

Multiple Repeats of *Helicobacter pylori* CagA C-Terminal Motifs Predict the Risk of Gastric Cancer in Iran

Somaye Sarrami¹, Saeid Latifi-Navid^{1,2,*}, Saber Zahri¹, Esmat Abdi¹, Abdas Yazdanbod^{3,4}

¹ Department of Cell and Molecular Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

² Biosciences and Biotechnology Research Center (BBRC), Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran

³ Gastrointestinal Cancer Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁴ Digestive Disease Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

ABSTRACT

Background:

CagA, a 120- to 145-kD *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) protein, increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer (GC). The pathogenic CagA contains a highly polymorphic Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) repeat region in the C-terminal portion of the protein. The aim of this study was to determine the number and type of EPIYA (glutamine-proline-isoleucine-tyrosine-alanine) motifs within the cagA 3' variable region among *H. pylori* isolates and their association with GC.

Materials and Methods:

The total number of 206 individuals (170 controls and 36 patients with GC) referring to the endoscopy units of several cities in Iran (2008-2014) were recruited. The polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed to determine the presence of *H. pylori*, cagA gene, and EPIYA motifs.

Results:

In this study, 81 (47.6%) and 22 (61.1%) of the controls and patients with GC were carriers of cagA⁺ strains, respectively. The overall frequency of EPIYA-AB, EPIYA-ABC, EPIYA-ABCC, and EPIYA-ABCCC in patients with GC were 0%, 59%, 9%, and 31.8%, respectively. The results of regression analysis showed a significant association between EPIYA-ABCCC motif and the risk of GC [OR = 9.99 (95%CI: 2.17-45.88), $p = 0.003$].

Conclusion:

We propose that patients infected with *H. pylori* strains harboring more than one CagA EPIYA C motif (EPIYA-ABCCC) have an increased risk of GC, thus, testing for this genotype may have clinical usefulness.

Keywords: *H. pylori*, cagA, EPIYA, Gastric cancer, Iran

please cite this paper as:

Sarrami S, Latifi-Navid S, Zahri S, Abdi E, Yazdanbod A. Multiple Repeats of CagA C-Terminal Motifs Predict the Risk of Gastric Cancer in Iran. *Govaresh* 2018;23:146-151.

*Corresponding author:

Saeid Latifi-Navid, Ph.D.

Department of Biology, Faculty of Sciences,

University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil,

56199-11367, Iran

Telefax: + 98 45 33514701

E-mail: s_latifi@uma.ac.ir

Received: 05 May 2018

Edited: 05 Jul. 2018

Accepted: 06 Jul. 2018

تکرارهای متعدد موتیف C انتهای کربوکسیلی CagA هلیکوباکتریپیلوری پیش‌گویی کننده خطر سرطان معده در ایران

سمیه صرامی^۱، سعید لطیفی نوید^{۱*}، صابر زهری^۱، عصمت عبدی^۱، عباس یزدان بد^۲

^۱ گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
^۲ مرکز تحقیقات علوم زیستی و زیست‌فناوری، دانشکده فناوری‌های نوین نمین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران
^۳ مرکز تحقیقات سرطان‌های دستگاه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۴ مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

CagA یک پروتئین باکتریایی ۱۲۰ تا ۱۴۵ کیلو دالتون است که باعث افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های آتروفی معده و سرطان معده می‌شود. پروتئین CagA دارای ناحیه تکرارپذیر EPIYA (گلوتامین - پرولین - ایزولوسین - تیروزین - آلانین) بسیار پلی مورف در ناحیه انتهای کربوکسیلی می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین تعداد و انواع موتیف EPIYA در ناحیه متغیر ۳' سویه‌های هلیکوباکتریپیلوری، و ارتباط آن‌ها با سرطان معده می‌باشد.

روش بررسی:

تعداد کل ۲۰۶ نفر (۱۷۰ نفر شاهد و ۳۶ بیمار سرطان معده) که به مراکز آندوسکوپی در استان‌های مختلف ایران مراجعه کرده بودند (۱۳۹۱-۱۳۸۶)، مورد مطالعه قرار گرفت. واکنش PCR به منظور بررسی حضور هلیکوباکتریپیلوری، ژن cagA و تعیین موتیف‌های EPIYA صورت گرفت.

یافته‌ها:

در این مطالعه از میان گروه شاهد و بیماران سرطان معده، ۸۱ (۴۷/۶٪) و ۲۲ (۶۱/۱٪) نفر به ترتیب حامل سویه‌های cagA+ بودند. فراوانی موتیف‌های EPIYA-ABCC، EPIYA-ABC، EPIYA-ABCCC در گروه بیماران سرطان معده به ترتیب ۰٪، ۵۹٪، ۹٪ و ۳۱/۸٪ گزارش شد. نتایج تحلیل رگرسیون ارتباط معنی‌داری بین حضور موتیف EPIYA-ABCCC و بروز سرطان معده نشان داد [OR = ۹/۹۹ (۹۵٪ CI: ۲/۴۵ - ۱۷/۸۸)، P = ۰/۰۰۳].

نتیجه‌گیری:

نتایج ما نشان می‌دهد که عفونت با سویه‌های هلیکوباکتریپیلوری با بیش از یک موتیف CagA EPIYA C (EPIYA-ABCCC) خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهد. بنابراین بررسی حضور این ژنوتیپ ممکن است در کلینیک سودمند واقع شود.

کلیدواژه: هلیکوباکتریپیلوری، EPIYA، cagA، سرطان معده، ایران

گوارش/ دوره ۲۳، شماره ۳/ پاییز ۱۳۹۷-۱۴۶

زمینه و هدف:

سرطان معده به لحاظ شیوع چهارمین بیماری و دومین علت مرگ و میرهای ناشی از سرطان را در جهان شامل می‌شود. (۱) میزان بقاء بیماران سرطان معده پایین است و به لحاظ پاتولوژیکی به دو نوع روده‌ای^۱ و منتشره^۲ طبقه‌بندی شده است. (۳ و ۲) تحقیقات نشان داده است که مصرف غذاهای شور، تند، ترش و غذاهای دودی شده خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهند. در افراد دارای سابقه مصرف سیگار و تنباکو خطر ابتلا به سرطان معده دو برابر بیشتر از سایرین است. (۴) کشورهای ژاپن، چین و روسیه جزء مناطق با بروز بالای سرطان معده محسوب می‌شوند و میزان بروز در استرالیا، کانادا، ایالات متحده آمریکا و اروپای غربی

*نویسنده مسئول: سعید لطیفی نوید

اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، بخش زیست‌شناسی،

گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، کد پستی: ۵۶۱۹۹-۱۱۳۶۷

صندوق پستی: ۱۷۹

تلفن و نامبر: ۰۴۵-۳۳۵۱۴۷۰۱

پست الکترونیک: s_latifi@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۵

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۷/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۶

1. Intestinal-type
2. Diffuse-type

بیماری های گوارشی با استفاده از آزمایش های آندوسکوپی و هیستوپاتولوژی صورت گرفت و بیمارانی که مشخصات آندوسکوپی آنها با نتایج پاتولوژی مطابقت نداشت، از مطالعه خارج شدند. محاسبه حجم نمونه بر اساس

$$n = \frac{z^2 P(1-P)}{d^2}$$

رابطه با در نظر گرفتن خطای نوع اول ۵ درصد و نسبت ها در مطالعات قبلی انجام شد. استخراج DNA از بافت بیوپسی معده بیماران با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Cinagen, Iran انجام شد و به وسیله واکنش PCR، سویه های هلیکوباکتریپیلوری که دارای ژن *cagA* مثبت بودند، شناسایی شدند

D008: 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3';
(R008: 5'-TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3', ۲۹۷ bp)

تکثیر قطعه 16S rDNA هلیکوباکتریپیلوری با استفاده از پرایمرهای
5'-GCAATCAGCGTCAGTAATGTTTC-3' (HP1) و (HP2-519bp)
5'-GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3' انجام شد و ناحیه 3'

ژن *cagA* با استفاده از پرایمرهای

5'-ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA-3' (CAG1) و
5'-GTAATTGTCTAGTTTCGC-3' (CAG2)

مورد بررسی قرار گرفت. (۱۶ و ۱۵)

در ادامه پرایمرهای *cagA28F* (5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3')
cagA-PIC (5'-GTCCTGCTTTCTTTTATTAACCTKAGC-3', 264-291)
cagA-P2CG (5'-TTTAGCAACTTGAGCGTAAATGGG-3', 309-336)
cagA-P2TA (5'-TTTAGCAACTTGAGTATAAATGGG-3', 309-336)
cagA-P3E (5'-ATCAATTGTAGCGTAAATGGG-3', 465-498/672)
برای تأیید توالی های کد کننده موتیف A-EPIYA, B, C و D به ترتیب
مورد استفاده قرار گرفت (شکل های ۱ و ۲). (۱۷) تکثیر توسط PCR در
۳۳ چرخه با استفاده از ۱ دقیقه واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی
گراد، ۱ دقیقه دمای اتصال در ۵۸-۴۸ درجه سانتی گراد (۵/۵) برای
16S rDNA و D008/R008-*cagA*، ۴۵ درجه سانتی گراد برای CAG1/
CAG2 و ۵۵ درجه سانتی گراد برای نواحی متغیر انتهایی (P1-P3-3')،
یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد
برای گسترش نهایی انجام شد. نتایج توالی یابی با استفاده از برنامه
Chromas (Technelysium, Pty.Ltd) آنالیز شد و برنامه
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST برای هم ردیف کردن توالی های
نوکلئوتیدی با توالی های موجود در Genbank مورد استفاده قرار
گرفت. ردیف آرای چندگانه (MSA) توالی های *CagA* با استفاده از
(Applied-Maths, Sint Maartens-Latem, Belgium) BioNumerics v5.10
انجام گردید. از آنالیز کای-اسکوئر (χ^2) و آزمون دقیق فیشر در SPSS 16
استفاده شد و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.
Odds ratios (ORs) و فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) مورد ارزیابی قرار گرفت.
تأثیر تعداد موتیف ها بر خطر بروز سرطان معده به وسیله آنالیز رگرسیون
چندگانه لجستیک با در نظر گرفتن هر دو فاکتور جنس و سن مورد
بررسی قرار گرفت. انتخاب متغیرها بر اساس مند (Likelihood Ratio)
Forward Stepwise LR صورت گرفت و بیماران مبتلا به گاستریت در

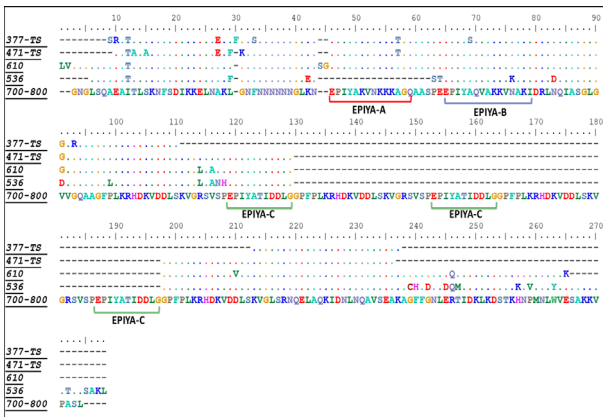
پایین می باشد. (۵) هلیکوباکتریپیلوری نقش اساسی در ایجاد التهاب معده دارد و یکی از عوامل تعیین کننده در بروز سرطان معده می باشد. (۶) تقریباً نیمی از جمعیت جهان به این باکتری آلوده اند. اکثر افراد آلوده به این باکتری التهاب مزمن را نشان می دهند. در ایران تعداد قابل ملاحظه ای از افراد آلوده به عفونت هلیکوباکتریپیلوری وجود دارد (۶۹٪). بالاترین فراوانی از استان شمال غربی ایران، اردبیل گزارش شده است. (۷) در این استان، بیش از ۹۰٪ افراد بزرگسال زیر ۴۰ سال یا بیشتر از گاستریت مزمن مربوط به عفونت هلیکوباکتریپیلوری رنج می برند.

اردبیل بالاترین میزان بروز سرطان معده را در ایران (ASRs = ۵۱/۸/۱۰۰,۰۰۰ در مردان و ۲۴/۹/۱۰۰,۰۰۰ برای زنان) و بالاترین میزان بروز سرطان کاردیا را در جهان به خود اختصاص داده است. (۸ و ۷) جزایر بیماری زای *cag* یکی از مهم ترین شاخص بیماری زایی هلیکوباکتریپیلوری به شمار می آید، به طوری که سویه های فاقد این جزایر بیماری زایی کمتری دارند. ژن های موجود بر روی *cagPAI* تنوع بسیار زیادی را در سراسر دنیا نشان می دهند. (۹) ژن *cagA* ساختار موزاییکی دارد و دارای تنوع در انتهای ۳' و ۵' می باشد. ناحیه تغییرپذیر ۳'، نواحی فسفریلاسیون تیروزین EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) را کد می کند، که با عنوان نواحی EPIYA/A-/B-/C-/D طبقه بندی می شوند. EPIYA-C و EPIYA-D به عنوان نواحی اولیه فسفریلاسیون *CagA* عمل می کنند. بیشتر سویه های آسیای شرقی توالی حفاظت شده و عدم مضاعف شدگی در بخش D را نشان می دهد در حالی که بخش C (نوع غربی) به طور گسترده ای در بین سویه های جدا شده تنوع دارد. (۱۰) سویه های آسیای شرقی با نرخ بالای سرطان معده مرتبط می باشند. (۱۱ و ۱۲) سویه های دارای ژن *cagA* با افزایش تعداد موتیف C (EPIYA-C)، با سرطان معده در ارتباط هستند. به نظر می رسد که تعیین درجه فسفریلاسیون یا تعیین تعداد موتیف های فسفریلاسیون *CagA* نسبت به بررسی وجود ژن *cagA* به تنهایی مفیدتر باشد. (۱۳) نتایج یک مطالعه اخیر نشان داد که میان کنش *CagA* فسفریله با SHP-2 نیازمند جایگاه های EPIYA-C و EPIYA-D می باشد. همچنین در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که با افزایش موتیف EPIYA-C پروتئین *CagA* در سویه های غربی، سطح فسفریلاسیون تیروزین افزایش یافت که منجر به تغییر شکل سلول ها شد و ارتباط معنی داری را با خطر بروز سرطان معده گزارش کردند. (۱۴) در این مطالعه تیپ بندی موتیف های انتهایی کربوکسیلی پروتئین *CagA* هلیکوباکتریپیلوری و ارتباط آن با سرطان معده مورد ارزیابی قرار گرفت.

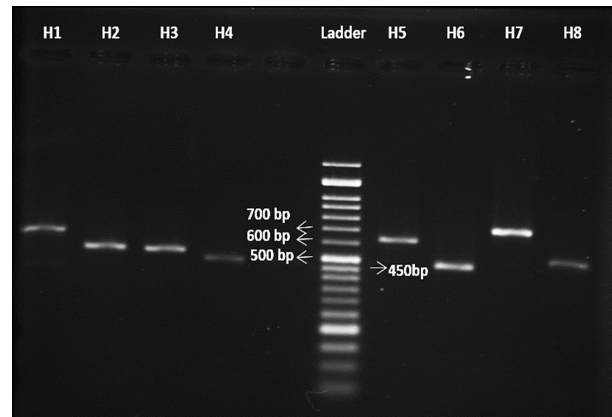
روش بررسی:

در این پژوهش، تعداد کل ۲۰۶ نفر آلوده به عفونت هلیکوباکتریپیلوری که به مراکز آندوسکوپی واقع در استان های مختلف ایران مراجعه کرده بودند (۱۳۹۳-۱۳۸۷) و اطلاعات فردی آنها با استفاده از پرسشنامه تکمیل شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه گیری به صورت متوالی از بیماران دارای ناراحتی گوارشی معرفی شده به مراکز آندوسکوپی انجام شد. تشخیص نوع

1. Age-standardized rates of gastric cancer



شکل ۲: ردیف آرایی چندگانه توالی پپتیدی CagA (نمایش موتیف های EPIYA) ۴ سویه هلیکوباکتری پیلوری. توالی های آمینواسیدی EPIYA-A (KVNNKKTGQ)، EPIYA-B (QVAKKVNAKI) و EPIYA-C (TIDDLGGPEPL) نشان داده شده است.



شکل ۱: قطعه های ۵۳۶، ۶۱۰، ۷۳۰ و ۴۷۱ حاصل از تکثیر واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمر cagA3'.

جدول ۱: اطلاعات توصیفی بیماران براساس سن و جنس

بیماری	سن	جنس
گاستریت (۱۷۰)	۴۰ > / ۴۰ <=	زن / مرد
سرطان معده (۳۶)	۸۴ (۴۹/۴) / ۳۵ (۹۷/۲)	۸۰ (۴۷) / ۱۰ (۲۷/۷)
کل (۲۰۶)	۸۵ (۴۱/۲) / ۱۲۱ (۵۸/۷۳)	۱۰۰ (۴۸/۵۴) / ۱۰۶ (۵۱/۴۵)

جدول ۲: فراوانی موتیف های انتهایی کربوکسیلی cagA سویه های هلیکوباکتری پیلوری

بیماری	cagA3' (EPIYA-ABCC)	cagA3' (EPIYA-ABCC)	cagA3' (EPIYA-ABCC)	cagA3' (EPIYA-ABCC)
گاستریت (۸۱)	۳ (۳/۷)	۸ (۹/۸)	۶۶ (۸۱/۴)	۳ (۳/۷)
سرطان معده (۲۲)	۷ (۳۱/۸)	۲ (۹)	۱۳ (۵۹)	۰
کل (۱۰۳)	۱۰ (۹/۷)	۱۰ (۹/۷)	۷۹ (۷۶/۶)	۳ (۳/۷)

در جدول ۲ فراوانی موتیف های انتهایی کربوکسیلی ژن cagA در سویه های مختلف هلیکوباکتری پیلوری گزارش شده است. فراوانی موتیف های EPIYA-ABCC، EPIYA-ABC، EPIYA-AB و EPIYA-ABCCC در گروه بیماران سرطان معده به ترتیب ۰٪، ۵۹٪، ۹٪ و ۳۱/۸٪ و در گروه شاهد نیز به ترتیب ۳/۷٪، ۸۱/۴٪، ۹/۸٪ و ۳/۷٪ گزارش شد. در یک بیمار نیز موتیف های انتهایی کربوکسیلی cagA مشاهده نشد که احتمالاً به خاطر variation یا تنوع ناحیه ای، تکثیر توسط PCR انجام نشد. در این مطالعه نتایج کای-سکوئر (χ^2) و آزمون دقیق فیشر نیز نشان داد که فراوانی موتیف EPIYA-ABCCC ژن cagA در افراد مبتلا به سرطان معده [۷/۲۲] (۳۱/۸٪) به میزان بیشتری نسبت به گروه شاهد [۳/۸۱] (۳/۷٪) یافت می شود ($P < 0.001$). همچنین نتایج آنالیز رگرسیون چندگانه لجستیک نشان داد که موتیف EPIYA-ABCCC ژن cagA بطور معنی داری با سرطان معده در ارتباط می باشد [$OR = 9/99$ (۹۵٪ CI: ۲/۴۵ - ۱۷/۸۸، $P = 0.003$)].

همه آنالیزها به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. این آنالیز یک مدل آماری رگرسیون برای متغیرهای وابسته دوسویی (رخ داد یک واقعه تصادفی در دو موقعیت ممکن) می باشد. در واقع این مدل به عنوان مدل خطی تعمیم یافته می باشد که از تابع لجوجیت به عنوان تابع پیوند استفاده می کند و خطایش از توزیع چند جمله ای پیروی می کند. از این رو این تحلیل برای درک این که چگونه مقدار متغیر وابسته با تغییر هر کدام از متغیرهای مستقل و با ثابت بودن دیگر متغیرهای مستقل تغییر می کند، استفاده شد. آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS-16 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) انجام شد. در این مطالعه از نمونه DNA استخراج شده از ۲۰۶ (از مجموع ۲۸۹) بیوپسی معده ذخیره شده در بانک سلولی گروه بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه محقق اردبیلی استفاده شد. نمونه DNA این بیوپسی ها بر اساس تکثیر قطعه 16S rDNA هلیکوباکتری پیلوری در این مطالعه، دارای DNA این باکتری بود. از این رو مطالعه حاضر منطبق بر اصول اخلاقی مربوط به پژوهش ها و آزمایش های انسانی مندرج در بیانیه هلسینکی بوده و آن را نقض نمی کند.

یافته ها:

در این بررسی ۲۰۶ بیمار آلوده به هلیکوباکتری پیلوری مورد بررسی قرار گرفت که ۱۷۰ نفر از بیماران مبتلا به گاستریت (گروه شاهد) و ۳۶ نفر از بیماران مبتلا به سرطان معده بودند. از مجموع ۱۷۰ فرد گاستریتی، ۹۰ نفر زن (۵۲/۹٪) و ۸۰ نفر مرد (۴۷٪) بودند. در میان بیماران سرطانی ۱۰ نفر زن (۲۷/۷٪) و ۲۶ نفر مرد (۷۲/۲٪) بودند، که ارتباط معنی داری بین جنس و سرطان معده مشاهده شد ($P = 0.005$). همچنین بررسی اثر سن بر روی سرطان نشان داد که در گروه کنترل افراد بالای ۴۰ سال، ۸۶ نفر (۵۰/۶٪) و افراد پایین ۴۰ سال، ۸۴ نفر (۴۹/۴٪) بودند. در گروه بیماران سرطانی نیز افراد بالای ۴۰ سال و افراد پایین ۴۰ سال به ترتیب ۳۵ (۹۷/۲٪) و ۱ (۲/۷٪) نفر بودند که ارتباط معنی داری بین اثر سن و سرطان معده وجود دارد ($P < 0.001$) (جدول ۱). در این مطالعه از تعداد کل گروه شاهد، ۸۱ نفر [۸۱/۱۷۰] (۴۷/۶٪)، و در گروه بیماران سرطان معده ۲۲ نفر [۲۲/۳۶] (۶۱/۱٪) نفر حامل سویه های cagA⁺ بودند.

به زخم پپتیک و بیماران مبتلا به سرطان معده به ترتیب (۱۶۴/۲۰۴) EPIYA-ABCC، ۷۴/۶٪، (۳۹/۵۳) ۷۳/۶٪، (۱۱/۱۴) ۷۸/۶٪ گزارش شد. الگوی EPIYA-ABC بیشتر در بیماران مبتلا به گاستریت مزمن مشاهده شد (۷۹/۳٪)، در حالی که توالی EPIYA-ABCC بیشتر در زخم های پپتیک (۶۴/۱٪) و بیماران مبتلا به سرطان معده (۵۴/۵٪) مشاهده شد. با این حال، خطر ابتلا به زخم معده ($OR = ۷/۰$) و سرطان معده ($OR = ۵/۹$) در افرادی که الگوی EPIYA-ABCC را نشان می دهند بیشتر است (۲۶). مطالعه انجام گرفته در ترکیه نشان داد که تکرار چندگانه EPIYA-C باعث افزایش خطر سرطان معده ($OR = ۳۰/۶$) و زخم دوازدهه ($OR = ۸/۹$) می شود (۲۷). تحقیق انجام یافته در کشور برزیل ارتباط معنی داری بین افزایش تکرار EPIYA-C و خطر بروز سرطان معده ($OR = ۳/۷۹$) نشان داد (۲۸). مطالعه انجام یافته در ایران ارتباط معنی داری را بین حضور EPIYA-ABCC و EPIYA-A-B/C با زخم معده و سرطان معده به ترتیب نشان داد (۲۹). در تحقیق انجام یافته در ایران، فراوانی سویه های $cagA^+$ در شیراز مانند کشورهای غربی بالا بود و تکرار زیاد EPIYA-C در بیماران مبتلا به سرطان معده مشاهده شد (۳۰). مطالعه های مختلف نشان داده اند که شیوع و شدت بیماری های گوارشی مرتبط با هلیکوباکترپیلوری ممکن است در بین نواحی جغرافیایی مختلف بسیار متنوع باشد که این امر ممکن است ناشی از تفاوت در توزیع مارکرهای مختلف بیماری زایی این باکتری باشد. از طرف دیگر اختلاف چشمگیر در فراوانی موتیف های انتهایی کربوکسیلی ژن $cagA$ در مناطق جغرافیایی مختلف می تواند ناشی از توانایی بالای این باکتری جهت تغییر تنوع ژنتیکی باشد. از این رو افزایش تعداد موتیف EPIYA-C ژن $cagA$ می تواند بعنوان مارکری در جهت آنالیز شدت بیماری در نظر گرفته شود، اما نباید نقش فاکتورهای دیگر شناخته شده مانند ژن های بیماری زای دیگر این باکتری، فاکتورهای محیطی و ژنتیک میزبانی در بیماری زایی این باکتری را نادیده گرفت. به هر حال تعداد نسبتاً پایین نمونه ها جز محدودیت اصلی این تحقیق می باشد و با تعداد بالاتر می توان به نتایج قطعی تر رسید.

سپاسگزاری:

مقاله حاضر حاصل بخشی از پایان نامه در مقطع کارشناسی ارشد می باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شده است.

REFERENCES:

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- Dassen A, Lemmens V, van de Poll-Franse LV, Creemers GJ, Breninkmeijer S, Lips D, et al. Trends in incidence, treatment and survival of gastric adenocarcinoma between 1990 and 2007: a population-based study in the Netherlands. *Eur J Cancer* 2010;46:1101-10.
- Yasui W, Sentani K, Motoshita J, Nakayama H. Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scand J Surg* 2006;95:225-31.
- Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:713-39.
- Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. *Arch Iran Med* 2009;12:576-83.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.

بحث:

در این مطالعه فراوانی سویه های $cagA^+$ دارای موتیف EPIYA-ABCC، EPIYA-ABC و EPIYA-ABCCC به ترتیب ۷۶/۶٪، ۹/۷٪ و ۹/۷٪ می باشد که ارتباط معنی داری بین فراوانی موتیف های EPIYA-ABCC، EPIYA-AB و EPIYA-ABCCC با سرطان معده مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). در مقابل، ژنوتیپ EPIYA-ABCCC خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می دهد ($P < ۰/۰۵$). بنابراین حضور $CagA$ با موتیف های فسفریلاسیون بیشتر در سویه های ایرانی ممکن است با وقوع بالای سرطان معده ارتباط داشته باشد. در مطالعات اخیر نشان داده شده است که تنوع گسترده ای در ناحیه انتهایی کربوکسیلی ژن $cagA$ وجود دارد (۱۸) که شاید این تنوع ژنتیکی ناشی از توانایی بالای هلیکوباکترپیلوری جهت تغییراتی است که در بخش ژنوم خود ایجاد می کند. مطالعه ی بیماران کوبایی نشان داد که فراوانی EPIYA-ABC ژن $cagA$ در سویه های هلیکوباکترپیلوری غالب است. همچنین شیوع کمی از تکرارهای EPIYA-C در میان سویه های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران مشاهده شد که شاید یکی از دلایل شیوع پایین سرطان معده در این منطقه است (۱۹). مطالعه ای که در کشور سوئد انجام شد نشان داد که موتیف EPIYA-C نقش بسزایی در ایجاد بیماری های گوارشی دارد. همچنین آنها نشان دادند که یکی از دلایل تنوع گونه ای در ژنوم هلیکوباکترپیلوری جهش و نوترکیبی می باشد (۲۰). برخی مطالعه ها نشان داده است که ژن $cagA$ با سرطان معده یا زخم گوارشی در ایران، عراق، عربستان سعودی و ترکیه ارتباط دارد (۲۱-۲۳). مطالعه دیگری در کشور برزیل نشان داد که $cagA$ یک فاکتور بیماری زای مهم در سویه های هلیکوباکترپیلوری می باشد که در بروز سرطان معده و زخم معده نقش بسزایی دارد. همچنین نشان داده شد که ژنوتیپ های ناحیه ی ۳ ژن $cagA$ از لحاظ ناحیه جغرافیایی متنوع می باشند و سویه های $cagA^+$ هلیکوباکترپیلوری که دارای چندین موتیف نوع C بودند با سرطان معده ارتباط معنی داری دارند (۲۴). متآنالیز انجام یافته در سال ۲۰۱۷ نشان داد که در آسیا، موتیف EPIYA-D با افزایش خطر ابتلا به سرطان معده همراه است و موتیف های EPIYA-C باعث افزایش خطر ابتلا به زخم های معده و روده می شوند. در اروپا و ایالت متحده آمریکا، موتیف های EPIYA-C خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می دهد. تحقیق ما نیز نشان داد که افزایش تعداد موتیف C خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می دهد (۲۵). در تحقیق انجام یافته در جنوب مکزیک فراوانی سویه های $cagA^+$ در بیماران مبتلا به گاستریت مزمن، بیماران مبتلا

7. Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan M, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, et al. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. *J Clin Pathol* 2004;57:37-42.
8. Derakhshan M, Yazdanbod A, Sadjadi A, Shokoohi B, McColl K, Malekzadeh R. High incidence of adenocarcinoma arising from the right side of the gastric cardia in NW Iran. *Gut* 2004;53:1262-6.
9. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001;107:767-73.
10. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14428-33.
11. Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Muramatsu A, Suto H, et al. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis* 2004;189:820-7.
12. Li J, Ou Z, Wang F, Guo Y, Zhang R, Zhang J, et al. Distinctiveness of the cagA genotype in children and adults with peptic symptoms in South China. *Helicobacter* 2009;14:248-55.
13. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC. Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol* 2008;57:1062-7.
14. Ren S, Higashi H, Lu H, Azuma T, Hatakeyama M. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol Chem* 2006;281:32344-52.
15. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1436-9.
16. Yamaoka, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3 region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998;36:2258-63.
17. Argent RH, Zhang Y, Atherton JC. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:791-5.
18. Xia Y, Yamaoka Y, Zhu Q, Matha I, Gao X. A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 2009;4:e7736.
19. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004;9 Suppl 1:1-6.
20. Karlsson A, Ryberg A, Nosouhi Dehnoei M, Borch K, Monstein HJ. Variation in number of cagA EPIYA-C phosphorylation motifs between cultured *Helicobacter pylori* and biopsy strain DNA. *Infect Genet Evol* 2012;12:175-9.
21. Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK, et al. Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori*-associated disease. *J Clin Microbiol* 2008;46:1774-9.
22. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133:926-36.
23. Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol* 2004;42:1648-51.
24. Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral, MM, Oliveira RC, et al. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol* 2011;11:61.
25. Li Q, Liu J, Gong Y, Yuan Y. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: A meta-analysis. *Medicine* 2017;96:e6620.
26. Beltrán-Anaya FO, Poblete TM, Román-Román A, Reyes S, de Sampedro J, Peralta-Zaragoza O, et al. The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. *BMC gastroenterol* 2014;14:223.
27. Kocazeybek BS, Caliskan R, Erdamar Cetin SE, Ergin S, Kuskucu M, Kepil N, et al. Patterns of EPIYA motifs among cagA-positive *Helicobacter pylori* strains: a case-control study in a Turkish population with Eurasian geographical features. *J Med Microbiol* 2015;64:1117-23.
28. Vilar E Silva A, Junior MR, Vinagre RM, Santos KN, da Costa RA, Fecury AA, et al. Evaluation of the pattern of EPIYA motifs in the *Helicobacter pylori* cagA gene of patients with gastritis and gastric adenocarcinoma from the Brazilian Amazon region. *Int J bacteriol* 2014;2014:418063.
29. Vaziri F, Najar Peerayeh S N, Alebouyeh M, Molaei M, Maghsoudi N, Zali M R. Determination of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA types in Iranian isolates with different gastroduodenal disorders. *Infect Genet Evol* 2013;17:101-5.
30. Haddadi M H, Bazargani A, Khashei R, Fattahi M R, Bagheri Lankarani K, Moini M, et al. Different distribution of *Helicobacter pylori* EPIYA-cagA motifs and dupA genes in the upper gastrointestinal diseases and correlation with clinical outcomes in Iranian patients. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2015;8(Suppl 1):S37-46.