Archive of SID

دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۲، صفحه ۱۷۹ – ۱۷۰ (خرداد و تیر ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2017;20(2): 170-179

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

فعالیت پروتئازی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و ارتباط آنها با تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت معده

سمیه غریبی [۱]، مسعود آل‌بویه [۲*]، طاهره فلسفی [۱]، نسترن فرضی [۲]، فرزام وزیری [۳]، محمدرضا زالی [۴]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله ار آب و غذا، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳] گروه تحقیقاتی مایکوباکتریولوژی و تنفسی، انستیتو پاستور ایران
[۴] مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۱۲/۱۲- پذیرش مقاله: ۹۵/۴/۲۹)

چکیده

زمینه: *هلیکوباکتر پیلوری* عامل اصلی بیماری‌های مختلف گوارشی می‌باشد. از آنجا که بیماری‌های ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* با آسیب بافتی شدید همراه است، احتمالاً پروتئازهای باکتری نقش مهمی را در این فرآیند ایفا می‌کنند. در این مطالعه تنوع فعالیت پروتئازی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و ارتباط آنها با ضایعات مختلف پاتولوژیک معده بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش بر روی ۱۱۶ نمونه بیوپسی تهیه شده از بیماران با اختلالات گوارشی مراجعه کننده به بیمارستان آیت الله طالقانی تهران انجام شد. با آزمون کشت و **PCR** (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) حضور *هلیکوباکتر پیلوری* تشخیص داده شد. سپس فعالیت پروتئولیتیکی این سویه‌ها توسط آزمون اسپکتروفتومتری و چاهک پلیت با استفاده از سوبسترای کازئینی سنجیده شد. از آزمون آنالیز واریانس (**One-way ANOVA**) جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: شیوع *هلیکوباکتر پیلوری* با آزمون کشت و **PCR**، ۴۳/۱ درصد شناسایی گردید. فراوانی و نوع ضایعات هیستوپاتولوژی در ۵۰ بیمار، شامل ۴۰ درصد (۲۰/۵۰) گاستریت مزمن، ۸ درصد (۴/۵۰) اینتستینال متاپلازی و ۵۲ درصد (۲۶/۵۰) گاستریت فعال شدید بود. نتایج مطالعات ما نشان داد که ۴/۲۵ درصد سویه‌ها فعالیت پروتئازی بالا، ۹۱/۴ درصد فعالیت متوسط و ۴/۲۵ درصد باقیمانده فعالیت کم داشتند. آنالیز آماری وجود ارتباط معنی‌دار بین فعالیت پروتئازی پایین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و گاستریت مزمن را مشخص کرد (**p=۰/۰۴۴**).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه وجود تنوع فعالیت پروتئازی بین سویه‌های مختلف *هلیکوباکتر پیلوری* و معنی‌دار بودن ارتباط بین فعالیت پروتئازی پایین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و گاستریت مزمن را نشان داد که مطالعات تکمیلی جهت بررسی این ارتباط لازم می‌باشد.

واژگان کلیدی: *هلیکوباکترپیلوری*، شیوع، فعالیت پروتئازی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی

* تهران، بیمارستان آیت الله طالقانی، طبقه ۵ پژوهشکده گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

Email: Masoud.alebouyeh@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری میله‌ای گرم منفی بسیار متحرک و کم هوازی است که به طور مزمن اپیتلیوم معده بیش از نیمی از مردم دنیا را کولونیزه می‌کند. این پاتوژن انسانی مسئول گاستریت بوده و عفونت با این ارگانیسم فاکتور ریسک مهم برای زخم و سرطان معده و لنفومای بافت لنفوئیدی مرتبط با مخاط معده می‌باشد (۱). تفاوت بیماری‌زایی این باکتری در میزبان‌های مختلف، مرتبط با تفاوت ژنتیک میزبان، محیط و نوع سویه باکتریایی آلوده کننده است (۲). به دلیل ناهمگونی ژنتیکی در ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری*، فاکتورهای بیماری‌زایی متعدد هر یک نقش مهم خود را در تعیین پیامد این عفونت ایفا می‌کنند (۱ و ۳).

به عنوان مثال، *cagA* (ژن وابسته به سیتوتوکسین A) و ژن *vacA* (سیتوتوکسین واکوئل‌زا) دو شاخص شناخته شده می‌باشند که با بیماری زخم پپتیکی و سرطان معده مرتبط دانسته شده‌اند (۴)، و یا سویه‌هایی که *babA2* (ادزین متصل شونده به آنتی ژن گروه خونی)(۵) و *sabA* (ادزین متصل شونده به سیالیک اسید) مثبت باشند با افزایش ریسک سرطان معده ارتباط دارند (۵ و ۶). حضور ژن عملکردی *oipA* (پروتئین التهابی خارجی) با پیامد شدیدتر بیماری و سرطان معده مرتبط دانسته شده است (۶ و ۷). با وجود مطالعات گسترده‌ای که بر روی این فاکتورهای بیماری‌زایی و ارتباط آماری آنها با انواع بیماری‌ها صورت گرفته است، هنوز اطلاع جامعی که نشان دهنده مکانیسم دقیق آسیب‌زایی بافت معده توسط این باکتری باشد به دست نیامده است ۱۱–۸). با این وجود موتاژنز فاکتورهای مختلف بیماری‌زایی و بررسی‌های آزمایشگاهی (In vitro) و مدل‌های حیوانی این ارتباط‌ها را روشن‌تر نموده است (۷ و ۱۲).

علیرغم این مطالعات، بررسی متابولیت‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و اثرات آنها در بروز بیماری‌های مذکور کمتر مورد توجه بوده است. امروزه نقش پروتئازها در تسهیل فرآیند بیماری در طی عفونت آشکار شده است (۱۳). باکتری‌های پاتوژن در مراحل مختلف فرآیند عفونت، وابسته به فعالیت پروتئازی بوده (۱۴)، به طوری که عفونت‌های میکروبی بدون مشارکت فعالیت پروتئازی، پیشروی سریع و شدیدی در میزبان ندارند. این پروتئازها از طریق تخریب مستقیم بافت یا به طور غیرمستقیم با فعال کردن آنزیم‌های غیرفعال میزبان (از جمله پلاسمینوژن، پروکلاژناز، ماتریکس متالوپروتئازها) باعث پیامدهای بالینی جدی می‌شوند (۱۵). باکتری‌ها، همچنین با کمک این آنزیم‌ها از مکانیسم‌های ایمنی میزبان فرار نموده و یا مواد مغذی را از میزبان تأمین می‌نمایند (۱۵ و ۱۶). در حال حاضر انواع مختلفی از پروتئازها در *هلیکوباکتر پیلوری*، بر اساس قرابت اسید نوکلئیکی با خانواده‌های پروتئازی، شناخته شده‌اند، ولی اطلاعات عملکردی در رابطه با حضور یا بیان آنها در سویه‌های مختلف اندک است (۱۷ و ۱۸). HtrA،[1] چاپرون و سرین پروتئاز ترشحی (۲۰–۱۷) و Clp،[2] پروتئاز چاپرونی وابسته به ATP که نقش مهمی در پاسخ‌های استرسی دارند، بیشتر از سایر پروتئازها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

در این مطالعه تنوع فعالیت پروتئازی سویه‌های مختلف *هلیکوباکتر پیلوری* و ارتباط آنها با ضایعات مختلف پاتولوژیک معده در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته شده است.

[1] High Temperature Requirement A

[2] ATP-dependent caseinolytic protease

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بالینی

نمونه‌های بیوپسی جهت جداسازی *هلیکوباکتر پیلوری* از معده ۱۱۶ بیمار بالغ با اختلالات گوارشی مختلف، که در بخش آندوسکوپی بیمارستان آیت الله طالقانی تهران پذیرش شده بودند، تهیه شد. از هر بیمار سه بیوپسی (دو عدد جهت بررسی‌های پاتولوژی و یک عدد جهت کشت) گرفته شد. نمونه‌گیری با رضایت بیماران انجام و یک پرسش‌نامه مشتمل بر اطلاعات دموگرافیک بیمار و یافته‌های پاتولوژیک (گاستریت مزمن (CG)[۳]، گاستریت فعال شدید (SAG)[۴]، متاپلازی روده‌ای (IM)[۵] فراهم گردید. این مطالعه در شورای اخلاق مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد ۶۲۹ تصویب گردید.

جداسازی و شناسایی باکتری با آزمون کشت

نمونه‌های بیوپسی از قسمت آنتروم یا بادی معده هر بیمار در داخل محیط ترانسپورت تیوگلیکولات با ۱/۶ درصد آگار (Merck، آلمان) و ۳ درصد عصاره مخمر (Oxoid، آمریکا) به مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از طریق آب و غذا دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انتقال داده شد و پس از هموژن سازی در محیط بروسلا آگار (Merck، آلمان) غنی شده با ۵ درصد خون اسب،۱۰ درصد سرم گوساله جوان، ساپلمنت (*Campylobacter* selective supplement) (۲ میلی‌گرم ونکومایسین، ۰/۰۵ میلی‌گرم پلی‌میکسین و یک میلی‌گرم تری متوپریم) (Merck، آلمان) و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر آمفوتریسین B، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط کم هوازی (۵ درصد اکسیژن،۱۰ درصد دی اکسید کربن و ۸۵ درصد نیتروژن) کشت داده شدند. گرم خانه‌گذاری از ۳ تا ۷ روز در انکوباتور کم هوازی (Innova، آمریکا) ادامه یافت و نهایتاً شناسایی توسط بررسی میکروسکوپی بعد از رنگ‌آمیزی گرم و ماکروسکوپی کولونی و تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفت (۲۴-۲۲).

شناسایی باکتری با آزمون PCR

تأیید نهایی سویه‌ها بر اساس آزمون PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) و بر مبنای ژن فسفوگلوکوزآمین موتاز (*glmM*) دخیل در سنتز دیواره سلولی باکتری انجام گردید (۲۵). بدین ترتیب که بعد از تخلیص DNA با کیت (Qiagen، آلمان) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کمک پرایمرهای اختصاصی *glmM*، F:GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG و R:GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC، و شرایطی مشابه با مطالعه وزیری و همکاران صورت گرفت (۲۳).

سنجش فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری*

آزمون اسپکتروفتومتری

جهت سنجش کمّی فعالیت پروتئولیتیکی، سویه‌های رشد یافته بر روی محیط بروسلا آگار، با غلظت ۲ مک فارلند به محیط بروسلا براث (Sigma، آمریکا) با pH۷/۵، محتوی ۱۰ درصد سرم اسب (جهاد دانشگاهی، تهران) و کلرید آهن (Fecl2.6H2O) (Merck، آلمان) تلقیح شدند و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط کم هوازی به مدت

[3] Chronic gastritis
[4] Severe active gastritis
[5] Intestinal metaplasia

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

۵ روز ادامه یافت. در مرحله بعد سانتریفیوژ با شرایط دور ۴۰۰۰rpm، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۰ دقیقه انجام گرفت و سوپرناتانت به‌دست آمده برای بررسی فعالیت پروتئولیتیکی هر سویه استفاده گردید.

بدین منظور یکصد میکرولیتر از مخلوط واکنش، محتوی ۷۵۰ میکرولیتر محلول کازئین ۱/۲ درصد (وزنی حجمی) در Tris-HCl 10 میلی‌مولار (pH ۷/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر Tris-HCl 10 میلی‌مولار (pH ۷/۵) و ۱۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت باکتری، در میکروپلیت ۹۶ خانه به صورت سه بار تکرار قرار داده شد. خوانش میزان کدورت توسط دستگاه ELISA Reader (BioTek، آمریکا) با طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان صفر و سپس ۳۰ دقیقه بعد از گرم خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (۲۶). در نهایت، نتایج فعالیت پروتئولیتیکی ثبت و بعد از آنالیز و تعیین cut-off به صورت فعالیت کم، متوسط و بالا طبقه‌بندی شدند.

آزمون چاهک پلیت (Well diffusion method)

جهت بررسی کیفی فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* آزمون چاهک پلیت همزمان با سنجش کمّی انجام گرفت. در این آزمون از محیط کشت کازئین آگار (۱۲ گرم/ لیتر پودر کازئین و ۱/۵ گرم/ لیتر آگار، pH ۷/۵) استفاده شد و بعد از ایجاد چاهک با قطر ۴ میلی‌متر در پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت باکتری در چاهک، تلقیح و گرم خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انجام شد (۲۷). در این آزمون حضور هاله و قطر بیشتر آن به عنوان شاخص فعالیت پروتئازی بالاتر در نظر گرفته شد. سوپرناتانت کشت براث سویه‌های *باسیلوس سابتیلیس (ناتو)*[6] (World intellectual resource co.، تایوان)، *باسیلوس کوواگولانس*[7] (INC، Natures Only، آمریکا) و محیط بروسلا براث استریل به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی هر دو تست سنجش فعالیت پروتئولیتیکی بکار برده شدند.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism (آمریکا) ویرایش ۵ آنالیز شد. برای آنالیزهای یک طرفه، تست One-way ANOVA استفاده شد و p کمتر یا مساوی ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. بازه‌های عددی مورد استفاده جهت تفسیر نتایج فعالیت پروتئازی بر مبنای فرمول Mean±2SD تعریف گردید.

یافته‌ها

جداسازی، شناسایی و تأیید باکتری

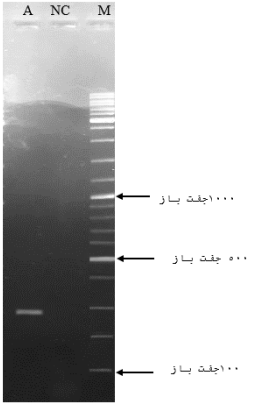
از مجموع ۱۱۶ نمونه بیوپسی مورد بررسی، ۵۰ نمونه از نظر ابتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* با آزمون کشت، مثبت شدند (۴۳/۱ درصد). هویت تمامی این جدایه‌ها توسط آزمون PCR تأیید گردید (شکل ۱). فراوانی و نوع ضایعات هیستوپاتولوژی در ۵۰ نفر مبتلا به *هلیکوباکتر پیلوری*، شامل ۲۰ نفرگاستریت مزمن (۴۰ درصد) ۴ نفر متاپلازی روده‌ای (۸ درصد) و ۲۶ نفر گاستریت فعال شدید (۵۲ درصد) بود.

[6] *Bacillus subtilis* subsp. natto
[7] *Bacillus coagulans*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017



شکل ۱) محصول PCR ژن *glmM*، *هلیکوباکتر پیلوری* بر اساس پرایمرهای اختصاصی. ردیف‌ها: M، نشانگر با وزن مولکولی ترکیبی جفت باز. NC، کنترل منفی. A، ژن *glmM* با وزن مولکولی ۲۹۶ جفت باز

سنجش فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌ها با آزمون اسپکتروفتومتری

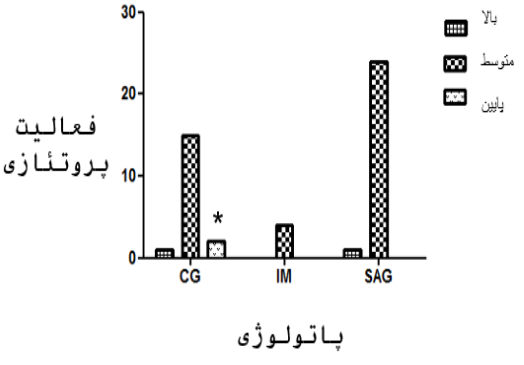
بر اساس این آزمون کمّی، کدورت محلول در سویه‌های با فعالیت پروتئولیتیکی بیشتر با سرعت بیشتر و در سویه‌های با فعالیت پروتئولیتیکی کمتر با سرعت کمتری محو می‌شد. تنوع فعالیت پروتئازی در میان این سویه‌ها در نمودار ۱ نشان داده شده است. سه عدد از این سویه‌ها قابلیت ایجاد کدورت مناسب رشد، جهت دستیابی به مقدار مناسب آنزیم را دارا نبودند و از مطالعه حذف گردیدند. میزان ۰/۰۲۵-≤، ۰/۰۲۵≥ و حد فاصل این دو بازه به ترتیب به عنوان فعالیت پروتئازی بالا، کم ومتوسط در نظر گرفته شد. از مجموع بررسی ۴۷ سویه *هلیکوباکتر پیلوری*، دو عدد از سویه‌ها فعالیت پروتئازی بالا (High)، ۴۳ عدد فعالیت پروتئازی متوسط (Moderate) و دو عدد فعالیت پروتئازی کم (Low) را نشان دادند.

سنجش فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌ها با آزمون چاهک پلیت

در این آزمون هیدرولیز تولید شده روی محیط کازئین آگار می‌توانست با مقدار فعالیت پروتئازی سویه‌های مورد بررسی مرتبط باشد. قطر ناحیه شفاف پروتئولیز در مورد سویه‌های *باسیلوس سابتیلیس* (*ناتو*) و *باسیلوس کوواگولانس به ترتیب* حدود ۳ و ۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد اما در مورد سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* هاله تجزیه سوبسترای کازئینی مشاهده نشد.

ارتباط بین فعالیت پروتئازی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و تغییر هیستوپاتولوژیکی بافت معده

با استفاده از آزمون آنالیز واریانس مشخص شد که بین فعالیت پروتئازی پایین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و گاستریت مزمن ارتباط معنی‌دار وجود دارد (P=۰/۰۴۴). ارتباط معنی‌دار دیگری بین نوع فعالیت پروتئازی و نوع ضایعه هیستوپاتولوژی معده مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱) ارتباط فعالیت پروتئازی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* با ضایعات هیستوپاتولوژی در نمونه‌های بیوپسی معده افراد عفونی. *بین فعالیت پروتئازی پایین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و گاستریت مزمن ارتباط معنی‌دار وجود دارد (p=۰/۰۴۴).

بحث

هلیکوباکتر پیلوری یکی از متداول‌ترین عوامل عفونی در سرتاسر جهان می‌باشد. از زمان کشف آن در سال ۱۹۸۲، با طیف متنوعی از بیماری‌های معده‌ای- روده‌ای ارتباط داده شده است و در حال حاضر به عنوان متداول‌ترین عامل سرطان‌های مرتبط با عفونت در نظر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

گرفته می‌شود. بیشترین میزان عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد که در آن تا ۸۰ درصد از بزرگسالان میانسال ممکن است آلوده باشند (۲۸). در مطالعه حاضر میزان شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با آزمون کشت و PCR، ۴۳/۱ درصد به دست آمد. در مطالعه‌ای دیگر در تهران *هلیکوباکتر پیلوری* را در نمونه بیوپسی ۴۸ درصد از افراد مورد مطالعه تشخیص دادند که حاکی از شیوع نسبتاً یکسان با این پژوهش بود (۲۴). فلاحی و همکاران شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* را در بیماران مبتلابه اختلالات قسمت‌های فوقانی مجرای معده‌ای- روده‌ای در بندر بوشهر با تکنیک FISH[8]، ۴۳/۵ درصد به‌دست آوردند (۲۹)، این در حالی است که شیوع بالاتر این باکتری در برخی استان‌های ایران از جمله چهار محال و بختیاری ۸۲ درصد گزارش شده است (۳۰). این تنوع با تفاوت در نواحی جغرافیایی، سن، وضعیت اقتصادی- اجتماعی، سطح تحصیلات، محیط زندگی و شغل افراد مورد مطالعه در ارتباط است (۲۸).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که علاوه بر فاکتورهای ژنتیکی میزبان و عوامل محیطی، فاکتورهای بیماری‌زایی *هلیکوباکتر پیلوری*، شدت آسیب به معده و پیامد بالینی احتمالی عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* را مشخص می‌کنند (۹). از آنجا که بیماری‌های ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* خصوصاً زخم معده و زخم دئودنال با آسیب بافتی شدید همراه است، احتمالاً پروتئازهای باکتری نقش مهمی را در این فرآیند ایفا می‌کنند. تخریب بافتی توسط پروتئازهای باکتری می‌تواند مستقیماً و یا به طور غیرمستقیم با فعال کردن پروتئارهای غیرفعال میزبانی اتفاق بیافتد. حداقل ۲۰ ژن کد کننده پروتئاز در ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری* شناسایی شده است. از آنجا که تاکنون ارتباط محصولات این ژن‌ها با ویژگی‌های بالینی مشخص نشده است، اطلاعات محدودی راجع به اهمیت بیماری‌زایی احتمالی آنها در دسترس می‌باشد (۱۸).

در پژوهش حاضر فعالیت پروتئازی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از بیماران با ضایعات هیستوپاتولوژیک مختلف با دو آزمون کمّی (اسپکتروفتومتری) و کیفی (چاهک پلیت) آزمایش و سپس ارتباط آنها با تغییر هیستوپاتولوژیکی بافت معده به لحاظ آماری بررسی شد. نتایج مطالعات ما نشان داد که اکثر سویه‌ها (۹۱/۴ درصد) فعالیت پروتئاری متوسط داشتند. همچنین هیچ‌کدام از سویه‌ها، هاله تجزیه سوبسترای کازئینی را در تست چاهک پلیت نشان ندادند. در مطالعه‌ای که توسط نیلیوس (Nilius) و همکاران به منظور سنجش فعالیت پروتئازی ۱۰ جدایه *هلیکوباکتر پیلوری* با استفاده از چندین سوبسترا، از جمله هموگلوبین گاوی، ژلاتین، سرم آلبومین گاوی و کازئین، با آزمون SDS-PAGE[9] غیر احیایی انجام گرفت، بطور مشابهی مشخص گردید که *هلیکوباکتر پیلوری* فعالیت پروتئازی قابل ملاحظه‌ای ندارد. آنها نشان دادند که این فعالیت در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* پایین‌تر از باکتری‌هایی مثل *باسیلوس*، *سودوموناس*، *پروتئوس* و سایرین است (۳۱).

ارتباط میان فعالیت پروتئازی باکتری‌ها و ضایعات بافتی حائز اهمیت است. این ارتباط در مورد باکتری‌های دیگر خصوصاً باکتری‌های عامل پریودنتیتیس[10] (از جمله *باکتروئیدس جینجیوالیس*[11] و *ترپونما دنتیکولا*[12])

[8] Fluorescent in situ hybridization
[9] Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
[10] Periodontitis
[11] Bacteroides gingivalis
[12] *Treponema denticola*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

مشاهده شده است (۳۲). نتایج مطالعه حاضر ارتباط آماری مستقیم بین فعالیت پروتئازی پایین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و ابتلا به گاستریت مزمن را نشان داد، هرچند اثبات این ارتباط نیاز به انجام مطالعات بر روی سویه‌های بیشتر و بررسی‌های دقیق‌تر دارد. ویندل (Windle) و همکاران فعالیت متالوپروتئازی وابسته به روی را در یک سویه *هلیکوباکتر پیلوری* شناسایی کردند و بیان سطحی این فعالیت متالوپروتاز را در ارتباط با پروتئولیز پروتئین‌های مختلف میزبان و نهایتاً پاتولوژی معده فرض نمودند (۳۳). اهمیت برخی از پروتئازهای *هلیکوباکتر پیلوری* در پیشروی پاتوژنز باکتری به اثبات رسیده است. در سال ۲۰۱۰، هُی (Hoy) و همکاران نشان دادند که پروتئاز HtrA *هلیکوباکتر پیلوری* یک فاکتور بیماری‌زایی ترشحی جدید است که E کادهرین، پروتئین چسبنده سلولی[۱۳] را تخریب می‌کند. از دست رفتن چسبندگی سلولی و عملکرد سد اپیتلیالی، دسترسی *هلیکوباکتر پیلوری* را به فضای بین سلولی افزایش و زمینه پیدایش بیماری‌های معدی ناشی از این باکتری را تشدید می‌کند (۱۹ و ۲۰).

اهمیت پروتئاز Clp در بیماری‌زایی و بقاء *هلیکوباکتر پیلوری* تحت شرایط استرس در ماکروفاژها توسط لَگلین (Loughlin) و همکاران، مشخص شد (۲۱). با این وجود تاکنون ارتباط بین فعالیت پروتئازی جدایه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و ضایعات بافتی ناشی از آن مورد پژوهش قرار نگرفته است.

نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان چنین بیان نمود که یافته‌های مطالعه حاضر مؤید تنوع فعالیت پروتئازی بین سویه‌های مختلف *هلیکوباکتر پیلوری* و معنی‌دار بودن ارتباط بین فعالیت پروتئازی پایین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* و گاستریت مزمن بود. که مطالعات تکمیلی جهت بررسی این ارتباط لازم می‌باشد همچنین با توجه به بالا نبودن این فعالیت در اغلب سویه‌ها، به نظر می‌رسد بیماری‌زایی سویه‌های مذکور بطور غیرمستقیم بواسطه فعال‌سازی فاکتورهای میزبانی توسط آنها و در همراهی با سایر فاکتورهای بیماری‌زای *هلیکوباکتر پیلوری* باشد که اثبات این ارتباط نیز نیازمند انجام مطالعات بیشتر می باشد.

سپاس و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مشترک دانشگاه الزهراء و پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را ازدانشگاه الزهراء و مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذای پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, et al. Distinct diversity of the cag pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2508-17.

2.Ando T, Goto Y, Ishiguro K, et al. The interaction of host genetic factors and *Helicobacter pylori* infection. Inflammopharmacology 2007; 15(1): 10-4.

[13] Cell- adhesion protein

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

3.Wroblewski LE, Peek RM. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. Gastroenterol Clin North Am 2013; 42(2): 285-98.

4.Salih BA. The role of the putative virulence markers (*cagA* and *vacA*) of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Saudi Med J 2004; 25(7): 830-6.

5.Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(22): 12778-83.

6.Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. Gut 2006; 55(6): 775-81.

7.Franco AT, Johnston E, Krishna U, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. Cancer Res 2008; 68(2): 379-87.

8.Abdollahi H, Shokoohi M, Savari M. The prevalence of *Helicobacter pylori babA2*, *iceA1* and *iceA2* genes and their association with clinical outcomes in patients with chronic gastritis, ulcerative diseases and non-ulcer dyspepsia in South East of Iran. Jundishapur J Microbiol 2013; 6(4): e4739.

9.Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. J Dig Dis 2013; 14(7): 341-9.

10.Kidd M, Peek R, Lastovica A, et al. Analysis of *iceA* genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. Gut 2001; 49(5): 629-35.

11.Peek RM, van Doorn L-J, Donahue JP, et al. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression in vivo and relationship to gastric pathology. Infect Immun 2000; 68(10): 5488-95.

12.Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(3): 1003-8.

13.Miyoshi S, Shinoda S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes infect 2000; 2(1): 91-8.

14.Frees D, Brøndsted L, Ingmer H. Bacterial proteases and virulence. Subcell Biochem 2013; 66: 161-92.

15.Maeda H. Role of microbial proteases in pathogenesis. Microbiol Immunol 1996; 40(10): 685-99.

16.Dubin G, Koziel J, Pyrc K, et al. Bacterial Proteases in Disease–role in intracellular survival, evasion of coagulation/fibrinolysis innate defenses, toxicoses and viral infections. Curr Pharm Design 2013; 19(6): 1090-113.

17.Löwer M, Weydig C, Metzler D, et al. Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA. PLoS One 2008; 3(10): e3510.

18.Wex T, Zack M, Malfertheiner P. Proteases in *Helicobacter pylori*-Mediated Diseases. In: Lendeckel U, Hooper NM, editors. Proteases in Gastrointestinal Tissues. Netherlands: Springer, 2006, 61-87.

19.Tegtmeyer N, Moodley Y, Yamaoka Y, et al. Characterisation of worldwide *Helicobacter pylori* strains reveals genetic conservation and essentiality of serine protease HtrA. Mol Microbiol 2016; 99(5): 925-44.

20.Hoy B, Löwer M, Weydig C, et al. *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. EMBO Rep 2010; 11(10): 798-804.

21.Loughlin MF, Arandhara V, Okolie C, et al. *Helicobacter pylori* mutants defective in the clpP ATP-dependant protease and the chaperone clpA display reduced macrophage and murine survival. Microb Pathog 2009; 46(1): 53-7.

22.Falsafi T, Khani A, Mahjoub F, et al. Analysis of *vacA/cagA* genotypes/status in *Helicobacter pylori* isolates from Iranian children and their association with clinical outcome. Turk J Med Sci 2015; 45(1): 170-7.

www.SID.ir

Archive of SID

23.Vaziri F, Najar Peerayeh S, Alebouyeh M, et al. Diversity of *Helicobacter pylori* genotypes in Iranian patients with different gastroduodenal disorders. World J Gastroenterol 2013; 19(34): 5685-92.

24.Yadegar A, Mobarez AM, Alebouyeh M, et al. Clinical relevance of *cagL* gene and virulence genotypes with disease outcomes in a *Helicobacter pylori* infected population from Iran. World J Microbiol Biotechnol 2014; 30(9): 2481-90.

25.Espinoza MG, Vazquez RG, Mendez IM, et al. Detection of the *glmM* gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. J Clin Microbiol 2011; 49(4): 1650-2.

26.Mohapatra BR, Bapuji M, Sree A. Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. Acta Biotechnol 2003; 23(1):75-84.

27.Vijayaraghavan P, Prakash Vincent SG. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. J Biochem Technol 2013; 4(3): 628-30.

28.Wang F, Meng W, Wang B, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. Cancer lett 2014; 345(2): 196-202.

29.Falahi J, Bahador A, Motamed N, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with upper gastrointestinal symptoms in Bushehr, Iran. Iran South Med J 2015; 18(3): 556-66. (Persian)

30.Kargar M, Souod N, Ghorbani-Dalini S, et al. Epidemiological evaluation of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastrointestinal disorders in Chahar Mahal and Bakhtiari province. J Fasa Univ Med Sci 2013; 2(4): 266-72. (persian)

31.Nilius M, Pugliese M, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* and proteolytic activity. Eur J Clin invest 1996; 26(12): 1103-6.

32.Sandholm L. Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. J Clin Periodontol 1986; 13(1): 19-26.

33.Windle HJ, Kelleher D. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1997; 65(8): 3132-7.

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Iran South Med J 2017; 20(2): 170-179

Original Article

Protease Activity of *Helicobacter Pylori* Strains and their Association with Histopathological Changes of the Gastric Tissue

S. Gharibi [1], M. Alebouyeh [2], T. Falsafi [1], N. Farzi [2], F. Vaziri [3], MR Zali [4]*

[1] Department of Microbiology, School of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

[2] Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[3] Mycobacteriology and Pulmonary Research Department, Pasteur Institute of Iran

[4] Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received 2 Mar, 2016 Accepted 19 Jul, 2016)

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* is the main cause of various gastroduodenal diseases. As the diseases caused by *H. pylori* are associated with severe tissue damage, proteases of bacteria may play an important roles in this process. In current study we investigated diversity of *H. pylori* protease activity and its association with different pathological lesions of gastric tissue.

Materials & Methods: The study was performed on 116 gastric biopsy specimens obtained from patients with gastrointestinal disorders referred to Taleghani hospital in Tehran, IR.Iran. Isolates were identified by culture and polymerase chain reaction (PCR). Their protease activity was assessed by spectrophotometric and well diffusion assays using casein as substrate. Variance analysis (One-way ANOVA) was used for statistical analysis.

Results: A prevalence of 43.1% (50/116) of *H. pylori* infection was detected in the studied patients. Histopathological lesions among 50 *H. pylori* positive patients were included: chronic gastritis 40% (20/50), intestinal metaplasia 8% (4/50), and severe active gastritis 52% (26/50). Nearly, 4.25% of the strains showed high protease activity, while 91.4% and 4.25% of the strains showed moderate and low protease activities, respectively. Statistical analysis demonstrated significant association between low protease activity of the strains and chronic gastritis (p= 0.044).

Conclusion: Results of this study indicated diversity of protease activity among different strains of *H. pylori* and significant association between low protease activity of the strains and occurrence of chronic gastritis. Further studies are necessary to investigate this association.

Keywords: *Helicobacter pylori*, prevalence, Protease activity, Histopathological changes.

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Gharibi S, Alebouyeh M, Falsafi T, Farzi N, Vaziri F, Zali MR. Protease Activity of Helicobacter Pylori Strains and their Association with Histopathological Changes of the Gastric Tissue. Iran South Med J 2017; 20(2): 170-179

Copyright © 2017 Gharibi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*] *Address for correspondence*: Foodborne and Waterborne Disease Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: masoud.alebouyeh@gmail.com

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 9:22 +0430 on Saturday May 27th 2017

www.SID.ir