرطان معده، در این تحقیق یافته‌های ایمونوهیستوشیمیایی مخاط معده در یک الگوی حیوانی سرطان معده القا شده توسط هلیکوباکتر پیلوری در موش صحرایی (Sprague Dawly) بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه موش‌ها در سه گروه ۵ تایی به‌طور تصادفی تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه ۱ به‌عنوان گروه کنترل (گروهی که MNU و هلیکوباکتر پیلوری دریافت نکردند)، انتخاب شدند. موش‌های صحرایی گروه ۲، MNU را دریافت کردند. در موش‌های صحرایی گروه ۳ نیز همین دستورالعمل رعایت شد و یک هفته بعد، سه دفعه در روز و به‌صورت یک روز در میان، هلیکوباکتر پیلوری گاواژ گردید. موش‌های گروه‌های کنترل، آزمایش ۱ و ۲ در طی دوره آزمایش به‌صورت استاندارد تغذیه شدند. بعد از گذشت ۲۰ هفته موش‌ها تحت شرایط بیهوشی وزن شدند و از نصف بافت معده نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های معده به ۶ قطعه کوچکتر تقسیم شدند، سپس در فرمالین ۱۰٪ فیکس و به روش استاندارد آماده شده و در پارافین قالب‌گیری شدند. در ادامه، برش‌های ۶ میکرومتری از آنها تهیه و توسط رنگ‌آمیزی H&E بررسی گردید. آزمایشات ایمنوهیستوشیمیایی توسط رنگ‌آمیزی COX-2 نیز صورت گرفت. برای تأیید عفونت هلیکوباکتر پیلوری mm ۳ از مخاط معده به محیط بروسلا آگار انتقال داده شد. سپس کلنی‌های اثریافته پس از مدت ۵-۳ روز توسط رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز و مورفولوژی بررسی شدند. همچنین mm ۳ از نمونه معده توسط کیت سریع اوره بررسی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، وزن حیوانات گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت. مطالعات هیستوپاتولوژی در گروه آزمایش ۱ و ۲ نشان داد که اینفیلتریشن شدید سلول‌های پلی‌مورفونوکلئر و مونونوکلئر در لایه لامیناپروپریا و زیر مخاط آنتروم، تکثیر سلول‌های اپی‌تلیوم معده، همچنین اینفیلتراسیون ازوفاژیال روی داده است. همچنین در گروه کنترل تغییرات غیرطبیعی مشاهده نشد. در مطالعات ایمونوهیستوشیمی، پروتئین COX-2 در معده گروه‌های آزمایش مشاهده گردید، اما در گروه کنترل دیده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد هلیکوباکتر پیلوری باعث کاهش معنی‌داری در وزن حیوانات شده است. همچنین مطالعات هیستوپاتولوژی، متاپلازیای ازوفاژیال در معده موش‌های صحرایی را نشان داد. در مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نیز مشخص گردید که پروتئین در طی مراحل اولیه متاپلازیا بیان می‌گردد.

کلید واژه‌ها: سرطان معده؛ هلیکوباکتر پیلوری؛ سیکلواکسیژناز- ۲.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران؛
تلفن: ۶۶۶۴۶۵۲-۰۸۷۱ آدرس پست الکترونیکی: rezaiemj@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۱۹

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان معده دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان بوده و معمولاً پیش‌آگهی بدی دارد (۱). بروز آن در برخی کشورها همچون آمریکا و انگلیس کاهش یافته است (۲)، اما همچنان در بسیاری از کشورها مانند ژاپن، چین، ایتالیا و کشورهای در حال توسعه در حد بالایی قرار دارد (۳). در کشورهای توسعه‌یافته عفونت هلیکوباکتر پیلوری در کمتر از ۵۰٪ جمعیت بالغ و در کشورهای در حال توسعه مانند ایران میزان این عفونت بالاتر است و نزدیک به ۸۰٪ جمعیت بالغ را در بر می‌گیرد (۴). هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، متحرک، میله‌ای شکل و میکروآئروفیل است که اغلب در دوران کودکی معده را آلوده می‌کند و برای مدت طولانی در آن باقی می‌ماند، همچنین هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان یک پاتوژن گوارشی، موجب التهاب مزمن و فعال معده و نیز زخم‌های گوارشی در انسان می‌شود (۶،۵). هلیکوباکتر پیلوری شایع‌ترین علت ایجاد زخم‌های پپتیک و گاستریت محسوب می‌شود؛ به‌طوری‌که ۹۰-۶۰٪ بیماران با زخم دوازدهه و ۷۰٪ بیماران با زخم معده مبتلا به هلیکوباکتر هستند، این باکتری در لنفوم و آدنوکارسینوم معده نیز نقش دارد (۸-۶). مطالعات انجام شده بر روی سرطان معده در برخی مناطق، بیانگر این مطلب است که بعضی عوامل محیطی از جمله سیگار کشیدن، غذاهای نمک‌دار و سابقه خانوادگی برای سرطان معده خطرزا بوده و بر اثر این عوامل و بعضی تغییرات ژنتیکی مستعدکننده، ضایعات پیش‌سرطانی (Precancerous) به‌وجود می‌آید و طی مراحلی به سمت سرطان معده پیشرفت می‌کند (۹،۸). از جمله عواملی که بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است فاکتورهای بیماری‌زایی باکتریال هستند که ایجاد گاستریت کرده و در نهایت منجر به سرطان معده می‌شوند (۱۱،۱۰). در ۲ دهه گذشته آزمایشات کلینیکی و مطالعات اپیدمیولوژیک بسیاری در ارتباط با سرطان و حضور سیکلواکسیژنازها در سلول‌های سرطانی انسان انجام گرفته است. آنزیم اصلی ساخت پروستاگلاندین‌ها، COX است که به‌صورت ۲ ایزوفروم (COX-1 ، COX-2) وجود دارد. بروز ژن COX-2 به‌وسیله محرک‌های التهابی القا می‌شود (۱۳-۱۱). مطالعات نشان داده است آنزیم سیکلواکسیژناز در ایجاد سرطان‌های معده- روده‌ای نقش مهمی دارد و سطح این آنزیم در سرطان‌های دستگاه گوارش افزایش می‌یابد (۱۳-۱۱). همچنین آنزیم COX-2 به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مدیاتورهای القاکننده سرطان، به‌ویژه سرطان دستگاه گوارش مطرح است (۱۱) (۱۵-۱۳). از سوی دیگر تاکنون بیشتر تحقیقات بر روی تغییرات هیستوپاتولوژی سرطان معده در درازمدت صورت گرفته است و بر روی وقایع مولکولی سرطان در کوتاه‌مدت، مطالعات بسیار اندکی وجود دارد. در بیشتر تحقیقات بررسی سرطان، مدت زمان در نظر گرفته شده، بیش از ۴۰ هفته از آغاز آزمایش می‌باشد که در این مدت پروسه سرطان کاملاً پیشروی دارد (۱۳،۱۱). در این مطالعه، در مدت زمان ۲۰ هفته بعد از ایجاد سرطان، یکی از مسیرهای مهار سرطان که وابسته به پروتئین COX-2 است، بررسی گردید که در مورد دوره زمانی کوتاه‌مدت ۲۰ هفته بعد از القای سرطان گزارشی وجود نداشت، لذا انجام تحقیقات در این زمینه ضروری است. در مطالعه حاضر، یک مدل آزمایشگاهی سرطان معده ایجاد شده و بیان پروتئین COX-2 که نقش مهمی در مراحل اولیه ایجاد سرطان القایی معده دارد، بررسی شد؛ تا از نتایج این تحقیق بتوان در بحث درمان و پیشگیری سرطان معده استفاده نمود.

روش بررسی

تعداد ۱۵ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد (Sprague Dawley) ۸-۶ هفته‌ای در محدوده وزنی ۲۵۰ g-۲۰۰ در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی کردستان پرورش داده شدند، موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی در سه گروه کنترل، آزمایش ۱ و آزمایش ۲ در قفس‌های کوچکی حاوی آب و مواد غذایی اتوکلاو شده، نگهداری شدند (تعداد ۵ سر در هر گروه). سویه هلیکوباکتر پیلوری از مرکز انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سویه هلیکوباکتر پیلوری مورد نظر روی پلیت‌های بروسلا آگار حاوی ۷-۵٪ خون گوسفندی و آنتی‌بیوتیک‌های مربوط کشت داده شد و تحت شرایط میکروآئروفیل در ۳۷°C به مدت ۷-۵ روز انکوبه گردید. سویه‌های جدا شده هلیکوباکتر پیلوری براساس تصویر کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم، تولید اوره‌آز، کاتالاز و اکسیداز شناسایی و کنترل شدند (۱۶،۱۳). برای ایجاد مدل حیوانی سرطان معده توسط هلیکوباکتر پیلوری، از کلنی‌های هلیکوباکتر رشدیافته در پلیت بروسلا آگار برداشته و در محیط کشت بروسلا براث کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون ml ۰/۱ از سوسپانسیون هلیکوباکتر پیلوری تحت ۳ دوز حاوی 1×10^{9}CFU از طریق سرم گاواژ به درون معده

www.SID.ir

Archive of SID

موش صحرایی گاواژ گردید (۱۶-۱۳). موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی در سه گروه ۵ تایی شامل: ۱. گروه کنترل (طبیعی)، ۲. گروه آزمایش ۱: هلیکوباکترپیلوری، ۳. گروه آزمایش۲: MNU (N- نیتروز-N- متیل اوره) قرار داده شدند. به گروه آزمایش۲، ماده MNU یک هفته در میان تا هفته دهم با ۲۰۰ppm در آب آشامیدنی این گروه اضافه شد (۱۳). به موش‌های صحرایی گروه آزمایش ۱، هلیکوباکتر پیلوری ۳ بار در روز یک روز در میان (یک هفته بعد از دادن MNU) برای مدت ۱۲ هفته گاواژ شد (۱۴-۱۱). بعد از ۲۰ هفته از انجام آزمایش، وزن حیوانات اندازه‌گیری و با استفاده از اتر بیهوش شدند، سپس تحت شرایط بی‌حسی از معده موش‌های صحرایی گروه کنترل و آزمایش ۱ و ۲ برای انجام آزمایشات زیر نمونه‌گیری به عمل آمد.

الف) مطالعات میکروبی: برای تأیید عفونت هلیکوباکتر پیلوری، حدود ۳ mm از انحنای بزرگتر معده برداشته شد، سپس با استفاده از PBS۱۰ µl استریل هموژنیزه گردید. بخشی از نمونه یکنواخت شده به محیط بروسلا آگار ۵٪ خون گوسفندی که محتوی وانکومایسین ۲۰ mg/ml، نالیدیکسیک اسید ۱۰ mg/ml، باکتریوسین ۳۰ mg/ml و آمفوتریسین B، ۲ mg/ml بود، منتقل گردید و روی پلیت کشت داده شد. برای ۳ تا ۵ روز در شرایط میکروآئروفیل کلنی‌ها رشد کردند. برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری، مورفولوژی این کلنی‌ها با استفاده از اسمیر، رنگ‌آمیزی گرم بررسی گردید. همچنین جهت تأیید بیشتر، فعالیت اوره‌آزی، فعالیت کاتالازی، فعالیت اکسیدازی، مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید، عدم تولید SH2 و تست اندول بررسی شد (۱۷،۱۴،۱۱).

ب) مطالعات بافت‌شناسی: برای مطالعات بافت‌شناسی یک برش طولی از معده در امتداد خم بزرگ معده از مری تا دوازدهه زده شد، سپس نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. نمونه‌ها به‌صورت معمول پروسس داده شدند و برش‌های۶ میکرومتری جهت مطالعات هیستوشیمی تهیه گردید. اسلایدها با رنگ‌های هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) و گیمسا جهت مطالعه التهاب و وجود باکتری رنگ‌آمیزی شدند (۱۴).

ج) مطالعات ایمونوهیستوشیمی: جهت انجام این مطالعات، نمونه‌ها در فرمالین فیکس و با استفاده از روش COX-2 رنگ‌آمیزی شدند. در این روش برش‌های ۶ میکرومتری بر روی اسلایدهای سیالینیزه شده، منتقل شدند، سپس برش‌ها دی‌واکسه و دهیدراته شده، و با استفاده از H2O2 فعالیت پراکسیدازهای اندوژن مهار و آنتی‌ژن رتریوال صورت گرفت. در ادامه، اسلایدها در آنتی‌بادی اولیه Anti-COX-2 انکوبه شدند، سپس با استفاده از سیستم اویدین بیوتین، واکنش ایمنی کمپلکس‌ها مشخص گردید و رنگ‌آمیزی مخالف با استفاده از هماتوکسیلین مایر انجام شد (۱۶). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های کروسکال والیس و من‌ویتنی صورت گرفت و $p<۰/۰۵$ سطح معنی‌داری اختلاف‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار وزن سه گروه مورد مطالعه، قبل و بعد از مداخله در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. اختلاف بین گروه‌ها از نظر وزن قبل از مداخله به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (آزمون کروسکال والیس)، ولی بعد از مداخله اختلاف سه گروه از نظر وزن معنی‌دار شد ($p<۰/۰۰۹$، آزمون کروسکال والیس). با استفاده از آزمون من‌ویتنی مشخص گردید اختلاف وزن گروه کنترل با گروه آزمایش اول ($p<۰/۰۰۸$) و گروه کنترل با گروه آزمایش دوم ($p<۰/۰۰۸$) معنی‌دار می‌باشد. اختلاف وزن گروه آزمایش اول و دوم به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. میانگین تغییرات (MD) و فاصله اطمینان مقادیر وزنی (CL) به ترتیب در مقایسه گروه کنترل با گروه آزمایش ۱ (MD=100.2gr & CI=90.37 to 110.02gr) و در مقایسه گروه کنترل با گروه آزمایش ۲، (MD=106.4gr & CI=97.87 to 114.92gr) بود. براساس این نتایج می‌توان گفت پس از مداخله (در زمان نمونه‌برداری) تفاوت وزنی در دو گروه آزمایش ۱ و ۲، در مقایسه با گروه کنترل بیش از ۱۰۰ g بوده است که تفاوت مربوطه ناشی از کاهش وزن گروه‌های آزمایش می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

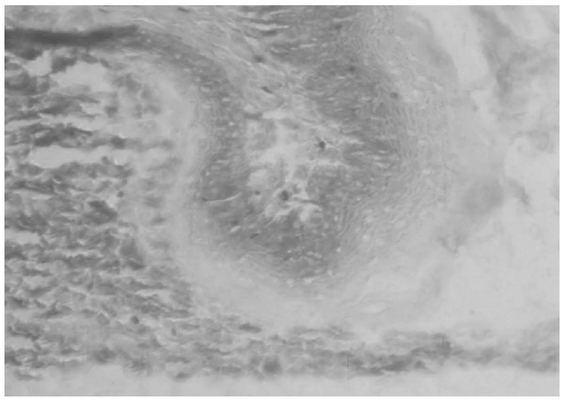
جدول شماره ۱: توزیع حیوانات براساس میانگین و انحراف معیار وزن، قبل و بعد از مداخله در گروه‌های کنترل، آزمایش ۱ و ۲

زمان / گروه‌ها	وزن در شروع آزمایش	وزن در زمان نمونه‌گیری
کنترل	۲۷۲/۸±۱۳/۵۴	۳۲۷/۴±۱۳/۳۹
آزمایش ۱	۲۹۶/۴±۱۱/۱۹	۲۲۴/۲±۹/۵۷
آزمایش ۲	۲۷۰/۶±۱۱/۶۴	۲۱۸/۶±۶/۹۴

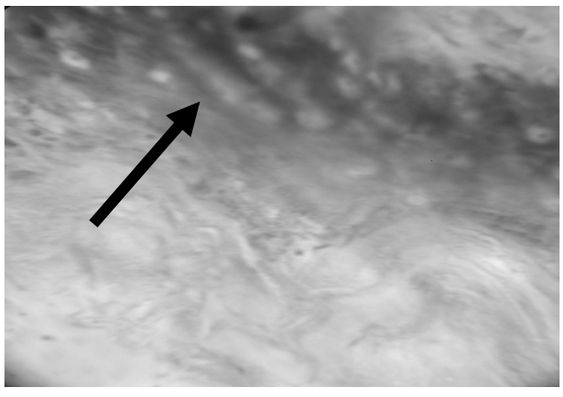
اختلاف وزن گروه‌ها قبل از آزمایش معنی‌دار نبود، ولی بعد از آزمایش بین وزن گروه کنترل با گروه آزمایش اول و دوم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (در هر دو مورد، $p<۰/۰۰۸$). پس از ۲۰ هفته از شروع آزمایش، نمونه‌های آنتروم معده هر سه گروه به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق در کیت سریع اوره‌آز قرار گرفتند. در گروه آزمایش ۱ (گروهی که به آن هلیکوباکتر پیلوری تلقیح شده بود) کیت اوره‌آز زرد رنگ به صورتی متمایل شد (اوره‌آز مثبت)، در دو گروه کنترل و آزمایش ۲ هیچ تغییری در کیت اوره‌آز مشاهده نگردید (اوره‌آز منفی) (شکل شماره ۱). فعالیت اکسیدازی و کاتالازی کلنی‌های حاصل از کشت معده گروه آزمایش شماره ۱ مثبت بود، همچنین بررسی مورفولوژی باکتری‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و عدم تولید SH_2 و تست اندول منفی دلیل بر وجود هلیکوباکتر پیلوری در گروه آزمایش ۱ بود، اما در گروه کنترل و در گروه آزمایش ۲ موارد فوق‌الذکر دیده نشد.

شکل شماره ۱: کیت اوره‌آز مثبت (پیکان) معده گروه آزمایشی شماره ۱ در مقایسه با کنترل نشان داده شده است.

نتایج مطالعات بافت‌شناسی نشان داد در گروه آزمایش ۱ (هلیکوباکتر پیلوری)، شواهدی از پرخونی لایه مخاطی معده، التهاب معده، تکثیر سلول‌های گلاندولار، ریزش سلول‌های اپی‌تلیومی در فضای معده، بی‌نظمی غشای پایه، تهاجم سلول‌های غدد به‌ویژه در قسمت قاعده‌ای به لایه عضله مخاطی وجود دارد. در بررسی‌های میکروسکوپی، متاپلازیای ازوفاژیال در ناحیه کاردیا دیده شد. در گروه آزمایش ۲ (MNU) نیز تغییرات مشاهده شده مشابه با گروه آزمایشی شماره ۱ بود و آثاری از تخریب سلول‌های اپی‌تلیومی به لایه عضله مخاطی وجود داشت. سلول‌های بخش گلاندولار ویژگی سلول‌های در حال تقسیم را دارند، متاپلازیای ازوفاژیال نیز در این گروه مشاهده گردید (شکل شماره ۲ و ۳). در رنگ‌آمیزی گیمسا کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در مخاط دیده شد (شکل شماره ۳). همچنین در این بررسی ارتشاح لکوسیت‌های تک‌هسته‌ای و چند هسته‌ای و لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئر در لایه مخاطی مشاهده گردید. در موش‌های صحرایی گروه کنترل هیچ‌کدام از علائم فوق‌الذکر دیده نشد و اپی‌تلیوم نمای طبیعی داشت.



شکل شماره ۲: تصویر نمای هیستولوژیک ناحیه معده گروه آزمایشی شماره ۱ را نشان می‌دهد که در آن متاپلازیای ازوفاژیال مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی ۱۰۰×).

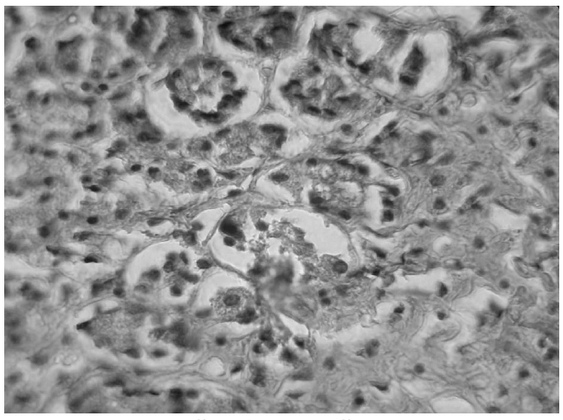


شکل شماره ۳: تصویر نمای هیستولوژیک ناحیه معده گروه آزمایشی شماره ۱ را نشان می‌دهد. متاپلازیای ازوفاژیال و کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری (توسط پیکان) در لایه سطحی مخاط نشان داده شده است (رنگ‌آمیزی گیمسا بزرگنمایی ۱۰۰×).

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات هیستوشیمیایی نشان داد بیان پروتئین COX-2 از زمان ۲۰ هفته بعد از القای سرطان در گروه آزمایش ۱ و گروه آزمایش ۲ قابل تشخیص است. در گروه آزمایش ۱ هلیکوباکتر پیلوری سلول‌های COX-2 هم در لایه مخاط و هم زیر مخاط لامیناپروپریا مشاهده شدند (به رنگ قهوه‌ای تیره در شکل شماره ۴) و در گروه آزمایش ۲ (MNU) نیز بیان پروتئین COX-2 در لایه مخاطی و زیر مخاطی دیده شد. تحقیق حاضر نشان داد سلول‌های COX-2 مثبت به‌ویژه در نواحی که متاپلازیای ازوفازیال روی داده است، حضور بیشتری دارند و قابل مشاهده هستند.



شکل شماره ٤: تصویر ناحیه آنتروم معده گروه آزمایشی شماره ۱ را نشان می‌دهد. متاپلازیای بافت گلاندولار معده به درون لایه‌های زیرین مشاهده می‌شود. سلول‌های Cox2+ نمای تیره‌ای دارند (رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی Anti Rat Anti COX-2 بزرگنمایی ×٤٠).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد در شروع آزمایش میانگین وزن حیوانات در سه گروه کنترل، آزمایش ۱ و آزمایش ۲ (با توجه به تقسیم تصادفی نمونه‌ها) تقریباً یکسان و بدون تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد، همچنین در زمان نمونه‌گیری و پس از مداخله، بین وزن گروه کنترل با گروه آزمایش اول و نیز گروه کنترل با گروه آزمایش دوم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (در هر دو مورد $p\leq ۰/۰۰۸$)، ولی اختلاف وزن دو گروه آزمایشی معنی‌دار نبود. کاهش وزن، یکی از فاکتورهای مهم در طی مراحل ایجاد سرطان می‌باشد، این مطلب توسط دیگر محققین نیز به اثبات رسیده است (۱۹،۱۸). مطالعه حاضر نشان داد در مدل حیوانی، عفونت هلیکوباکتر پیلوری سبب ایجاد تغییراتی می‌شود که منطبق با تغییرات مشاهده شده در هیستوپاتولوژی سرطان معده می‌باشد در بررسی‌های گذشته نیز برخی از محققین اثبات کرده‌اند که عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از عوامل مهم در بیماری‌های معدی و اثنی‌عشر است و می‌تواند به‌عنوان یکی از فاکتورهای ایجادکننده التهاب معده و زخم‌های گوارشی و مستعدکننده سرطان معده باشد (۱۷،۹،۱). در این تحقیق حضور هلیکوباکتر پیلوری در معده و کلونیزاسیون این باکتری در گروه آزمایشی توسط کشت باکتری و کیت سریع اوره‌آز اثبات گردید. این روش به‌عنوان یک روش استاندارد توسط محققین دیگر نیز در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری پذیرفته شده است (۲۰،۱۷،۱۵،۱۱). به‌علاوه، در این مطالعه با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا، کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در معده نشان داده شد. رنگ‌آمیزی گیمسا به‌عنوان یک پروتکل استاندارد در بررسی کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های هیستولوژیکی تأیید شده است (۱۳). این تکنیک ساده از آن جهت مهم است که می‌تواند به‌طور همزمان تغییرات کلونیزاسیون باکتریایی با تغییرات هیستولوژیکی معده را نشان دهد که در این بررسی با موفقیت انجام گردید. مطالعات نشان داده است سرطان به دلیل وقایع چند مرحله‌ای مولکولی- سلولی به‌وجود می‌آید (۲۱،۱۳). در بحث مهار و درمان سرطان، مهار وقایع مولکولی القاکننده سرطان قطعاً مهم‌تر از پروتکل‌های درمانی است (۲۱،۱۳). پروتئین COX-2 پروتئینی است که منجر به افزایش سنتز پروستاگلاندین‌ها در ایجاد التهاب می‌شود. مطالعات نشان داده است این پروتئین یکی از عوامل اصلی در ایجاد بدخیمی و تومورهای سرطانی است (۲۳،۲۲،۲۰). اخیراً محققین نشان داده‌اند بین COX-2 و بدخیمی‌ها، ارتباط مستقیم وجود دارد و بیان سلول‌های COX-2 یکی از مهم‌ترین مسیرهای ایجاد سرطان می‌باشد (۲۵،۲۲،۲۰،۱۳). در برخی مطالعات مشخص شده است پروتئین COX-2 در سرطان کولون، ریه، معده، و مری بیان می‌شود (۱۳). در گروه‌های آزمایشی، یافته‌های این مطالعه نشان داد استفاده از MNU سبب می‌شود تا سلول‌های COX-2 در مخاط معده بیان شود، مطالعات دیگر محققین نیز بیان سلول‌های COX-2 را در مدل‌های سرطانی ایجاد شده، تأیید می‌کند (۱۷،۱۶،۱۳). مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی این تحقیق در گروه آزمایشی نشان داد با کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری، سلول‌های COX-2 بیان می‌شود، و مسیر سرطان معده القا شده توسط هلیکوباکتر پیلوری، باعث

www.SID.ir

Archive of SID

بروز بیان پروتئین COX-2 می‌گردد. مطالعات دیگر محققین نیز نشان داده است هلیکوباکترپیلوری باعث بروز پروتئین COX-2 در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۳،۲۴،۲۵). در مطالعه حاضر مشخص گردید هلیکوباکترپیلوری می‌تواند در دوره زمانی ۲۰ هفته از شروع آزمایش سبب تغییرات هیستوپاتولوژیکی مانند متاپلازیا، آدنوکارسینوما و التهاب‌های شدیدی در معده شود. همچنین در این خصوص، بررسی‌های دیگر محققین در زمان‌های ۲۴ و ۳۶ و ۵۲ هفته از آزمایش، بیانگر این مطلب می‌باشد (۱۳،۲۰،۲۱). مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نیز نشان داد در همین زمان پروتئین COX-2 در مخاط معده گروه‌های آزمایش بیان می‌شود. لازم به ذکر است که در خصوص بیان این پروتئین در این محدوده زمانی تاکنون گزارشی از دیگر محققین یافت نشده است. در مطالعه حاضر نشان داده شد به دنبال کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری، بیان پروتئین COX-2 در مراحل اولیه ایجاد سرطان معده روی می‌دهد. این امر می‌تواند در درمان و پیشگیری از سرطان در مراحل اولیه حایز اهمیت باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد هلیکوباکتر پیلوری باعث کاهش معنی‌داری در وزن حیوانات شده و از لحاظ تغییرات هیستوپاتولوژی، متاپلازیای ازوفاژیال در معده موش‌های صحرایی ایجاد می‌کند و در طی این مراحل پروتئین COX-2 بیشتری نیز بیان می‌گردد. لذا می‌توان فرضیه ریسک فاکتور بودن هلیکوباکتر پیلوری را در ایجاد سرطان تأیید نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی، آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی و میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کردستان در انجام این تحقیق کمال تشکر را داریم.

References:

1. Pellicano R, Fagoonee S, Palestro G, Rizzetto M, Ponzetto A. Intestinal Metaplasia, Dysplasia, Gastric Cancer and Helicobacter Pylori: Epidemiological Observations. Minerva Med 2005 Feb; 96(1):1-10.

2. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF. Changing Patterns in the Incidence of Esophageal and Gastric Carcinoma in the United States. Cancer 1998 Nov; 83(10):2049-53.

3. Noguchi Y, Yoshikawa T, Tsuburaya A. Is Gastric Carcinoma Different between Japan and the United States? Cancer 2000;89:2237-46.

4. Masserat S, Saberi-Firoozi M, Soleimani A, et al. Peptic Ulcer Disease Irritable Bowel Syndrome and Constipation in Two Populations in Iran. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995;7:427-33.

5. Warren JR. Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis. Lancet 1983;1:1273-5.

6. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter Pylori Infection: A Clinical Overview. Digestive and Liver Disease 2008;40:619-626.

7. Masae Tatematsu, Koji Nozaki, Tetsuya Tsukamoto. Helicobacter Pylori Infection and Gastric Carcinogenesis in Animal Models. Gastric Cancer 2003;6:1-7.

8. Kashiwagi H. Ulcers and Gastritis. Endoscopy 2005;37:110-5.

9. You WC, Li JY, Zhang L, Jin ML, Chang YS, Ma JL, et al. Etiology and Prevention of Gastric Cancer: A Population Study in a High-Risk Area of China. Chin J Dig Dis 2005;6(4):149-54.

10. Pasechnikov VD, Chukov SZ, Kotelevets SM, Mostovov AN, Mernova VP. Possibility of Non-Invasive Diagnosis of Gastric Mucosal Precancerous Changes. World J Gastroenterol 2004 Nov; 10(21):3146-50.

11. Li H, Kalies I, Mellgard B, et al. A Rat Model of Chronic Helicobacter Pylori Infection. Studies of Epithelial Cell Turn Over and Gastric Ulcer Healing. Scand J Gastroenterol 1998;33:370-8.

12. Yamac D, et al. Cyclooxygenase-2 Expression and Its Association with Angiogenesis, Helicobacter Pylori, and Clinicopathologic Characteristics of Gastric Carcinoma. Pathology Research and Practice 2008;204(8):527-536.

13. Nam KT, et al. The Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor Nimesulide Prevents Helicobacter Pylori-Associated Gastric Cancer Development in a Mouse Model. Clin Cancer Res 2004;10(23):8105-13.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Achyut B, et al. Role of Cyclooxygenase-2 Functional Gene Polymorphisms in Helicobacter Pylori Induced Gastritis and Gastric Atrophy. Molecular and Cellular Biochemistry 2009;321(1-2):103-109.

15. Yanaoka K, et al. Preventive Effects of Etodolac, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, on Cancer Development in Extensive Metaplastic Gastritis,a Helicobacter Pylori-Negative Precancerous Lesion. Int J Cancer 2009;32(2):15-21.

16. Beam SL, Rassnick KM, Moore AS, Mcdonough SP. An Immunohistochemical Study of Cyclooxygenase-2 Expression in Various Feline Neoplasms. Vet Pathol 2003;40:496-500.

17. Tetsuya Tsukamoto, Tsutomu MIizoshita, Masae Tatematsu. Animal Models of Stomach Carcinogenesis. Toxicologic Pathology 2007;35:636-648.

18. Khalid U, Spiro A, Baldwin C, Sharma B, McGough C, Norman AR, Eisen T, O'Brien MER, Cunningham D, Andreyev HJ. Symptoms and Weight Loss in Patients with Gastrointestinal and Lung Cancerat Presentation. Care Cancer 2007;15:39-46.

19. Aminah Jatoi. Pharmacologic Therapy for the Cancer Anorexia/Weight Loss Syndrome: A Data-Driven, Practical Approach. The Journal of Supportive Oncology 2006;4:499-502.

20. Nobuyuki Shimizu, Ken-Ichi Inada, Hayao Nakanishi, Tetsuya Tsukamoto, Yuzuru Ikehara, Michio Kaminishi, Shu Kuramoto, Atsushi Sugiyama, Tsutomu Katsuyama, Masae Tatematsu. Helicobacter Pylori Infection Enhances Glandular Stomach Carcinogenesis in Mongolian Gerbils Treated with Chemical. Carcinogens Carcinogenesis 1999 April; 20(4):669-676.

21. Tomohiko Adachi, Yoshitsugu Tajima, Tamotsu Kuroki, Takehiro Mishima, Amane Kitasato. Noritsugu Tsuneoka. Chemopreventive Effects of a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor (Etodolac) on Chemically Induced Intraductal Papillary Carcinoma of the Pancreas in Hamsters. Carcinogenesis 2008;29(4):830-833.

22. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji MS, Tsujii, Sun W, Gunawan ES, Hori M. Helicobacter Pylori Infection Induces Cyclooxygenase-2 Expression in Human. Gastric Mucosa 1998 November; 59(5):313-316.

23. Satoru Takahashi, Takuya Fujita, Akira Yamamoto. Role of Cyclooxygenase-2 in Helicobacter Pylori-Induced Gastritis in Mongolian Gerbils. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;279:G791-G798.

24. Walduck AK, et al. Identification of Novel Cyclooxygenase-2-Dependent Genes in Helicobacter Pylori Infection in Vivo. Molecular Cancer 2009;8:22-35.

25. Q Li, N Liu, B Shen, Zhou L, Wang Y, J Sun, Z Fan, RH Liu. Helicobacter Pylori Enhances Cyclooxygenase-2 Expression Via p38MAPK/ATF-2 Signaling Pathway in MKN45 Cells. Cancer Lett 2009 Jun; 8;278(1):97-103.

www.SID.ir