تعیین پلی‌مورفیسم ژن Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma در بیماران مبتلا به عفونت با هلیکوباکتر پیلوری

حسین گودرزی [۱و۲](Ph.D)، سیماالسادات سیدجوادی [۲](M.Sc)، مهدی گودرزی [*۲](M.Sc)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات عفونی گرمسیری*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی*

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARγ) یک فاکتور رونویسی وابسته به لیگاند است که در فرایند بیماری‌های مختلف از جمله فرایندهای التهابی و سرطان دخیل است. هدف از این پژوهش بررسی پلی‌مورفیسم ژن PPARγ و ارتباط آن با عفونت هلیکوباکتر پیلوری و بیماری‌های دستگاه گوارش در بیماران بود.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ۲۰۰ بیمار مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری وارد مطالعه شدند. تشخیص قطعی بیماران مبتلا به هلیکوباکتر بر اساس روش‌های هیستولوژی، تست اوره آز سریع، کشت، الیزا و PCR صورت پذیرفت. تعیین پلی‌مورفیسم ژن PPARγ بر اساس روش PCR-RFLP صورت پذیرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه ۲۰۰ بیمار (۴ سرطان معده ، ۱۴۱ التهاب معده ، ۳۵ زخم پتیک ، ۱۸ زخم دوازدهه، ۲ بیمار هم‌زمان مبتلا به زخم پتیک و زخم دوازدهه) با عفونت تایید شده هلیکوباکتر پیلوری وارد مطالعه شدند. فراوانی آلل PPARγ G (Ala12)5 درصد به‌دست آمد که بین پلی‌مورفیسم این ژن و ابتلا به سرطان معده (P=۰/۰۰۴) و گاسترتیس (P=۰/۰۰۷) ارتباط معنی‌داری حاصل شد. فراوانی آلل PPARγ GC (Pro12Ala) ۳۵ درصد گزارش شد که در نهایت ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم این ژن و زخم دوازدهه (P=۰/۰۳) و التهاب معده (P=۰/۰۰۲) به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم Pro12Ala ژن PPARγ ارتباط معنی‌داری با سرطان معده و التهاب معده داشته و به عنوان یک مارکر ژنتیکی مستعد برای ابتلا به این دو بیماری در حضور عفونت با هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. در پایان این پژوهش بیانگر ارتباط موثر پلی‌مورفیسم ژن PPARγ و عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در گسترش سرطان معده و زخم پتیک و التهاب معده بود.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، پلی‌مورفیسم ژن PPAR-γ، سرطان معده

مقدمه

عفونت با هلیکوباکتری پیلوری گسترش جهانی دارد اما میزان شیوع آن در کشورهای مختلف و حتی جمعیت‌های مختلف یک کشور نیز متفاوت است [۱]. آمار مبتلایان در برخی کشورهای در حال توسعه به بیش از ۹۰٪ می‌رسد [۲] این در حالی است که در کشورهای پیش‌رفته و صنعتی ۵۰-۲۵ درصد مردم آلوده هستند [۲،۳]. در بخشی از افراد عفونت‌یافته با این باکتری، تظاهرات بالینی به صورت التهاب معده , زخم معده, زخم اثنی‌عشر و آتروفی مخاط معده است. یکی از مهم‌ترین عواقب عفونت با این باکتری لنفوم و

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۱۰۸۱۰۴ نمابر: ۰۲۱-۲۳۸۷۲۵۴۸

Email: m.goudarzi@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۸

Archive of SID

www.SID.ir

کارسینومای معدی [۴]. پاتوژنسیته هلیکوباکتر پیلوری به عوامل مختلفی نظیر باکتری و عوامل مرتبط با میزبان نسبت داده شده است. اخیراً توجه زیادی به برخی فاکتورهای میزبان و نقش آن‌ها در کنترل سرطان شده است [۵]. یکی از مهم‌ترین این عوامل Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARγ) است. این ژن عضوی از سوپر فامیلی رسپتورهای هورمونی در هسته است که نقش مهمی در تمایز سلول‌ها و تنظیم متابولیسم دارد. در بافت‌هایی که سطح چربی زیاد دارند و یا سلول‌های اپی‌تلیال آن‌ها زیاد است به مقدار زیادی بیان می‌شود. PPAR-γ با تشکیل هتروداپمر با رسپتور رتینوئید X در تنظیم بیان دیگر ژن‌ها موثر است.

این ژن رشد سلول‌های سرطانی را متوقف می‌کند و سبب القاء آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌شود [۶] و به عنوان یکی از فاکتورهای میزبان در مهار برخی سرطان‌ها مثل سرطان کولورکتال است. بیان PPAR-γ انسانی اولین بار در سلول‌های هماتوپویتیک مشخص شد ولی بعداً مشخص گردید که در کبد، طحال، مغز، دستگاه گوارش، بیضه و ماهیچه‌های اسکلتی نیز بیان می‌شود [۸،۷]. PPAR-γ دارای دو ایزوفرم مشخص γ۲ و γ۱ است. مهم‌ترین پلی‌مورفیسم در ژن PPAR-γ2 (Pro12Ala) یک موتاسیون میس سنس در کدون ۱۲ اگزون B ژن PPAR-γ است که در نهایت بازخورد این جابه‌جایی تغییر فعالیت پروتئین ساختمانی و کاهش عمل‌کرد ژن PPAR-γ2 را به دنبال خواهد داشت [۱۰،۹] به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم Pro12Ala در کاهش ابتلا به دیابت تیپ II و نیز در کاهش ریسک سرطان کلورکتال موثر باشد [۱۱] ولی مطالعات انجام شده در مورد سرطان پروستات، سرطاناندومتر و نیز سرطان معده صدق نمی‌کند [۱۴،۱۳،۱۲].

با توجه به این‌که الگوی پلی‌مورفیسم این ژن در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت می‌باشد هدف از این تحقیق تعیین الگوی پلی‌مورفیسم این ژن در بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش PCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه و نمونه‌گیری. این تحقیق بر روی ۳۱۲ بیمار مشکوک به هلیکوباکترپیلوری که دارای علائم بالینی مرتبط، با عفونت به این باکتری بودند صورت گرفت. از ۳۱۲ بیمار ذکر شده نمونه بیوپسی گرفته شد. پیش از جمع‌آوری نمونه از تمامی بیماران رضایت‌نامه دریافت شد. بیمارانی که طی سی روز گذشته از آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای ضدالتهابی غیر استروییدی و مهارکننده‌های پمپ پروتون استفاده کرده بودند از مطالعه خارج شدند. جمعیت مورد مطالعه این تحقیق، بیماران مراجعه‌کننده دارای علایم بالینی به بخش گوارش بودند. تقسیم بیماران به زخم پتیک ، زخم دوازدهه، التهاب معده و سرطان معده بر اساس یافته‌های آندوسکوپی و آزمایشات هیستولوژیکی صورت پذیرفت. از هر بیمار یک نمونه بیوپسی از قسمت آنتروم بدون آلودگی با موکوس ناحیه و یک نمونه خون محیطی گرفته شد. عفونت با هلیکوباکتر پیلوری بر اساس آزمایشات کلینیکی، هیستوپاتولوژی، کشت، تست اوره آز سریع و الیزا تایید شد. افرادی که حداقل یک تست از چهار تست در مورد آن‌ها مثبت شد وارد مطالعه شدند. در طی هر آندوسکوپی بر روی نمونه‌های بیوپسی آزمایشات هیستوپاتولوژی، کشت و تست اوره آز سریع و بر روی نمونه‌های خون تست الیزا، استخراج DNAو انجام PCR جهت تعیین پلی‌مورفیسم ژن PPAR-γ صورت گرفت. در آزمایشات هیستوپاتولوژی نمونه‌های بیوپسی ابتدا در فرمالین ۱۰٪ و سپس در بلوک‌های پارافینه فیکس شدند از نمونه بافت قرار داده شده در بلوک‌های پارافینه با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های نازک ۵ میکرومتری تهیه و با رنگ هماتوکسیلین ائوزین (HE) جهت آنالیز مورفولوژیکی رنگ‌آمیزی شد. تعیین تایپ هیستولوژیکی سرطان معده بر اساس طبقه‌بندی Lauren صورت پذیرفت. در روش کشت، نمونه‌های بیوپسی در محیط انتقالی نیمه جامد استوارت (Stuart's medium) طی مدت ۴-۶ ساعت به آزمایشگاه منتقل و در محیط اختصاصی هلیکوباکتر در دمای ۳۷ درجه و در شرایط میکروآئروبیک و رطوبت لازم به مدت ۷-۵ روز انکوبه شدند و در صورت

Archive of SID

www.SID.ir

میسر نبودن کشت در مدت زمان مقرر شده نمونه‌ها در دمای ۴ درجه جهت کشت نگهداری شدند [۱۵]. روش تشخیصی دیگر تست اوره آز سریع (Rapid urease test, RUT) شرکت فرمنتاز می‌باشد. در این روش نمونه‌های بیوپسی بلافاصله پس از تهیه در محلول اوره کریستینسن قرار داده شد و در اثر اوره آز تولیدی توسط هلیکوباکتر رنگ محیط تغییر پیدا کرد [۱۶]. در روش الیزا از هر بیمار ۷ سی‌سی خون محیطی به‌وسیله سرنگ گرفته و در لوله‌های فالکون, حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA) جمع‌آوری گردید. بر روی نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، تست ELISA توسط کیت الیزا (Genesis Diagnostics Ltd, UK) به منظور تعیین حضور ایمنوگلوبولین (IgG) G ضد هلیکوباکتر پیلوری انجام شد. حضور آنتی‌بادی (IgG) در خون بیماران مبتلا به وسیله تست الیزا تایید گردید [۱۷]. تمامی تست‌ها و آنالیزها به‌صورت دو نسخه‌ای (duplicate) همراه با کنترل و استاندارد انجام شد. در نهایت میزان آنتی‌بادی ضد هلیکوباکتر پیلوری (IgG) در جذب نوری ۴۵۰ nm خوانده شد.

استخراج DNA و انجام PCR. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل با استفاده از متدNaI صورت گرفت [۱۸]. بدین صورت به هم حجم µl ۱۰۰۰ از خون کامل هپارینه شده، M NaI ۶ و کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه و در دور g ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس لایه رویی دور ریخته شد و به DNA رسوب کرده در میکروتیوپ ایزوپروپانول اضافه شد در نهایت DNA استخراج شده با الکل ۷۰٪ شستشو و در بافر TE با pH 8.0 نگهداری شد. پلی‌مورفیسم ژن Peroxisome proliferator-activated Pro12Ala receptor-gamma با استفاده از روش PCR-RFLP تعیین شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق از شرکت TIB MOLBIOL syntheselabor GmbH (berlin,Germany) و به صورت زیر بود:

Forward 5-GCC AAT TCA AGC CCA GTC-3,
Reverse 5-GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G-3 [۱۹].

توسط پرایمرهای فوق یک قطعه به طول ۲۷۰ جفت باز تکثیر شد. در هر واکنش به حجم µl ۳۰ مقدار µl ۳ از بافر ۱۰x و µl ۱/۵ از محلول MgCl2 با غلظت mM ۵۰ و مقدار µM ۱۰۰ از هر کدام dNTP شرکت فرمنتاز و pmol ۵ از هر پرایمر R و F و U ۰/۷۵ از Taq polymerase شرکت فرمنتاز به حجم کلی محلول اضافه و بقیه آن تا حجم µl ۳۰ با آب مقطر دیونایز شده تکمیل گردید. برای انجام PCR از step PCR ۳ استفاده کردیم که شامل شرایط زیر می‌باشد و این سیکل ۳۵ بار تکرار شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال الگو به پرایمر(Annealing) در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش(Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. آب خالص به عنوان کنترل منفی جهت تکثیر استفاده شد. در نهایت قطعه‌ای به طول ۲۷۰ جفت بازی را تکثیر نمودیم.

RFLP و تعیین پلی‌مورفیسم ژن . PPAR-γ. بعد از اتمام PCR تمامی محصولات روی ژل آگارز ۲/۵٪ الکتروفورز شدند و نمونه‌هایی که از نظر وجود ژن PPAR-γ مثبت بودند و دارای باند خوب و قوی بودند با استفاده از آنزیم برشی BstUI شرکت فرمنتاز برش زده شدند برای انجام این کار در یک واکنش µl ۳۰ مقدار µl ۱۰ محصول PCR را باµl ۳ بافر آنزیم و ۵ واحد از آنزیم مورد نظر (تقریباً ۰/۵ میکرولیتر) و مابقی آن تا µl ۳۰ را آب مقطر دیونیزه اضافه کرده و مدت ۸ ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه قرار دادیم سپس با غیر فعال کردن آنزیم در ۶۰ درجه نتایج الگوی هضم شده نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲/۵٪ الکتروفورز و مشاهده شد به طوری که اگر تنها یک باند ۲۷۰ جفت بازی مشاهده شود ژنوتیپ CC (Pro12Pro) و اگر دو باند ۲۲۷ جفت بازی و ۴۳ جفت بازی مشاهده شود ژنوتیپ GG (Ala 12Ala) و اگر سه قطعه ۲۷۰ و ۲۲۷ و ۴۳ جفت بازی مشاهده شود ژنوتیپ CG (Pro12Ala) می‌باشد. برای تایید نتایج RFLP تمامی

Archive of SID

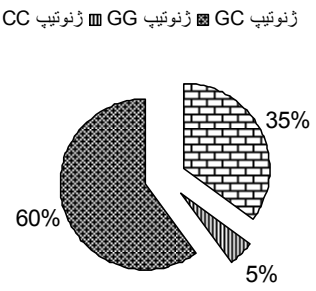
www.SID.ir

آزمایشات دو بار تکرار شد. تمامی آنالیز آماری این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 12.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) و تست آماری کای دو (Chi-square)انجام پذیرفت.مقدار P کم‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

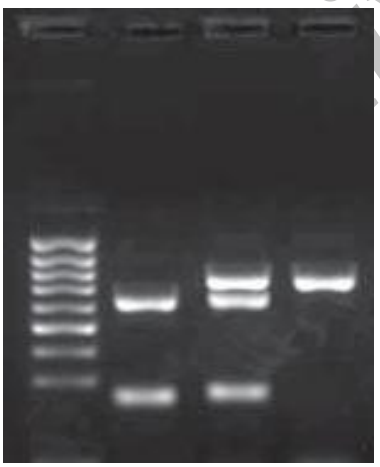
از ۳۱۲ بیمار که مشکوک به هلیکوباکتر پیلوری بودند ۲۰۰ نمونه با هیستوپاتولوژی، کشت، تست اوره آز سریع و نیز تست الیزا مثبت وارد مطالعه شدند. میانگین سنی بیماران ۴۶/۸ سال (۷۵-۲۸) بود. از تعداد ۲۰۰ بیمار مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری ۱۲۳ نفر (۶۱/۵٪) مرد و ۷۷ نفر (۳۸/۵٪) زن بود. در این مطالعه هیستولوژی با اختصاصیت بالای ۹۵٪ و حساسیت بالای ۹۰٪ و پس از آن کشت با اختصاصیت ۹۵٪ و حساسیت ۸۵٪ و الیزا با اختصاصیت ۹۰ و حساسیت کم‌تر از ۸۵٪ و تست اوره آز سریع با اختصاصیت ۷۵ و حساسیت کم‌تر از ۸۰٪ تست‌هایی هستند که از نظر تشخیص در عفونت با هلیکوباکتر پیلوری بیش‌ترین مورد استفاده را دارند.

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن PPAR-γ و با استفاده از تکنیک PCR قطعه ۲۷۰ جفت بازی را تکثیر نمودیم و آن‌گاه با استفاده از آنزیم برشی BstUI تمایز موجود در قطعات که بیانگر پلی‌مورفیسم ژن PPAR-γ است را تشخیص دادیم (شکل ۱) از ۲۰۰ بیمار تعداد ۳۵ نفر (۱۷/۵٪) زخم معده، ۱۸ نفر زخم دئودنال (۹٪)، ۲ نفر هم مبتلا به زخم معده و هم مبتلا به زخم دئودنال (۱٪)، ۱۴۱ نفر مبتلا به التهاب معده (۷۰/۵٪) و ۴ نفر مبتلا به سرطان معده (۲٪) بودند. از مجموع ۱۲۰ بیماری که دارای ژنوتیپ CC بودند بیش‌ترین آن‌ها (۷۸ نفر) مبتلا به التهاب معده و کم‌ترین آن‌ها (۱ نفر) مبتلا به سرطان معده بود.۱۰ بیمار مبتلا به ژنوتیپ GG فقط بیمارانی بودند که مبتلا به التهاب معده، زخم دئودنال و سرطان معده بودند. از بیمارانی که دارای ژنوتیپ GC بودند بیش‌ترین آن‌ها (۵۸ نفر) مبتلا به التهاب معده و کم‌ترین آن‌ها (۲ نفر) مبتلا به زخم دئودنال بودند.



شکل ۱. فراوانی ژنوتیپ های مختلف PPAR – γ

از مجموع ۲۰۰ نمونه که توسط آنزیم برشی BstUI تحت تاثیر قرار گرفتند الگوی برشی متفاوتی را نشان دادند که بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ و با استفاده از اتیدیوم بروماید باندهای ۲۷۰ و ۲۲۷ و ۴۳ جفت نوکلئوتید تولید نمودند. که ۱۲۰ نمونه دارای باند ۲۷۰ جفت بازی و ۱۰ نمونه دارای باندهای ۲۲۷ و ۴۳ جفت بازی و ۷۰ نمونه دارای سه باند ۲۷۰ و ۲۲۷ و ۴۳ بودند (شکل ۲).



شکل ۲. الگوی باند محصولات PCR-RFLP جهت تعیین پلی مورفیسم ژن **PPAR γ**

Lane M: ladder
lane 1: GG genotype (Ala12Ala)
lane 2: CG genotype (Pro12Ala)
lane 3: CC genotype (Pro12Pro)

فراوانی الگوی پلی‌مورفیسم(Pro12Pro) CC تعداد ۱۲۰ نمونه (۶۰٪) و فراوانی الگوی پلی‌مورفیسم (Ala12Ala) GG تعداد۱۰ نمونه (۵٪) و فراوانی الگوی پلی‌مورفیسم GC

Archive of SID

www.SID.ir

(Pro12Ala) تعداد ۷۰ نمونه (۳۵٪) به‌دست آمد. (جدول ۱) از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم GC و زخم دئودنال (P=۰/۰۳) و التهاب معده (P=۰/۰۰۲) و پلی‌مورفیسم GG و سرطان معده (P=۰/۰۰۴) و التهاب معده (P=۰/۰۰۷) وجود داشت (جدول ۲).

جدول ۱. فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف ژنγ PPAR و عوارض بالینی مرتبط با آن

عوارض بالینی	ژنوتیپ CC	ژنوتیپ GG	ژنوتیپ GC	جمع
زخم معده	۲۵	۰	۱۰	۳۵
زخم دئودنال	۱۴	۲	۲	۱۸
زخم معده+ زخم دئودنال	۲	–	–	۲
گاستریتیس	۷۸	۵	۵۸	۱۴۱
گاستریک سرطان	۱	۳	۰	۴
جمع	۱۲۰	۱۰	۷۰	۲۰۰

جدول ۲. ارتباط بین پلی مورفیسم ژن γ PPAR و عوارض بالینی ایجاد شده در بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری

نوع بیماری	ارتباط علایم بالینی با ژنوتیپ های مختلف P value	
	GC ژنوتایپ	GG ژنوتایپ
زخم معده	۰/۰۷	۰/۰۸
زخم دئودنال	۰/۰۳	۰/۵۹
گاستریتیس	۰/۰۰۲	۰/۰۲۷
گاستریک سرطان	۰/۱۹	۰/۰۰۴

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه پلی‌مورفیسم ژن PPARγ با عفونت هلیکوباکتر پیلوری و ارتباط این پلی‌مورفیسم با ابتلا به التهاب معده، زخم دئودنال و سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. ما فقط بیمارانی را مورد بررسی قرار دادیم که از نظر ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری مطابق با معیارهای در نظر گرفته شده مثبت تلقی می‌شدند. سپس بیماران مورد مطالعه از نظر عوارض بالینی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. PPAR-γ عضوی از سوپر فامیلی رسپتورهای هورمونی در هسته است. که نقش مهمی در تمایز سلول‌ها و تنظیم متابولیسم دارد. در بافت‌هایی که سطح چربی زیاد دارند و سلول‌های اپی‌تلیال آن‌ها زیاد است به مقدار زیادی بیان می‌شود تاکنون سه ساب تایپ از PPAR تاکنون شناسایی شده است (PPARδ و PPARα و PPARγ) ولی PPARγ مهم‌ترین ساب تایپی است که مورد مطالعه قرار گفته است [۲۰] PPAR با اتصال به گیرنده‌های خود باعث فعال‌سازی رونویسی از ژن‌های موثر در تنظیم و تمایز چربی و افزایش حساسیت بافت هدف به انسولین، التهاب، کارسینوژنزیس و تنظیم سیکل سلولی است [۲۰]. PPARγ در هر دوی اپیتلیوم نرمال و سرطانی معده بیان می‌شود فعال شدن PPARγ از رشد سلول‌های سرطانی معده جلوگیری می‌کند [۲۱]. تحقیقات نشان می‌دهد که درمان بالیگاندهای PPARγ (تروگلیتازون) باعث کاهش ابتلا به سرطان معده در موش که تحت تاثیر کارسینوژن‌ها قرار گرفته است می‌گردد [۲۲]. حضور پلی‌مورفیسم Ala12 در ارتباط با کاهش فعالیت PPARγ می‌باشد و ممکن است که باعث افزایش ریسک ابتلا به سرطان گردد. PPARγ هم‌چنین باعث تنظیم پاسخ‌های التهابی سلول میزبان در ارتباط با عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌گردد. فعال شدن مسیر PPARγ باعث کاهش آپیتوز القا شده توسط NF-kappa نوع B در عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های سرطانی اپیتلیال می‌گردد [۲۴،۲۳]. این بسیار محتمل است که هم‌زمانی عفونت با هلیکوباکتر پیلوری و پلی‌مورفیسم ژن PPARγ باعث افزایش مقاومت به آپیتوز خواهد شد. البته مطالعات تکمیلی برای تعیین ارتباط عفونت با هلیکوباکتر پیلوری و پلی‌مورفیسم ژن PPARγ در سلول‌های معده انسانی نیاز می‌باشد. از نظر فراوانی به ترتیب الگوی پلی‌مورفیسم (Pro12Pro) CC تعداد ۱۲۰ نمونه (۶۰٪) و الگوی پلی‌مورفیسم (Ala12Ala) GG تعداد۱۰ نمونه (۵٪) و الگوی پلی‌مورفیسم (Pro12Ala) GC تعداد ۷۰ نمونه (۳۵٪) به‌دست آمد. ما گزارش کردیم که الگوی پلی‌مورفیسم (Pro12Ala) GC در حضور عفونت با هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند به عنوان یک مارکر ژنتیکی برای ابتلا به زخم دئودنال و التهاب معده باشد و این در حالی است الگوی

Archive of SID

www.SID.ir

پلی‌مورفیسم (Ala12Ala) GG در حضور عفونت با هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند به عنوان یک مارکر ژنتیکی برای ابتلا به سرطان معده و التهاب معده باشد. در مطالعه حاضر روش تشخیصی هیستوپاتولوژی (روش تهاجمی)، کشت (روش غیر تهاجمی)، الیزا (روش ایمنولوژیکی) و اوره آز سریع (روش بر پایه محصولات متابولیک) به ترتیب بیش‌ترین حساسیت جهت تشخیص هلیکوباکتر پیلوری را دارا هستند که بانتایج حاصل از سایر پژوهش‌ها هم‌خوانی دارد این در حالی است که با توجه به تهاجمی بودن روش هیستوپاتولوژی سبب شده است که استفاده از این تست جهت مقاصد تشخیصی نسبت به سایر روش‌ها کاربرد کم‌تری داشته باشد. از طرف دیگر با توجه به گلد استاندارد بودن کشت و روش‌های هیستوپاتولوژی می‌توان از کشت به عنوان یک روش غیر تهاجمی مطمئن بهره جست [۱۷،۱۶،۱۵]. با توجه به پژوهش‌های انجام شده در این تحقیق برای دست‌یابی به تشخیص مطمئن هلیکوباکتر پیلوری می‌بایست از چندین روش تشخیصی توصیه شده به طور هم‌زمان برای شناسایی این باکتری استفاده کرد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ در کشور چین در مورد پلی‌مورفیسم ژن PPARγ صورت پذیرفت بیانگر این نکته است که فراوانی الل (Ala12) G ژن PPARγ از نظر آماری در بین بیماران سرطانی نسبت به بیماران گروه کنترل بالاتر بود در حالی که عفونت با هلیکوباکتر پیلوری شیوع بالاتری در بیماران گاستریگ سرطان داشت و بروز هم‌زمان الل G (Ala12) ژن PPARγ و عفونت هلیکوباکتر پیلوری ریسک ابتلا به سرطان معده را افزایش خواهد داد. این در حالی است که ژنوتیپ Ala12 در بیمارانی که از نظر ابتلا به هلیکوباکتر منفی گزارش شدند ابتلا به سرطان معده را افزایش نخواهد داد [۲۵].

در پژوهشی دیگر که در کشور ژاپن در سال ۲۰۰۶ در جمعیت بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری دارای علائم بالینی صورت گرفت مبین این نکته بود که پلی‌مورفیسم GC و GG در بیماران مبتلا به هلیکوباکتر می‌تواند به عنوان ریسک فاکتوری باشد که احتمال ابتلا به سرطان کلورکتال و سرطان معده را ۲۵-۵۰٪ افزایش خواهد داد [۲۶].

در بررسی دیگر که در کشور هند به منظور بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم Pro12Ala PPARγ و عفونت هلیکوباکتر پیلوری با بیماری سرطان معده و زخم پتیک انجام پذیرفت مشخص گردید که PPARγ G carrier ارتباط معنی‌داری با گاستریک آدنوکارسینوما و زخم پتیک داشت. این تحقیق نشان می‌دهد که هم‌زمانی حامل (Carrier) G و عفونت هلیکوباکتر پیلوری ریسک ابتلا به گاستریک آدنوکارسینوما و زخم پتیک را بالا خواهد برد. این در حالی است که پلی‌مورفیسم ژن PPARγ در بیماران بدون عفونت با هلیکوباکتر پیلوری تاثیری در ابتلا به گاستریک آدنوکارسینوما و زخم پتیک نخواهد داشت. به طور کلی مطالعه انجام شده تاییدکننده این مطلب است که پلی‌مورفیسم Pro12Ala PPARγ در ارتباط با گاستریک آدنوکارسینوما و زخم پتیک است و به عنوان یک مارکر ژنتیکی ابتلا به این دو بیماری در حضور عفونت با هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد [۱۹].

در مطالعات دیگری که در کشورهای آلمان و استرالیا و امریکا [۲۷] صورت پذیرفت حاکی از آن است که پلی‌مورفیسم GC و GG می‌تواند به‌عنوان ریسک فاکتور در ابتلا به سرطان معده، زخم معده و التهاب معده و سایر عوارض بالینی شدید مرتبط با هلیکوباکتر موثر باشد.

در نتیجه این مطالعه پیشنهاد می‌کند که پلی‌مورفیسم GC و GG می‌تواند به عنوان یک مارکر ژنتیکی ابتلا به زخم دئودنال، التهاب معده، سرطان معده در حضور عفونت با هلیکوباکتر پیلوری باشد. بنابراین پلی‌مورفیسم Pro12Ala PPARγ ممکن است که به عنوان یک فاکتور پیش‌گویی‌کننده در ابتلا به زخم دئودنال، التهاب معده، سرطان معده در حضور عفونت با هلیکوباکتر پیلوری باشد. از جانب دیگر مطالعه انجام شده بیانگر این نکته است که پلی‌مورفیسم ژن PPARγ در افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری متفاوت است و می‌تواند به عنوان زنگ خطری برای ابتلا به عوارض بالینی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری باشد. در این تحقیق متاسفانه

Archive of SID
www.SID.ir

امکان دست‌رسی به اطلاعات دموگرافیک مثل BMI و ریسک فاکتورهایی مثل کشیدن سیگار وجود نداشت و از طرف دیگر حجم نمونه مورد بررسی زیاد نبود که باعث ایجاد محدودیت‌هایی در قدرت آنالیز آماری گردید. پیشنهاد می‌شود که مطالعات با تمرکز بیش‌تر بر روی گروه‌های نژادی مختلف با حجم نمونه‌های بیش‌تر برای تایید ارتباط این پلی‌مورفیسم با ریسک ابتلا به سرطان معده، زخم معده و التهاب معده و سایر عوارض بالینی شدید مرتبط با هلیکوباکتر و هم‌چنین بررسی ارتباط فاکتورهای میزبان و فاکتورهای ژنتیکی هلیکوباکتر پیلوری مثل CagA, VacA, BabA که ریسک ابتلا به سرطان معده و زخم پتیک را افزایش می‌دهد انجام شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات عفونی گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و کلیه همکاران گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی و همکاران بیمارستان‌های تابعه دانشگاه شهید بهشتی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 1: 1311-1315.

[2] Pearson A.D, Murphy M.S, Eastham E.J, Nelson R, Laker M.F. Intestinal permeability in Crohn's disease .Arch Dis Child 1989; 64: 321–325.

[3] Feldman RA. Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by Helicobacter pylori. In: Achtman N, suerbaum S eds. Helicobacter pylori: molecular and cellular biology. Wymondham, United kingdom-Horizon Scientific press, 2001; 29-51.

[4] Rowland M, Kumar D, Daly L, O'Connor P, Vaughan D, Drumm B. Low rates of Helicobacter pylori reinfection in children. Gastroenterology 1999; 117: 3336-341.

[5] van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the CagA, VacA, iceA, Status of Helicobacter pylori. Gastroenterology 1998; 115: 58-66.

[6] Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptorsand cancers: complex stories. Nat Rev Cancer 2004; 4: 61-70.

[7] Nicol CJ, Yoon M, Ward JM, Yamashita M, Fukamachi K, Peters JM, Gonzalez FJ. PPARgamma influences susceptibility to DMBA-induced mammary, ovarian andskin carcinogenesis. Carcinogenesis 2004; 25: 1747-1755.

[8] Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, et al. Isolation of the human peroxisomeproliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cellsand chromosomal mapping. Gene Expr 1995; 4: 281-299.

[9] Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz M, Moller DE, Berger J. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1and gamma 2. Biochem Biophys Res Commun 1996; 224: 431-437.

[10] Farmer S. Transcriptional control of adipogenesis: interplay between C/EBPsand PPARc in regulating adipocyte gene expression. In Medeiros-Neto G (ed): Progress in Obesity Research. Paris: John Libbey Eurotext 2003; 15-18.

[11] Altshuler D, Hirschhorn JN, KlannemarkM, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARg Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. Nat Genet 2000; 26: 76-80.

[12] Paltoo D, Woodson K, Taylor P, AlbanesD, Virtamo J, Tangrea J. Pro12Ala polypolymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARPPARgamma) gene and risk of prostate cancancer among men in a large cancer preventionstudy. Cancer Lett 2003; 191: 67-74.

[13] Paynter RA, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, De Vivo I. No evidence of arole for PPARgamma Pro12Ala polypolymorphism in endometrial cancer susceptibility. Pharmacogenetics 2004; 14: 851-856.

[14] Gong Z, Xie D, Deng Z, Bostick RM, Muga SJ, Hurley TG, Hebert JR. The PPARc Pro12Ala polymorphism and riskfor incident sporadic colorectal adenoadenomas. Carcinogenesis 2005; 26: 579-585.

[15] Soltesz V, Zeeberg B, Wadstrom T. Optimal survival of Helicobacter pylorl under various transport conditions. J Clin Microbiol 1992; 30: 1453-1456.

[16] Marshall BJ, Warren JR, Francis GJ, Langton SR, Goodwin CS, Blincow ED. Rapid urease test in the management of Campylobacter pyloridis-associated gastritis. Am J Gastroenterol 1987; 82: 200-210.

[17] Hirschl AM, Rathbone BJ, Wyatt JI, Berger J, Rotter ML. Comparison of ELISA antigen preparations alone or in combination for serodiagnosing Helicobacter pylori infections. J Clin Pathol 1990; 43: 511-513.

[18] Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, Pang RP, Chen MH, Ng M, Sung JJ. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. Gut 2003; 52: 1684-1689.

[19] Prasad KN, Saxena A, Ghoshal UC, Bhagat MR, Krishnani N. Analysis of Pro12Ala PPAR gamma polymorphism and Helicobacter pylori infection in gastric adenocarcinoma and peptic ulcer disease. Ann Oncol 2008; 19: 1299-1303.

[20] Konturek PC, Kania J, Konturek JW, Nikiforuk A, Konturek SJ, Hahn EG. H.pylori infection, atrophic gastritiscytokines, gastrin, COX-2, PPARc and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. Med Sci Monit 2003; 9: SR53-SR66.

[21] Leung WK, Bai AH, Chan VY, Yu J, Chan MW, To KF, et al. Effect of peroxisome proliferator activatedreceptor gamma ligands on growth and gene expression profiles of gastric cancer cells. Gut 2004; 53: 331-338.

[22] Lu J, Imamura K, Nomura S, Mafune K, Nakajima A, Kadowaki T, et al. Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. Cancer Res 2005; 65: 4769-4774.

[23] Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPARgamma inhumans. Mol Genet Metab 2004; 83: 93-102.

[24] Stumvoll M, Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2Pro12Ala polymorphism. Diabetes 2002; 51: 2341-2347.

[25] Liao SY, Zeng ZR, Leung WK, Zhou SZ, Chen B, Sung JJ, Hu PJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Pro12Ala polymorphism, Helicobacter pylori infection and non-cardia gastric carcinoma in Chinese. Aliment Pharmacol Ther 2006; 23: 289-294.

[26] Murtaugh MA, Ma KN, Caan BJ, Sweeney C, Wolff R, Samowitz WS, et al. Interactions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and diet in etiology of colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1224-1229.

[27] Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Wang F, Maruyama N, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Pro12Ala polymorphism as a shared risk marker for both Helicobacter pylori infected patients and impairing Fasting Glucose(IFG). Dig Dis Sci 2008; 53: 614-621.

Archive of SID

www.SID.ir

Determination of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma polymorphism in patients with helicobacter pylori infection

Hossein Goudarzi (Ph.D)[1,2], Sima Sadat Seyedjavadi (M.Sc)[2], Mehdi Goudarzi (M.Sc)[*2]
1 - Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center and Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran
2- Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

(Received: 28 Dec 2010 Accepted: 30 Jul 2011)

Introduction: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) is a ligand-dependent transcription factor involved in various disease processes including inflammation and carcinogenesis .This study aimed to determine polymorphism of PPARγ gene and its association with *Helicobacter pylori* infection and gastrointestinal diseases in patients.

Materials and Methods: Two hundred patients with helicobacter pylori infection were examined. H. pylori infection was diagnosed by histology, rapid urease test (RUT), culture, ELISA and PCR. PPARγ polymorphism was analyzed by PCR-based restriction fragment length polymorphism.

Results*:* In total 200 patients (4 gastric cancer, 141gastritis, 35 peptic ulcer, 18 duodenal ulcer, 2 peptic ulcer and duodenal ulcer) with Helicobacter pylori infection were enrolled .The frequency of PPARγ G (Ala12) allele (5%) showed a significant association with gastric cancer (P=0.004) or gastritis (P=0.007). PPARγ GC (Pro12Ala) allele (35%) showed a significant association with duodenal ulcer (P=0.03) or gastritis (P=0.002).

Conclusion*:* Pro12Ala PPARγ polymorphism is associated with gastric cancer and gastritis and is a potential marker for genetic susceptibility to these two diseases in the presence of H. pylori infection. Finally, our study suggests the potential association between PPARγ polymorphism and H. pylori infection in the development of gastric cancer and peptic ulcer and gastritis.

Key words*: Helicobacter pylori*, PPARγ gene polymorphism,Gastric cancer

* Corresponding author: Fax: +98 21 23872548 ; Tel: +98 09123108104
m.goudarzi@sbmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir