

## بررسی فراوانی ژن *glmM* در افراد با تست آنتی ژن مدفوعی مثبت علیه هلیکو باکتر پیلوری (HPSA) و ارتباط آن با نوسانات سرمی سیتوکاین های $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$

آیت مرادی پور<sup>۱</sup>، افرا خسروی<sup>۲\*</sup>، محمد رضا مهربانی<sup>۳</sup>

(۱) گروه میکرو بیولوژی، واحد بروبرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروبرد، ایران

(۲) گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

(۳) گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروبرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروبرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۱

### چکیده

**مقدمه:** *glmM* یکی از ژن های شایع در هلیکو باکتر پیلوری می باشد که معمولاً برای تشخیص آلودگی افراد به از نمونه های بیوپسی معده به روش PCR، از این ژن به عنوان ژن هدف استفاده می شود. در این مطالعه به بررسی میزان شیوع ژن *glmM* در نمونه DNA های مدفوعی و ارزیابی ارتباط آن با نوسانات سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  پرداخته شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه از ۸۴ نمونه در دو گروه افراد با تست HPSA مثبت و منفی مراجعه کننده به آزمایشگاه های شهر ایلام، نمونه های خون و مدفوع دریافت شد. برای بررسی حضور ژن *glmM* از نمونه های مدفوع افراد DNA استخراج و از روش مولکولی PCR استفاده شد و در ادامه سطح سرمی سیتوکاین های مورد نظر با استفاده از کیت های اختصاصی به روش الایزا اندازه گیری و نتایج به کمک آزمون های آماری، مورد آنالیز قرار گرفت.

**یافته های پژوهش:** پس از آنالیز داده های حاصل از تحقیق مشخص شد که فراوانی ژن *glmM* در نمونه های افراد با تست آنتی ژن مدفوعی مثبت ۲۳/۸ درصد است و بین حضور این ژن در مدفوع و نوسانات سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  در سرم خون رابطه معنی داری وجود دارد ( $P < 0/05$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه به داده های حاصل از تحقیق می توان گفت که حضور ژن *glmM* با نوسانات هر یک از متغیر های HPSA،  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  در ارتباط بوده و با افزایش هر واحد HPSA و  $IL-1\beta$  احتمال حضور ژن در مدفوع بالا می رود که این مهم پیش آگهی بیماری ها با فرم ویروانس باکتری به روش های سرولوژی و مدفوعی را مطرح می سازد.

**واژه های کلیدی:** هلیکو باکتر پیلوری، *glmM*،  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$ ، HPSA

\* نویسنده مسئول: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

Email: afrakhosravi@yahoo.co.uk

## مقدمه

التهاب ناشی از عفونت هلیکو باکتر پیلوری با القا شوک اکسیداتیو توسط رادیکال های اکسیژن فعال و وادار کردن آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز (iNOS) و به دنبال آن ترشح سیتوکاین های پیش التهابی نظیر  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-6$  همراه است (۹). مرادی پور و همکاران در سال ۲۰۱۵ طی مطالعه ای که انجام دادند گزارش کردند که افزایش ترشح سیتوکاین های  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  در سرم به حضور ژن *16s rRNA* در مدفوع وابسته است (۱۰). در مطالعات ژانگ و اوباشینو در طی سال های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۸، گزارش دادند که ژن سیتوکاین های  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  در میزان حساسیت و مقاومت به عفونت هلیکو باکتر پیلوری نقش مهمی دارد (۱۱). حال با توجه به ارتباط عفونت هلیکو باکتر پیلوری با میزان نوسانات سیتوکاین هایی مانند  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$ ، تحقیق حاضر بر مبنای ارتباط بین فراوانی ژن *glmM* باکتری با نوسانات سطح سرمی سیتوکاین های  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  در افراد دارای علائم گوارشی، طراحی و انجام گردید.

## مواد و روش ها

**جمع آوری نمونه:** این پژوهش به صورت مورد شاهدی بروی ۸۴ نفر از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه های تشخیص طبی شهر ایلام انجام گرفت، که ۴۲ نفر از این افراد به عنوان گروه مورد با تست مثبت آنتی ژن مدفوعی علیه هلیکو باکتر پیلوری (HPSA) و ۴۲ نفر به عنوان گروه شاهد با تست منفی HPSA به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. علاوه بر دریافت مشخصات دمو گرافیک افراد مورد مطالعه (مانند جنس، سن، تحصیلات، شغل) در پرسشنامه تنظیمی پس از توضیح اهداف مطالعه و جلب رضایت افراد جهت شرکت در مطالعه، نمونه خون و مدفوع آن ها دریافت و برای انجام آزمایشات و مطالعات مورد نظر به آزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهر ایلام منتقل گردید.

**استخراج DNA و PCR:** استخراج DNA از تمام نمونه های مدفوع با کمک کیت استخراج DNA از مدفوع شرکت سینا کلون انجام گرفت و نمونه های

هلیکو باکتر پیلوری گونه ای از شایع ترین موجودات ذره بینی است که انسان ها را در بعد جهانی مبتلا به عفونت ساخته و بیش از نیمی از جمعیت جهان آلوده به این باکتری هستند و در برخی از افراد آلودگی با بدخیمی هایی مانند آدنوکارسینوما و لنفومای معده و دیگر ناراحتی های معده همراه است (۲،۱). طی سالیان اخیر مطالعات زیادی جهت بررسی مکانیسم های بیماری زایی و راه های تشخیص و درمان این باکتری به روش های سرولوژی و مولکولی صورت پذیرفته است، به عنوان مثال *vaca* یکی از ژن های بیماری زا و شایع در هلیکو باکتر پیلوری است که دارای دو ناحیه متغییر، سیگنا لینگ و میانی می باشد و با ایجاد واکنش در سلول های اپیتلیال میزان ایجاد بیماری می کند (۳،۴). یکی دیگر از ژن های شایع در هلیکو باکتر پیلوری ژن *ureC* است، که در سال ۱۹۹۷ توسط گودین و همکاران به ژن *glmM* تغییر نام یافت (۶،۵). *glmM* حدود ۱/۵ کیلو باز طول دارد و پروتینی به نام فسفو گلوکوز آمین موتاز را کد می کند که مستقیماً در سنتز دیواره سلولی نقش دارد (۶،۵). از ژن *glmM* که یکی از ژن های شایع در هلیکو باکتر پیلوری است، معمولاً برای تشخیص و بررسی میزان شیوع هلیکو باکتر پیلوری، به روش مولکولی PCR که از حساسیت بالایی برخوردار است و در شرایط آلودگی کاربرد بالایی دارد، به عنوان ژن هدف استفاده می شود (۷). استفاده از DNA استخراج شده از مدفوع در روش PCR برای تشخیص آلودگی عفونت هلیکو باکتر پیلوری به دلیل حضور باز دارنده های مدفوعی و تجزیه میکروارگانیسم در روده از ۲۵ تا ۱۰۰ درصد متغییر است (۸). ولی از آن جایی که این روش غیر تهاجمی است، نسبت به روش های تهاجمی ارجحیت دارد و از طرفی تناسب و همراه بودن این روش با تست های آنتی ژن مدفوعی علیه هلیکو باکتر پیلوری (HPSA) و اندازه گیری نوسانات سیتوکاین های مترشحه از سیستم ایمنی، میتواند چشم انداز تشخیصی غیر تهاجمی مفیدی را مقابل محققین و اطبا قرار می دهد. در سال ۱۹۹۶ یاما اوکا و همکاران دریافتند که

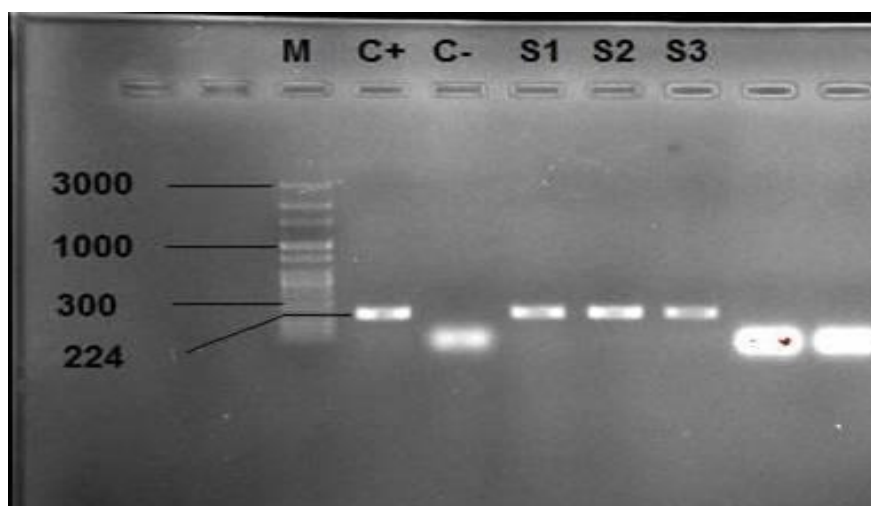
تیوپ های ۰,۲ میلی لیتر ریخته و پس از یک شیک کوتاه در Vortex، وارد دستگاه ترمو ساینکسر شد. در مرحله آخر از پروسه PCR، برای تعیین وجود ژن *glmM* در محصول PCR الکتروفورز انجام گرفت؛ به این ترتیب که ۷ میکرو لیتر از محصول PCR درون چاهک های ژل آگاروز ۱٪ واجد رنگ Safe Stain غوطه ور در تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE-1X منتقل، و به مدت یک ساعت جریان الکتریسیته با ولتاژ ۸۵ از ژل عبور داده شد. با کمک دستگاه ژل داگ (شرکت BioRad) از ژل عکس برداری و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

**الایزا:** سرم تمام نمونه های خون دریافت شده از افراد مورد مطالعه جداسازی شد و با کمک کیت های اختصاصی شرکت Booster میزان سطح سرمی سیتوکاین های TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$ ، طبق دستور العمل خود کیت اندازه گیری شد.

نتایج به دست آمده از مطالعه به کمک آزمون های آماری کلموگروف اسمیرنو، آزمون واریانس یک طرفه، تست کروس کال والیس و تست رگرسیون لجستیک توسط نرم افزار SPSS مورد آنالیز قرار گرفت. (۰/۰۵ < P) به عنوان درجه معنی داری در نظر گرفته شد.

DNA استخراج شده پس از تغلیظ به روش اتانول در فریز  $-20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. برای بررسی حضور ژن *glmM* در نمونه های DNA استخراج شده از روش PCR استفاده گردید و به همین منظور پرایمر های اختصاصی برای ژن مذکور به کمک نرم افزار IDALLEL نسخه ۵ طراحی شد که به شرح زیر است:

R: GGATAGACGATGTGATAGG و F: TTGGTTAGGGTGTAAAGC بر اساس این جفت پرایمر در صورت وجود ژن *glmM* در محصول PCR باندهایی با طول ۲۲۴bp با کمک مارکر شناسایی شد. انجام PCR با استفاده از دستگاه ترمو ساینکسر ساخت شرکت اپندورف آلمان با شرایط دمایی:  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه و در ادامه  $35^{\circ}\text{C}$  چرخه که هر چرخه شامل  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه،  $51^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه بود، و در پایان ۱۰ دقیقه در  $72^{\circ}\text{C}$  انجام شد. تکثیر DNA هدف در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر، شامل ۱۲ میکرو لیتر از مستر میکس آماده شرکت Ampliqone کشور فنلاند، ۷ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل، ۱,۵ میکرو لیتر از هرکدام از پرایمر های فوروارد و ریورز و در پایان ۳ میکرو لیتر از DNA الگو یا همان DNA های استخراج شده از نمونه های مدفوع بود که در میکرو



شکل ۱: تصویر ژل آگاروز ۱٪ حاوی باندهای ۲۲۴ جفت بازی حاصل از PCR ژن *glmM* از DNA مدفوعی

### یافته های پژوهش

در این تحقیق میانگین گروه سنی افراد در گروه مورد ۵۲/۵ و گروه شاهد ۴۲/۳ سال مشاهده شد (جدول ۱).

جدول-۱: بررسی توصیفی افراد مورد مطالعه از نظر سن و جنس

گروه مورد		گروه شاهد		متغیرها
زن	مرد	زن	مرد	
۲۲	۲۰	۲۶	۱۶	تعداد
۴۲/۳۳	۴۴/۱۵	۴۶/۶۲	۵۵/۱۲	میانگین سنی
۴۲/۳		۵۲/۵		میانگین سنی کلی گروه ها

*glmM* مثبت نبودند. ولی در گروه مورد که تست HPSA آن ها مثبت بود از ۴۲ نمونه ۲۰ نمونه DNA دارای ژن *glmM* در نمونه های DNA مدفوعی بودند (جدول ۲).

جدول-۲: بررسی توصیفی افراد مورد مطالعه از نظر حضور ژن *glmM*

ژن	گروه شاهد	گروه مورد
<i>glmM</i> +	۰	۲۰ نفر
<i>glmM</i> -	۰	۲۲ نفر

در پایان کار و انجام آنالیز داده های حاصل از مطالعه از مجموع نمونه های DNA استخراج شده از مدفوع افراد مورد مطالعه در گروه شاهد که تست HPSA آن ها منفی گزارش شده بود، هیچ کدام از لحاظ ژن

دیده شد که از نظر ژن *glmM* مثبت بودند با میانگین  $۶۰/۲۵ \text{ pg/ml}$  (جدول ۳).

از نظر میزان سطح سرمی سیتوکاین های مورد مطالعه بیشترین فراوانی افراد با میزان سطح سرمی سیتوکاین IL-1 $\beta$  بالا تر از نقطه برش  $۹ \text{ pg/ml}$ ، در نمونه هایی

جدول-۳: بررسی توصیفی سطح سرمی سیتوکاین های مورد مطالعه از نظر حضور ژن *glmM*

سطح سرمی سیتوکاین ها		گروه شاهد		گروه مورد
IL-1 $\beta$ میانگین سرمی Pg/ml	TNF- $\alpha$ میانگین سرمی Pg/ml	<i>glmM</i> -	<i>glmM</i> +	<i>glmM</i> -
۱۰/۶۲	۶۵/۳	۱۷/۸	۸۷/۶	۱۳/۵
		۸۱/۶		

بین حضور ژن *glmM* در نمونه های DNA مدفوعی و سن افراد رابطه معنی داری وجود نداشت ( $p > ۰/۰۵$ )، اما بین حضور ژن *glmM* با متغیر های کمی TNF- $\alpha$  ، IL-1 $\beta$  و HPSA رابطه معنی دار بود

همان طور که در نگاه اولیه به چشم می خورد در افرادی که دارای این ژن در DNA مدفوعی خود بودند میزان هر یک از این متغیر ها بیش تر از سایر افراد مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ۴).

جدول-۴: رابطه و میزان همبستگی ژن *glmM* با متغیر های HPSA، IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  با فرض معنی دار بودن  $\text{sig.} < ۰/۰۵$

		یا $P < ۰/۰۵$					
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1 <sup>a</sup>	HpSA	۱/۰۳۲	۰/۳۱۰	۱۱/۰۵۴	۱	۰/۰۰۱	۲/۸۰۶
	IL1- $\beta$	۰/۰۹۵	۰/۰۳۲	۸/۶۱۸	۱	۰/۰۰۳	۱/۱۰۰
	TNF- $\alpha$	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۱/۳۲۳	۱	۰/۰۴۰	۱/۰۰۴
	Constant	-۵/۲۵۳	۱/۲۲۸	۱۸/۳۰۷	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵

a. Variable(s) entered on step 1: HpSA, IL1beta, TNFalpha.

## بحث و نتیجه گیری

بر اساس آمار سازمان جهانی بهداشت تقریباً ۵۰ درصد بزرگ سالان در کشور های توسعه یافته و تقریباً ۹۰ درصد بزرگ سالان در کشور های در حال توسعه آلوده به هلیکو باکتر پیلوری هستند (۱۲). در کشور های در حال توسعه، ۷۰ تا ۸۰ درصد کودکان تا سن ۱۵ سالگی به این باکتری آلوده می شوند. زندگی در مناطق با سطح اقتصادی اجتماعی پایین نقش اولیه در انتقال این عفونت را دارد (۱۳). در مطالعات گذشته تست آنتی ژن مدفوعی به عنوان یک روش تشخیصی کم هزینه و سریع با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص عفونت هلیکو باکتر پیلوری در کودکان معرفی شد (۱۶-۱۴). در پژوهش حاضر نیز از این تست تشخیصی غیر تهاجمی برای تایید حضور عفونت باکتریایی در افراد دارای علائم گوارشی مراجعه کننده استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل در این مطالعه مشخص شد که میانگین سنی افراد آلوده به این باکتری ۴۲/۳ سال است ولی بین وجود ژن *glmM* و میزان سنی افراد رابطه معنی داری مشاهده نشد. مطابق با نتایج این تحقیق در مطالعات گذشته نیز میانگین سنی افراد آلوده به هلیکو باکتر پیلوری سنین بین ۴۰ تا ۶۰ سال گزارش شده است (۱۷-۱۹). نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از آن است شیوع هلیکو باکتر پیلوری در مردان بیشتر از زنان است (۲۰، ۲۱، ۱۷). در مطالعاتی دیگر نتایج مخالف هم مشهود است (۲۲، ۱۸). در پژوهش حاضر، فراوانی بیماران زن آلوده به هلیکو باکتر پیلوری بیش از بیماران مرد بود. که در این نتایج رابطه معنی داری بین حضور ژن *glmM* هلیکو باکتر پیلوری و جنسیت افراد مشاهده نشد. این تفاوت در نتایج مطالعات گزارش شده، به عوامل مختلفی از قبیل تفاوت در جامعه آماری، حجم نمونه، روش نمونه گیری و حتی نوع رفتارهای فردی افراد و ... مرتبط باشد. در مطالعه ی حاضر سطح سرمی سیتوکاین های *IL-1β* و *TNF-α* با متغیر های فردی (سن، جنس، تحصیلات، شغل و ...) تفاوت آماری معنی داری نشان نداد، اما اختلاف میانگین این فاکتور های ایمنی در گروه مورد و شاهد قابل توجه بود. هر چند که از نظر آماری بین جنسیت و این سیتوکاین ها ارتباط معنی داری دیده نشد، اما میانگین *IL-1β* و *TNF-α* در مردان بیش تر از زنان بود.

گزارشات قبلی نشان داده اند که افزایش سیتوکاین های پیش التهابی ممکن است فرآیند پاتو لوژیک بیماری عفونت هلیکو باکتر پیلوری را تحت تأثیر قرار دهد (۲۳، ۱۱). *TNF-α* می تواند در شرایط التهاب مزمن پیدا شود. نشان داده شده است که هلیکو باکتر پیلوری، یک پروتئین ۱۹ کیلو دالتونی (Tip) که القاء کننده *TNF-α* است ترشح می کند، که توسط فعالیت اتصال به DNA می تواند باعث افزایش بیان ژن *TNF-α* در معده شود (۲۴). در این تحقیق نیز با اندازه گیری سطح سرمی سیتوکاین های *TNF-α* و *IL-1β* در افراد مورد مطالعه مشخص شد که میزان ترشح این سیتوکاین ها در افراد دارای ژن *glmM* نسبت به افراد منفی از نظر حضور ژن در نمونه DNA مدفوعی، افزایش چشم گیری داشته که این موضوع بر اهمیت نقش این ژن (*glmM*) در تحریک سیستم ایمنی دلالت دارد. در مطالعه ای که سطح در گردش سرمی اینتر لوکین ۶ و *TNF-α* در بیماران مبتلا به عفونت هلیکو باکتر پیلوری انجام شد تفاوت آماری معنی داری در سطح سرمی *TNF-α* با سن و جنس در گروه هلیکو باکتر پیلوری مثبت و منفی دیده نشد که با نتایج مطالعه ی ما مطابقت دارد (۲۴). نتایج مطالعه ی فان در سال ۱۹۹۵ نشان داد که این پاتوژن (هلیکو باکتر پیلوری) هیچ تغییر قابل توجهی در سطح سرمی *TNF-α* ایجاد نمی کند (۲۶، ۲۵). در حالی که داده های حاصل از این پژوهش نشان از افزایش سطح سرمی سیتوکاین های *IL-1β* و *TNF-α* در افراد آلوده به هلیکو باکتر پیلوری دارد، در مطالعه ی دیگر که در سال ۲۰۱۱ توسط عبداللهی انجام شد نیز متوسط این دو سیتوکاین در گروه آلوده به هلیکو باکتر پیلوری به طور قابل توجهی بالا تر از افراد غیر آلوده بود (۲۷، ۲۴). با توجه به اطلاعات گفته شده در خصوص سیتوکاین های *IL-1β* و *TNF-α* انتظار این است که در افراد با سطح بالای پاسخ HPSA به خصوص در شرایط مزمن میزان این سیتوکاین ها یا میانگین آن دو و هم چنین فراوانی افراد با سطح بالای *IL-1β* و *TNF-α* در گروه مورد بیش تر از گروه شاهد باشد و می توان گفت که این مورد در تحقیق حاضر قابل مشاهده است، چرا که میانگین این سیتوکاین ها در گروه مورد حدوداً یک و نیم تا دو برابر این میانگین در گروه شاهد است. البته اشاره به این نکته نیز مفید است که

IL-1 $\beta$  به وجود آلودگی هلیکو باکتر پیلوری و حضور ژن *glmM* وابسته بوده و با افزایش میزان پاسخ به آنتی ژن مدفوعی (HPSA) و IL-1 $\beta$  احتمال حضور ژن *glmM* در مدفوع افزایش می یابد که این مسئله پیش آگهی بیماری با فرم ویبرولانس باکتری را با روش بررسی مدفوعی مطرح می سازد. هم چنین پیشنهاد می شود که در آینده، بررسی بیان ژن سیتوکاین های مختلف در حضور ژن *glmM* هلیکو باکتر پیلوری بیش تر مورد مطالعه و توجه قرار گیرد.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری صمیمانه پرسنل محترم آزمایشگاه ابن سینا شهرستان ایلام تشکر و قدردانی می شود.

### References

- Momtaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of Helicobacter pylori genotype status in saliva dental plaques stool and gastric biopsy samples. World J Gastroenterol 2012; 18: 2105-11.
- Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke CM. Coccoid forms of Helicobacter pylori are the morphologic manifestation of cell death. Infect Immun 1997; 65:3672-9.
- Smith SI, Fowora MA, Lesi OA, Agbebaku E, Odeigah P, Abdulkareem FB, et al. Application of stool PCR for the diagnosis of Helicobacter pylori from stool in Nigeria a pilot study. Springerplus 2012;1:78.
- Kabir S. Detection of Helicobacter pylori in faeces by culture PCR and enzyme immunoassay. J Med Microbiol 2001; 50: 1021-9.
- Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree F, Olckers A, Botha SJ, et al. Evaluation of a novel semi nested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of Helicobacter pylori in saliva and dental plaque. J Clin Microbiol 2002; 40: 205-9.
- Espinoza MG1, Vazquez RG, Mendez IM, Vargas CR, Cerezo SG. Detection of the *glmM* gene in Helicobacter pylori isolates with a novel primer by PCR. J Clin Microbiol 2011; 49: 1650-2.

افزایش سطح این سیتوکاین ها در سنین ۲۱ تا ۵۰ سال مشاهده گردیده است. از دیگر یافته های بارز این تحقیق وجود ارتباط بین نتایج PCR ژن مدفوعی *glmM* با متغیرهای TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و آزمون HPSA است که از نظر اعتبار بالینی در تشخیص، دارای اهمیت بالایی است و نشان می دهد که احتمال حضور ژن *glmM* در مدفوع با افزایش هر واحد از آزمون HPSA به میزان ۲/۹ برابر و با افزایش هر واحد از سیتوکاین IL-1 $\beta$  در سرم خون افراد آلوده به *H. Pylori* به میزان ۱/۱ برابر افزایش پیدا می کند، البته لازم به ذکر است که برای اثبات این موضوع به مطالعات بیش تر با حجم آماری و نمونه های بیش تر و گسترده تر در بازه های زمانی طولانی نیاز است. در پایان با توجه به نتایج حاصله می توان گفت که میزان نوسانات آزمون HPSA، TNF- $\alpha$  و

- Suelimieko O, Miyuki U, Lucy S. Association of lewis and secretor gene polymorphisms and Helicobacter pylori seropositivity among Japanese Brazilians. J Gastroenterol 2004; 39: 717-23.
- Farshad S, Japanese A, Alborz A, Kalani M. Genotyping of H. pylori strains isolated from patients with peptic ulcer or gastric ulcer based on RFLP-PCR gene ureAB, vacA and cagA. J Hamadan Uni Med Sci Health Serv 2008; 15: 7-11.
- Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. Gastroenterology 1996; 110: 1744-52.
- Moradipour A, Khosravi A, Mehrabi M, Faryadian S. Correlation of 16s rRNA with serum levels of the cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , in subjects with a positive Helicobacter pylori stool antigen test. J Bas Res Med Sci 2016; 3:35-40.
- Goto H. Helicobacter pylori and gastric diseases. Nagoya J Med Sci 2003;66:77-85.
- Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter 2014; 19: 1-5.
- Kusters G, Arnoud HM, Vliet VJ, Kuipers E. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 449-90.

14. Iranikhah A, Ghadir M, Sarkeshikian S, Saneian H, Heiari A, Mahvari M. Stool antigen tests for the detection of *Helicobacter pylori* in children. *Iran J Pediatr* 2013; 23:138-42.
15. Rosemary C, Andrew R, Christine M. Evaluation of *Helicobacter pylori* Immunoglobulin G and IgA and IgM serologic testing compared to stool antigen testing. *Clini Vac Immunol* 2009; 16:1253-5.
16. Gulcan E.m, Varol A, Kutlu T, Cullu F, Erkan T, Adal E. *Helicobacter pylori* stool antigen tet. *Indian J Pediatr* 2005; 72: 675-8.
17. Lopezvidal Y, Leon S, Rojas G, Barretozuniga R, Torredelgadillo A. High diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* genotypes in patients with and without gastric cancer. *PLoS One* 2008; 12: 1-7.
18. Khayat A, Soweid A, Katter M, Tawil AN, Elhadj II, Azar C, et al. Prevalence and clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genes in Lebanese patients with gastritis and peptic ulcer diseases. *J Infect Deve Count* 2007; 1:55-61.
19. Chiarini A, Cala C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, et al. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from Western Sicily Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 437-46.
20. Ahmad T, Soheil Kh, Rizwan M, Mukhtar M, Rakhshnda B, Khanum A. Prevalence of *Helicobacter pylori* pathogenicity associated *cagA* and *vacA* genotypes among Pakistani dyspeptic patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 55:34-8.
21. Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcomes in Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1648-51.
22. Miciuleviciene J, Calkauskas H, Jonaitis L, Kiudelis G, Tamosiūnas V, Praskevicius A, Kupcinskas L, Berg D. *Helicobacter pylori* genotypes in Lithuanian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer. *Medicina* 2008; 44(6): 449-54.
23. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 1153-9.
24. Abdollahi H. IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels in serum and stomach mucosa of *Helicobacter pylori*- Infected patients. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2011; 10:267-71.
25. Bayraktaroglu T, Aras AS, Aydemir S, Davutoglu C, Ustündag Y, Atmaca H. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  Interleukin-6 and interleukin-8 are not increased in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Media Inflam* 2004; 13: 25-8.
26. Fan XG, Chua A, Fan XJ, Keeling PW. Increased gastric production of interleukin-8 and tumor necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol* 1995; 48: 133-6.
27. Lindholm C, Quidingjarbrink M, Lonroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. Local cytokine response in *Helicobacter pylori* infected subjects. *Infec Immun* 1998; 66: 5964-71.

## Analyzing the Abundance of the Gene glmM in Subjects with a Positive Helicobacter pylori Stool Antigen Test (HPSA) and Correlating glmM Abundance with Serum Levels of Cytokines TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$

Moradipour A<sup>1</sup>, Khosravi A<sup>2\*</sup>, Mehrabi M<sup>3</sup>

(Received: February 10, 2015 Accepted: June 6, 2016)

### Abstract

**Introduction:** One of the most common genes in *Helicobacter pylori* is glmM which is usually used for identification of infection with the bacterium within gastric biopsy specimens by PCR, as a target gene. The aim of this study was to examine the prevalence rate of glmM gene in DNA samples of stool and evaluate its relationship with the fluctuations of serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

**Materials & methods:** In this study, blood and stool samples were collected from 82 subjects in two groups with positive and negative HPSA test referred to laboratories of Ilam, Iran. PCR was used to investigate the presence of glmM gene in DNA extracted from stool samples, and then serum levels of studied cytokines were measured using specific kits by ELISA, and the results were analyzed using statistical tests.

**Findings:** Analysis of data obtained from the study showed that the frequency of glmM gene in the sample of cases with positive HPSA was 23.8%, and there was a significant relationship between the presence of this gene in stool and fluctuations in serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (P < 0.05).

**Disussion & conclusion:** According to data, it can be said that the presence of glmM gene was associated with fluctuations in any of the variables of HPSA, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and the possible presence of the gene in the stool raises with increase in each unit of HPSA and IL-1 $\beta$ , which in turn raises the prognosis of diseases with a virulence form of bacteria by both serology and stool methods.

**Keywords:** Helicobacter pylori, glmM, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , HPSA

1. Dept of Microbiology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

2. Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Dept of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

\* Correspondin author Email: afrakhosravi@yahoo.co.uk