

## بررسی ارتباط بین شدت بیماریزایی با میزان اتصال و حضور ژن های توکسین در هلیکوباکتر پیلوری

زینب فاضلی<sup>۱</sup>، مسعود آل بویه<sup>۲\*</sup>، مصطفی رضایی طاویرانی<sup>۱</sup>، محمدرضا زالی<sup>۳</sup>

(۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
(۲) مرکز تحقیقات بیماری های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
(۳) تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۳

### چکیده

**مقدمه:** شدت عوارض بالینی ایجاد شده در بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بسته به تنوع ژنتیکی سویه های باکتری متفاوت می باشد. کلونیزاسیون و اتصال باکتری به میزبان به عنوان اولین مرحله بیماریزایی مطرح می باشد. این مطالعه با هدف بررسی فاکتورهای بیماریزا در سویه های هلیکوباکتر و قدرت چسبندگی آن ها به رده سلولی AGS و ارتباط این چسبندگی با شدت عوارض بالینی در بیماران آلوده به این سویه ها انجام شده است.

**مواد و روش ها:** ژن های *vacA*، *iceA*، *cagA*، *babA* و *cag-PAI* در سویه های باکتری با قدرت بیماریزایی متفاوت با PCR مورد بررسی قرار گرفتند. هم چنین تیمار رده سلولی AGS با این سویه های باکتری به منظور بررسی ارتباط بین میزان اتصال با قدرت بیماریزایی آن ها در بیماران آلوده، مورد آزمایش قرار گرفته شد.

**یافته های پژوهش:** سویه هایی با قدرت بیماریزایی شدید دارای همه ژن ها و در سویه دیگر ژن های موثر در فرآیند اتصال باکتری حضور داشتند. نتایج میزان اتصال نیز حاکی از تفاوت بین سویه ها می باشد. در سویه های بیماریزاتر، بالاترین و سویه دیگر کمترین، میزان اتصال مشاهده شد.

**بحث و نتیجه گیری:** در اتصال باکتری به میزبان، بسیاری از ژن ها نقش دارند که حضور و یا عدم حضور یک یا دو ژن تاثیر زیادی بر روی قدرت و میزان اتصال باکتری به سلول میزبان نخواهد داشت. ژن های چسبندگی در حضور آنکوژن ها می توانند سبب تظاهرات بالینی شدیدتری در میزبان شوند.

**واژه های کلیدی:** هلیکوباکتر پیلوری، قدرت اتصال، پاتوژن

\*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران-

مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: masoud.alebouyeh@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک ارگانیزم گرم منفی، میکروآتروفیلیک کند رشد، مارپیچی شکل می باشد که در موکوس معده بیش از ۵۰ درصد جمعیت انسانی مشاهده می شود. در افراد آلوده به این باکتری ریسک ابتلا به زخم معده، زخم روده و یا حتی سرطان معده افزایش می یابد(۱). بر این اساس در سال ۱۹۹۴ آژانس بین المللی تحقیقات سرطان(IARC)، هلیکوباکتر را به عنوان کارسینوژن تیپ ۱ معرفی کرد و جایزه نوبل پزشکی در سال ۲۰۰۵ برای کشف این باکتری و نقش آن در ایجاد زخم معده به وارن و مارشال داده شد(۲).

مطالعات ژنتیکی نشان داده است که سویه های مختلف این باکتری تنوع ژنتیکی بالایی دارند. این تنوع ژنتیکی در ژن های بیماریزا، می تواند در فرآیند بیماریزایی این باکتری تاثیرگذار باشد و در نتیجه آن تنوع گسترده بیماریزایی این باکتری مشاهده می شود. بنا بر این، علاوه بر فاکتورهای ایمونولوژیک میزبان و فاکتورهای محیطی، تنوع ژنتیکی سویه های باکتری عامل مهمی در قدرت بیماریزایی این باکتری به شمار می آید(۳).

فاکتورهای بیماریزایی متعددی در ایجاد عفونت ایجاد شده توسط هلیکوباکتر معرفی شده اند که در این میان CagA که توسط ژن های مرتبط با جزایر بیماریزایی cag-PAI کد می شود و سیتوتوکسین VacA نقش عمده ای را در قدرت و شدت بیماریزایی هلیکوباکتر بر عهده دارند. هم چنین مطالعات نشان داده اند که ژن های ناحیه لوکوس cag-PAI نیز نقش مهمی در پاسخ های التهابی میزبان و کارسینوژنز این باکتری دارند. این لوکوس یک توالی با طول ۴۰ Kb است که ۳۲ ژن را کد می کند. تقریباً ۶۰ درصد سویه های غربی و ۹۰ درصد سویه های شرقی دارای cag-PAI هستند(۴،۵).

مطالعات انجام شده در دهه اخیر نشان داد که cag-PAI، در سویه هایی با بیماریزایی بالا دیده می شود، اما در میان مطالعات بسیاری نیز نشان داده اند که در سویه های جدا شده از افراد با شدت بیماری کمتر نیز این نواحی ژنی وجود دارند(۶،۷). از این نتایج چنین استنباط می شود که شدت بیماریزایی

هلیکوباکتر مولتی فاکتوریال می باشد و لازم است تا ارتباط دیگر فاکتورهای این باکتری با شدت بیماریزایی نیز مورد بررسی قرار گیرد. فاکتورهای بسیاری در ارتباط با بیماریزایی هلیکوباکتر پیلوری تعیین شده اند که نقش مستقیمی در فعالیت کلونیزاسیون و نیز آسیب به سلول میزبان دارند. تحقیقات سال های اخیر فاکتورهای چسبندگی هلیکوباکتر و تعدادی از رسپتورهای سلولی میزبان این فاکتورها را شناسایی کرده است. تقریباً ۴۰ درصد ژنوم هلیکوباکتر مسئول کد کردن پروتئین های غشاء خارجی می باشند(۷) گمان می رود که babA اولین پروتئینی باشد که در اتصال به موکوس معده نقش دارد. این پروتئین توسط ژن babA2 کد می شود و به آنتی ژن fucosylated Lewisb antigen در سلول های اپیتلیوم معده باند می شود و سبب تسهیل اتصال باکتری به این سلول ها می شود که در نتیجه می تواند در کارایی بالاتر انتقال فاکتورهای بیماریزایی باکتری به میزبان نقش داشته باشد(۸-۱۱). ژن babA1 به علت عدم وجود کدون آغازین بیان نمی شود. بعضی از مطالعات حاکی از ارتباط بین حضور babA2 و ایجاد زخم دئودنال و سرطان معده می باشند و نیز گزارش شده است که ارتباط بین این فاکتور با آلل cagA و vacA سبب ایجاد ریسک بالایی بیماری های معده ایی شدید می باشد(۱۲). در کشورهای آسیایی اغلب سویه های هلیکوباکتر بدون در نظر گرفتن شدت بیماریزایی دارای babA2 هستند و فراوانی این ژن در مناطق مختلف متفاوت است. هم چنین ارتباط این ژن با قدرت بیماریزایی باکتری در مناطق مختلف متغییر است(۱۳-۱۶). از دیگر ژن های موثر در فرآیند اتصال باکتری به میزبان می توان به ژن iceA اشاره کرد. این ژن در هلیکوباکتر پیلوری دارای دو واریانت iceA1 و iceA2 می باشد. بیان iceA1 در اثر تماس باکتری با سلول های اپیتلیوم معده افزایش پیدا می کند. مطالعاتی در مورد ارتباط ژنوتیپ iceA1 با اولسر پپتیک وجود دارد، ولی مطالعات در این مورد نتایج متفاوتی را نشان می دهند. از طرفی ارتباط ژنوتیپ iceA1 با بیان IL-8 و التهاب حاد آنتروم به اثبات رسیده است(۱۷،۱۸). مطالعاتی در زمینه فراوانی

هلیکوباکتر پیلوری انتخاب شده، ژنوتایپینگ به کمک روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن های *iceA*، *vacA*، *cagA*، *babA* و ناحیه *cag-PAI* انجام گرفت.

به منظور بررسی ژنوتایپ ژن های *iceA*، *cagA*، *babA* و *vacA* در سویه های هلیکوباکتر پیلوری، این نواحی به کمک جفت پرایمرهای استفاده شده در مقاله وزیری و همکاران، با روش PCR انجام شد (۳۲). به این منظور محصول واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت زیر تهیه شد. ۲/۵ میکرولیتر از Taq™ DNA 1X PCR buffer، ۰/۲ میکرولیتر از Taq™ DNA polymerase (۰/۵ U/ml)، ۰/۳ میکرولیتر از DNTP Mix (۱۰ mM)، ۰/۳ میکرولیتر از پرایمر (خارجی و داخلی) (۱۰ pm)، ۱ میکرولیتر از  $MgCl_2$  (۱/۵ mM)، ۱ میکرولیتر از DNA (۱۵۰ ng) و با  $ddH_2O$  به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR برای ژن های *vacA*، *iceA*، *cagA*، *babA* شامل دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۴ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه متوالی از واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه و دمای اتصال پرایمری ۵۸ درجه سانتی گراد برای ۴۰ ثانیه، دمای تکثیر قطعات در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه/ kb انجام شد و در نهایت به منظور تکمیل فرآیند تکثیر قطعات در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه اعمال شد. به منظور بررسی ژن های ناحیه *cag-PAI* در سویه های هلیکوباکتر پیلوری، ژنوتایپینگ این ناحیه به کمک یازده جفت پرایمر که توسط یادگار و همکاران طراحی شده بودند، با روش PCR انجام شد (۳۱). برنامه PCR برای این ژن ها شامل دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۴ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه متوالی از واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه و دمای اتصال پرایمری مناسب هر پرایمر برای ۴۵ ثانیه، دمای تکثیر قطعات در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه/ kb انجام شد و در نهایت به منظور تکمیل فرآیند تکثیر قطعات در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه اعمال شد. سپس محصولات با ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند.

حضور ژن های ناحیه *cag-PAI* و ارتباط آن ها با شدت بیماری در ایران صورت گرفته است (۱۹،۲۰). در این مطالعه علاوه بر حضور ژن های ناحیه *cag-PAI* و نیز *vacA* به بررسی ژن های چسبندگی *iceA* و *babA* نیز پرداخته شده است. هم چنین میزان اتصال سویه های مورد مطالعه به رده سلولی AGS به منظور بررسی ارتباط میزان چسبندگی با قدرت بیماریزایی هلیکوباکتر پیلوری نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش ها

کشت و تایید ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری: به منظور بررسی ارتباط بین فاکتورهای ژنتیکی و قدرت چسبندگی سویه های هلیکوباکتر پیلوری با قدرت بیماریزایی در بیماران آلوده به سویه های مذکور، سه سویه هلیکوباکتر با قدرت بیماریزایی مختلف-سویه HC-113 جدا شده از بیمار متاپلاژی، سویه OC149 جدا شده از بیمار گاستریت مزمن فعال و سویه OC236 جدا شده از بیمار گاستریت مزمن فعال ملایم- موجود در مرکز تحقیقات بیماری های ناشی از آب و غذای پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران که در محیط BHI حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و ۱۰ درصد FCS در ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شده بودند، انتخاب شدند. این سویه ها بر روی محیط بروسلا آگار حاوی ۷ درصد خون اسب، وانکومایسین ۲ mg، پلی میکسین ۰/۰۵ mg، تری متوپریم ۱ mg و آمفوتریسین B ۲/۵ mg/l (مرک، آلمان)، کشت داده شدند و به مدت ۵ تا ۷ روز در ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور  $CO_2$  دار انکوبه شدند و پس از تایید با رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی کلنی، تست های کاتالاز، اکسیداز و اوره آز، ایزوله ها در محیط BHI حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و ۱۰ درصد FCS در ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند.

استخراج DNA و ژنوتایپینگ ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری: DNA ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری با کمک QIAamp DNA extraction kit (کیاژن، آلمان) بر طبق دستور عمل کیت استخراج شده و DNA ایزوله های مذکور در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند. به منظور تعیین ژنوتایپ ایزوله های

و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت سه روز قرار داده شد. تعداد کلنی ها پس از ۷۲ ساعت به صورت تقریبی و با شمارش کلونی ها به صورت چشمی با یکدیگر مقایسه شدند.

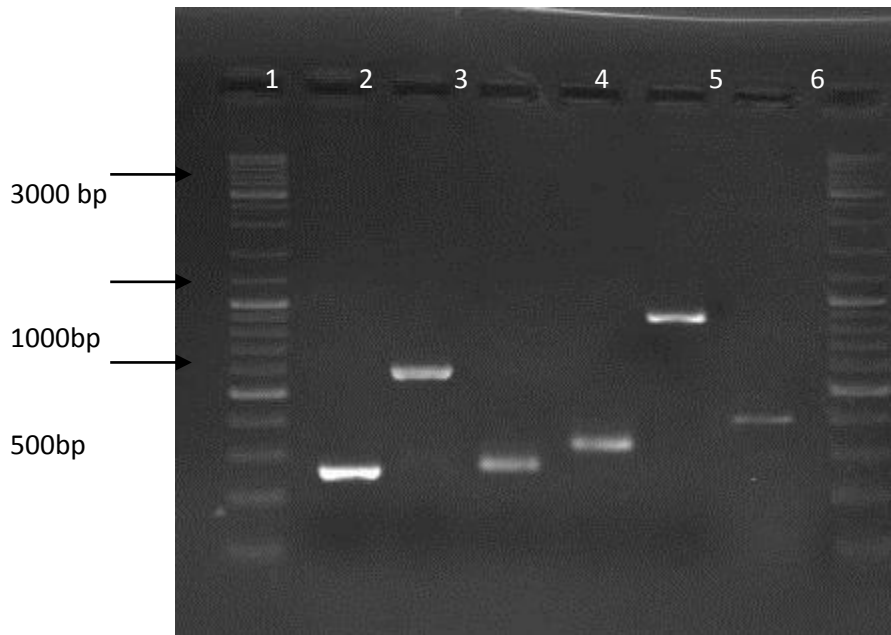
### یافته های پژوهش

به منظور تعیین ژنوتیپ ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری انتخاب شده، ژنوتایپینگ به کمک روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن های *iceA*, *cagA*, *babA* و *vacA* و ناحیه *cag-PAI* با پروتکل گفته شده در قسمت مواد و روش ها انجام گرفت. نتایج مربوط به ژنوتایپینگ *cagA* و *vacA* و نیز ژنوتایپینگ لوکوس *cag-PAI* نشان داد که دو سویه OC149 و HC113 برای تمامی این ژن ها مثبت هستند. هم چنین نشان داده شد که سویه HC113 برای ژن *vac* دارای آلل *vacslm2* و سویه OC149 برای این ژن دارای آلل *vacslm1* می باشد. هم چنین نتایج مربوط به ژنوتایپینگ *cagA* و *vacA* و نیز ژنوتایپینگ لوکوس *cag-PAI* نشان داد که سویه OC236 فاقد این نواحی ژنی می باشد. نتایج مربوط به ژنوتایپینگ *babA* و *iceA* با روش PCR با پرایمرهای اختصاصی این نواحی ژنی نشان داد که هر سه سویه انتخابی دارای این نواحی ژنی هستند و نیز هر سه سویه دارای آلل *babA* و *iceA* می باشند (شکل شماره ۱ و ۲).

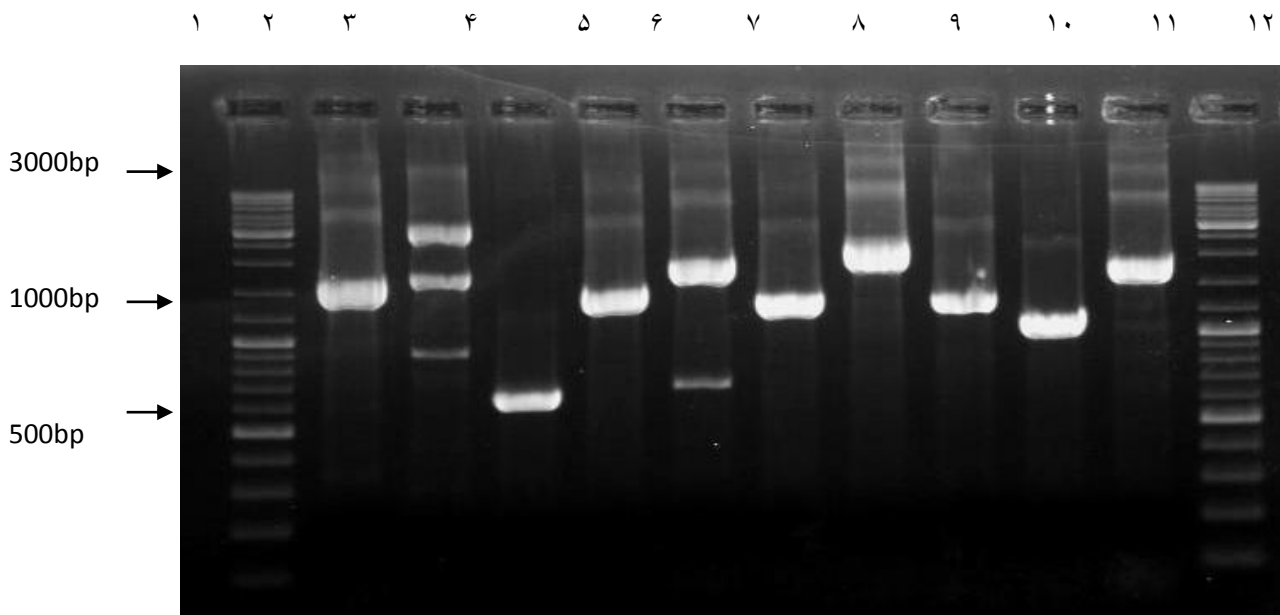
اتصال سویه های باکتری به رده سلولی AGS بر اساس روش ذکر شده در قسمت مواد و روش ها، نشان داد که سویه HC113 با تعداد Bacteria/Cell ۰/۸۳ دارای بیشترین قدرت اتصال به AGS و سویه OC149 با Bacteria/Cell ۰/۰۰۸۳ پس از این سویه دارای بیشترین قدرت اتصال به AGS می باشد. سویه OC236 نیز با Bacteria/Cell  $10^{-4} \times 1/6$  دارای کمترین قدرت اتصال به AGS می باشد.

-کشت سلولی رده سلولی AGS به منظور انجام کوانیفکت، از رده سلولی AGS که منشأ آن سلول های آنوکارسینوما می باشد استفاده شد. این رده سلولی که از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شده اند، در شرایط استوک در مرکز تحقیقات بیماری های ناشی از آب و غذای پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران در تانک ازت نگهداری شد. محیط کشت مورد استفاده HDMEM حاوی ۱۰ درصد از FBS و ۱ درصد از اسید آمینه های غیر ضروری از شرکت GIBCO (Grand Island, NY) بود. سلول ها چندین نسل در فلاسک های مخصوص کشت سلولی پاساژ داده شدند (۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد  $CO_2$ ). برای پاساژ این سلول ها از مخلوط تریپسین-EDTA (۰/۲۵ درصد) (Gibco) استفاده گردید.

-آزمون اتصال: به منظور انجام آزمون اتصال، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمون ابتدا سلول های رشد داده شده در پلیت شش خانه با D-PBS شستشو داده و سپس محیط H-DMEM بدون آنتی بیوتیک به پلیت کشت سلول افزوده شد. در روز آزمون سویه های باکتری با  $MOI=100$  به هر پلیت کشت سلول اضافه شد. پلیت ها تکان داده شدند تا باکتری ها به طور یکنواخت پخش گردند. پلیت ها در انکوباتور به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، ابتدا محیط کشت سلولی حذف گردید و هر پلیت ۳ مرتبه با D-PBS شستشو شد. سپس به هر پلیت تریتون X-100 (۱ درصد) اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار شد تا لیز سلولی انجام گیرد. جهت بررسی تعداد سلول های متصل شده بعد از زمان انکوباسیون  $10 \mu l$  از لیزات سلولی با  $90 \mu l$  در محیط BHI مخلوط شد (رقت  $10/1$ ) و  $10 \mu l$  از آن بر روی محیط بروسلا آگار تلقیح



شکل شماره ۱. محصولات PCR ژن های *vacA*, *cagA*, *iceA*, *babA* .  
 ستون ۱ و ۸ Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)، ستون ۲ ژن *babA2* (۲۷۱ bp)، ستون ۳ ژن *vacm1* (۵۶۷ bp)، ستون ۴ ژن *vacs1* (۲۵۹ bp)، ستون ۵ ژن *vacs2* (۲۸۶ bp)، ستون ۶ ژن *iceA1* (۹۰۰ bp)، ستون ۷ ژن *cagA* (۴۰۰ bp)



شکل شماره ۲. محصولات PCR پرایمرهای اختصاصی ژن های ناحیه Cag-PAI سویه هلیکوباکتری پیلوری  
 ستون ۱ و ۱۲ Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)، ستون ۲ *cagδ-cagδ* (Wild (intact): ۱۰۹۲ bp)، ستون ۳ *cagα-cagY* (۱۸۱۸ bp)، ستون ۴ *cagδ-cagγ* (۱۴۱۷ bp)، ستون ۵ *cagp-cagM* (۶۰۱ bp)، ستون ۶ *cagX-cagW* (۱۳۰۶ bp)، ستون ۷ *cagW-cagT* (۲۲۸ bp)، ستون ۸ *cagL-cagH* (۱۳۲۹ bp)، ستون ۹ *cagE-cagC* (۱۰۸۳ bp)، ستون ۱۰ *cagC-cagA* (۱۹۱۷ bp)

## بحث و نتیجه گیری

هلیکوباکتر پیلوری تقریباً نیمی از جمعیت دنیا را آلوده کرده است و در ارتباط با بیماری هایی از جمله پپتیک اولسر، لمفوم MALT و سرطان معده می باشد. مطالعات نشان داده اند که میزان ابتلا و شدت بیماریزایی سویه های هلیکوباکتر پیلوری بسته به مناطق مختلف در جمعیت ها متفاوت است (۲۱-۲۳).

یکی از علل تنوع تظاهرات بالینی ایجاد شده توسط این باکتری، تفاوت ژنوتیپ سویه های هلیکوباکتر و نیز عملکرد محصولات این ژن ها با میزبان می باشد. یافته های متعددی ارتباط بین ژنوتیپ فاکتورهای بیماریزایی و عوارض بالینی را نمایان ساخته اند (۲۴،۲۵). بر اساس یافته های وزیری و همکاران نیز تنوع وسیع ژنوتیپی در میان جدایه های مورد مطالعه مشاهده شد، به طوری که جدایه های ایرانی در این تحقیق ۲۰ ژنوتیپ مختلف را از نظر ترکیب ژنی *vacA*، *cagA*، *iceA* و *babA* نشان دادند. تنوع وسیع ژنوتیپی این جدایه ها در این مطالعه موید تغییرات ژنتیکی فراوان این باکتری ها در ایران می باشد. ارتباط ژنوتیپ های گوناگون با علائم بالینی و عوارض پاتولوژیک نشان داد که ترکیب ژنوتیپی *cagA+/vacAs<sub>1</sub>m<sub>1</sub>/iceA<sub>2</sub>/babA* ارتباط معناداری را با بیماری گاستریت مزمن شدید فعال دارد (۲۶). این مطلب موید آن است که این الگوی ژنوتایپینگ می تواند تا حدی یک روش مناسب برای بررسی و پیش بینی علائم بالینی در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری باشد، که البته تایید این یافته نیازمند انجام مطالعه بیشتر و در سطح وسیع تر می باشد.

مهم ترین و شناخته شده ترین فاکتورهای ویروالانس هلیکوباکتر پروتئین های *CagA* و *VacA* می باشند. ژن های ناحیه لوکوس *cag-PAI* نیز نقش مهمی در پاسخ های التهابی میزبان و کارسینوژن این باکتری دارند. ساختار *vacA* بر اساس ناحیه های *s* و *m* دارای تنوع می باشد. ژنوتیپ *vacA s<sub>1</sub>/m<sub>1</sub>* دارای فعالیت بیشتری نسبت به ژنوتیپ *vacA s<sub>1</sub>/m<sub>2</sub>* می باشد و ژنوتیپ *vacA s<sub>2</sub>/m<sub>2</sub>* فاقد فعالیت می باشد. به طوری که مشخص شده است در

کشورهای غربی، ژنوتیپ *vacA s<sub>1</sub>/m<sub>1</sub>* بیشتر در ارتباط با بیماری های اولسر و سرطان معده می باشد (۱۰،۲۷). مطالعات انجام شده در دهه اخیر نشان دادند که *cag-PAI* سیستم ترشحی تیپ ۴ را که در اغلب گونه های هلیکوباکتر پاتوژنیک دیده می شود کد می کند. مطالعات بیشتر نشان داد که این سیستم در انتقال موثر پروتئین *CagA* و پپتیدوگلیکان باکتریایی به سلول های میزبان نقش موثری ایفا می کند. این یافته ها تا حدودی می تواند توضیح دهنده نتایج بالینی حاصل از ابتلا به سویه های مختلف هلیکوباکتر باشند. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می دهد که دو سویه هلیکوباکتر که دارای کلیه ژن های ناحیه *cag-PAI* و نیز برای ژن های *vacA*، *cagA* مثبت بودند قدرت بیماریزایی شدیدتری را نشان داده اند. اگر چه مطالعات بسیاری تاثیر حضور این ژن ها را با شدت تغییرات هستیویاتولوژی بافت معده، زخم معده و کارسینوژن نشان داده اند، اما برای تایید این ارتباط نیاز به مطالعات بیشتر در جمعیت های مختلف می باشد.

مطالعات انجام شده بر روی فاکتور بیماریزایی *babA2* اطلاعات متفاوتی را در ارتباط با مناسب بودن آن به عنوان مارکر مناسب برای پیش بینی تظاهرات بالینی ایجاد شده در بیماران آلوده به هلیکو باکتر نشان داده اند. این مطالعات بسته به مناطق جغرافیایی سویه های هلیکوباکتر، اطلاعات متفاوتی را بیان داشته اند (۶). *babA2* جدا شده از سویه های پرتغال و تایلند با سرطان معده و زخم روده ارتباط معناداری را نشان نداده اند، در حالی که *babA2* جدا شده از سویه های مناطقی مانند آلمان و ترکیه با شدت بیماریزایی رابطه معناداری داشته اند (۲۸،۲۹). در مطالعه حاضر نیز با این که هر سه سویه دارای ژن *babA2* و نیز *iceA1* بودند اما تفاوت قابل چشمگیری را در میزان اتصال به سلول میزبان نشان دادند. این مطالعات پیشنهاد می کنند که اگر چه اتصال هلیکوباکتر به میزبان نقش مهمی را در تغییر فرآیندهای سلولی میزبان ایفا می کند، اما شدت بیماریزایی با فاکتورهای متعددی در ارتباط می باشد. اتصال باکتری به سلول توسط حداقل پنج ژن مختلف که هر کدام رسپتورهای اختصاصی خود را بر روی غشاء سلول میزبان دارند،

وجود داشته باشد علائم بالینی شدیدتری را ایجاد می کنند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان می دهد که ژن های موثر در فرآیند اتصال از جمله iceA1 و babA2 در صورت حضور دو توکسین vacA و cagA عوارض بیماریزایی شدیدتری را نشان می دهند.

مطالعه حاضر نشان داد که حضور ژن های babA2 و iceA1 به تنهایی بیانگر قدرت و میزان اتصال باکتری به میزبان نمی تواند باشد و نیز حضور دیگر فاکتورهای چسبندگی و نیز ژن های بیماریزایی باکتری در این فرآیند نقش دارند. هم چنین قدرت بیماریزایی باکتری و تظاهرات بالینی در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بسته به عوامل ژنتیکی افراد و عوامل محیطی می تواند متفاوت باشد. برای بررسی دقیق تر نقش فاکتورهای بیماریزایی در سویه های هلیکوباکتر و قدرت چسبندگی این سویه ها به رده سلولی AGS و ارتباط این چسبندگی با قدرت بیماریزایی این سویه های باکتری مطالعات بیشتر نیاز می باشد.

تسهیل می شود (۳۰). اطلاعات به دست آمده از مطالعات ذکر شده پیشنهاد می کند که حضور و یا عدم حضور یک یا دو ژن تاثیر قابل ملاحظه ای بر روی قدرت و میزان اتصال باکتری به سلول میزبان نخواهد داشت. البته برای اثبات این نظریه لازم است تا ارتباط دیگر فاکتورهای چسبندگی بر روی قدرت اتصال باکتری به میزبان مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

عوامل متعددی در شدت بیماریزایی در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری تاثیرگذار هستند. بسیاری از این عوامل به ژنتیک میزبان و عوامل محیطی مرتبط می باشند. مطالعات نشان داده اند که پلی مورفیسم های ژن های سیتوکاین میزبان، رژیم غذایی پر نمک می تواند در بروز متفاوت تظاهرات بالینی در افراد آلوده نقش داشته باشند. در نتیجه فاکتورهای بیماریزایی باکتری به همراه عوامل ژنتیکی میزبان و عوامل محیطی در شدت بروز عوارض بالینی نقش دارند. در نتیجه عوامل ژنتیکی میزبان نقش مهمی را در کلونیزاسیون موفق باکتری ایفا می کند. در واقع می توان گفت که فاکتورهای بیماریزایی باکتری در صورتی که زمینه ژنتیکی و محیطی مناسب در میزبان

#### References

1. Rothenbacher D, Brenner H. Burden of Helicobacter pylori and H. pylori related diseases in developed countries recent developments and future implications. *Microbes Infec* 2003;5:693-703.
2. Herrera V, Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infec* 2009;15:971-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03031.x.
3. Polk DB, Peek RM. Helicobacter pylori gastric cancer and beyond. *Nature Rev Cancer* 2010;10:403-14. doi: 10.1038/nrc2857.
4. Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by Helicobacter pylori. *Cell Com Sig* 2011;9:28. doi: 10.1186/1478-811X-9-28.
5. Hatakeyama M. SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis. *Current Opin Microbiol* 2008;11:30-7. doi: 10.1016/j.mib.2007.12.003.
6. Ghosh P, Sarkar A, Ganguly M, Alam J, De R, Mukhopadhyay AK. Helicobacter pylori strains harboring babA2 from Indian sub population are associated with increased virulence in ex vivo study. *Gut Patho* 2016;8:1. doi: 10.1186/s13099-015-0083-z.
7. Yamaoka Y. Mechanisms of disease Helicobacter pylori virulence factors. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:629-41. doi: 10.1038/nrgastro.2010.154.
8. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993;262:1892-5.

9. Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL, Andersen LP, Wadstrom T. Basic bacteriology and culture in *Helicobacter pylori* Physiology and Genetics. 1<sup>th</sup> ed. Washington ASM Publication. 2001.
10. Sheu BS, Yang HB, Yeh YC, Wu JJ. *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric epithelium: a bug's first step is a novel target for us. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:26-32. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06141.x.
11. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* babA in gastroduodenal pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008;14:4265.
12. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:12778-83.
13. Oliveira AG, Santos A, Guerra JB, Rocha GA, Rocha AMC, Oliveira CA, et al. babA2- and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41:3964-6.
14. Mattar R, Santos AFd, Eisig JN, Rodrigues TN, Silva FM, Lupinacci RM, et al. No correlation of babA2 with vacA and cagA genotypes of *Helicobacter pylori* and grading of gastritis from peptic ulcer disease patients in Brazil. *Helicobacter* 2005;10:601-8. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00360.x
15. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA cagA cagE iceA babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter* 2006;11:574-80. doi: 10.1111/j.1523-5378.2006.00461.x
16. Mottaghi B, Safaralizadeh R, Bonyadi M, Latifi-Navid S, Somi MH. *Helicobacter pylori* vacA i region polymorphism but not babA2 status associated to gastric cancer risk in northwestern Iran. *Clin Exp Med* 2016;16:57-63. doi: 10.1007/s10238-014-0327-0.
17. Xu Q, Morgan R, Roberts R, Xu S, Van Doorn L, Donahue J, et al. Functional analysis of iceA1, a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3839-47.
18. Shiota S, Watada M, Matsunari O, Iwatani S, Suzuki R, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* iceA, clinical outcomes, and correlation with cagA: a meta-analysis. *PLoS One* 2012;7: 30354. doi: 10.1371/journal.pone.0030354.
19. Ahmadzadeh A, Ghalehnoei H, Farzi N, Yadegar A, Alebouyeh M, Aghdaei H, et al. Association of CagPAI integrity with severeness of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastritis. *Pathol Biol* 2015;63:252-7. doi: 10.1016/j.patbio.2015.09.004.
20. Yadegar A, Alebouyeh M, Zali MR. Analysis of the intactness of *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in Iranian strains by a new PCR-based strategy and its relationship with virulence genotypes and EPIYA motifs. *Infect Genet Evol* 2015;35:19-26. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.026.
21. Torres LE, Melian K, Moreno A, Alonso J, Sabatier CA, Hernandez M, et al. Prevalence of vacA cagA and babA2 genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol* 2009;15:204-10.
22. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Int J Med* 2008;47:1077.
23. Alizadeh A, Ansari S, Ranjbar M, Shalmani H, Habibi I, Firouzi M, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Nahavand: a population based study. *Clin Exp Med* 2009;4:31-7.
24. Shokrzadeh L, Baghaei K, Yamaoka Y, Dabiri H, Jafari F, Sahebkhaki N, et al. Analysis of 3'-end variable region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolated from Iranian population. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:172-7. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05979.x.



25. Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, Dabiri H, Yamaoka Y, Bolfion M, et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the *cag* pathogenicity island isolated from Iranian patients. *Dig Liver Dis* 2009;41:634-8. doi: 10.1016/j.dld.2009.01.010.
26. Vaziri F, Najari Peerayeh S, Alebouyeh M, Mirzaei T, Yamaoka Y, Molaei M, et al. Diversity of *Helicobacter pylori* genotypes in Iranian patients with different gastroduodenal disorders. *World J Gastroenterol* 2013;19:5685-92. doi: 10.3748/wjg.v19.i34.5685.
27. Miehle S, Kirsch C, Aghaamiri K, Gunther T, Lehn N, Malfertheiner P, et al. The *Helicobacter pylori* *vacA* s1, m1 genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 2000;87:322-7.
28. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, et al. Role of host interleukin 1 $\beta$  gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene IL-1RN polymorphisms in clinical outcomes in *Helicobacter pylori*-positive Turkish patients with dyspepsia. *J Gastroenterol* 2008;43:705-10. doi: 10.1007/s00535-008-2220-7.
29. Azevedo M, Eriksson S, Mendes N, Serpa J, Figueiredo C, Resende L, et al. Infection by *Helicobacter pylori* expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype. *The J Pathol* 2008;215:308-16. doi: 10.1002/path.2363.
30. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein oipA of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:7533-8. doi: 10.1073/pnas.130079797.

## Effects of Pathogenesis Outcomes on Adherence Rate and Gene Toxicity in *Helicobacter pylori*

Fazeli Z<sup>1</sup>, Alebouyeh M<sup>2,3\*</sup>, Rezaeitavirani M<sup>1</sup>, Rezazali M<sup>3</sup>

(Received: February 7, 2017)

Accepted: August 14, 2017)

### Abstract

**Introduction:** The clinical outcome of *Helicobacter pylori* in the infected patients depends on the genetic diversity of *H. pylori* strains. Colonization and adherence on cell host is the first step of the bacteria pathogenesis. This study was aimed to understand the role of pathogenesis factors of *H. pylori* strains and adherence rate of these strains on AGS cell line, as well as exploring the association between these rates with bacteria pathogenesis outcomes.

**Materials & Methods:** This study was conducted on genes, including *iceA*, *cagA*, *babA*, *vacA*, and *cag-PAI* in clinical strains of *H. pylori* with different pathogenesis outcomes through polymerase chain reaction (PCR) analysis using specific primers. Moreover, the adherence assay was performed on AGS for exploring the association between adherence rate and pathogenesis outcomes in infected patients.

**Findings:** The analysis of PCR results indicated that in strains with severe diseases outcomes all the investigated genes were

present, while in strain with moderate outcome only adherence genes were present. Furthermore, the results of adherence analysis were indicative of the difference among these strains. Accordingly, two strains with severe pathogens outcomes had the highest rate of colonization. Minimum colonization rate and moderate pathogenesis outcome were observed in other strains, although adherence genes present.

**Discussion & Conclusions:** According to the results of the current study, it can be concluded that different genes are contributing to bacterial adherence on host cells, meaning that the presence or absence of one or two of these genes may not affect its adherence to host cells. Furthermore, adherence genes along with oncogenes cause severe clinical outcomes in infected patients.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, Adherence rate, Pathogenesis

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, 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. Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author Email: masoud.alebouyeh@gmail.com & rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir