تمایز سوش هـای غالب هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری هـای مختلف گوارشی با استفاده از الگوهای پروتئینی

نویسندگـان :

شهره فرشـاد[*]، استادیار مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

عزیـز ژاپونی، استادیار مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

عبدالوهاب البرزی، استاد مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

سید علیرضا تقوی، دانشیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مرضیه حسینی، کارشناس مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جهرم، دوره ششم، شماره ششم، بهار و تابستان ۸۷

چکیـده :

مقدمـه : علیرغم مطالعـات زیاد، هنوز بطور دقیق مشخص نیست که چه عواملی تعیین کننده ی پیامدهـای متنـوع عفونت نـاشی از هلیـکوباکتر پیلوری می بـاشند. بنابراین، هدف از مطالعـه حـاضر تمـایز سوش هـای هیلکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری هـای مختلف معده براساس الگوهای پروتئینی می بـاشد.

مـواد و روش تحقیق : الگوهـای پروتئینی سوش های مختلف هیلکو بـاکتر پیلوری جـدا شده از سه گـروه بیمار مبتلا به گـاستریت، زخـم معده و سرطان معده با استفـاده ازروش ID-PAGE-SDS مورد تجزیه و تحلیل واقـع شد.

یافته هـا : بر اسـاس الگوهای بسیـار متنوع پروتئینی در حـالی که شبـاهت سوش ها در هر گروه به ترتیب در گروه بیمـاران دارای سرطان ۷۵درصد، در گـروه بیماران دارای زخـم معده ۴۷/۷۶درصد و در گـروه بیماران بدون زخم ۵۷/۷۸ درصد بود، تنهـا حدود ۷۶/۳۰ درصد از بـاندهای پروتئینی در تمـام سوش های جـدا شده از سه گروه بیمـاران مشترک بودند. بعضی از بـاندها در هر گـروه از بیمـاران اختصـاصی بوده و به نظر می‌رسید که برخی از سوش هـای هلیکوباکتـر پیلوری ممکن است با بیماری هـای خاصی بیشتر از سـایرین ارتباط داشته بـاشد و به این ترتیب بعضی از آنهـا در یک گـروه بیماری دسته بندی شدند.

نتیجه گیـری : این مطالعه نشـان داد که الگـوی پروتئینی می تواند شـاخصی در جهت تمـایز سوشهای غالب هلیکوبـاکترپیلوری جدا شده از بیمارپهـای متفاوت بـالینی گوارشی باشد. باندهـای اختصـاصی شناسائی شده برای اعضـای هر گـروه شامل باند ۵، ۱۰۶/۳۲، ۴۵، ۶۱و ۳۰ کیلودالتونی برای بیماران سـرطانی، باند ۲۲ کیـلودالتونی بـرای بیماران دارای زخـم و باند ۱۳ کیلودالتـونی جهت بیمـاران فاقد زخم بودند. درعین حال مطالعـات بیشتری نیازمی بـاشد تا ارزش پیشـگویی پروتئینهـای توصیف شده را برای وضعیتهـای بالینی نشـان دهند.

واژه گـان کلیدی : هلیکوباکتر پیلوری، SDS-PAGE، الگوی پروتئینی

مقدمـه :

هلیکو بـاکتر پیلوری به عنـوان عـامل فـراگیر ایجاد کننده عفونت باکتریـایی مزمن در انسان ها است [۱]، به عنوان عامل اصلی التهـاب ها منجر به سوء هـاضمه

[*] نویسنده مسئول، آدرس: شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی پست الکترونیک: s-farshad@yahoo.com

تلفن: ۲۰۵

تاریخ دریافت

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/

Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

وسرطان دئودنوم و معده با لنفومای موکوسی مرتبط با دستگاه گوارش شناخته شده است [۲]. تخمین زده می‌شود که ۹۵ - ۹۰ درصد زخمهای اثنی عشر در اروپا ناشی از عفونت هلیکو باکتر پیلوری است [۳]. همچنین این عفونت ۲/۷ تا ۱۲ برابر خطر بروز سرطان معده را افزایش می‌دهد بطوری که در سال ۱۹۹۴ سازمان بهداشت جهانی اعلام کرد که هلیکو باکتر پیلوری یک عامل شناخته شده سرطان زا است [۲]. گاستریت اساسا بین تمام افراد آلوده شده با این باکتری همگانی است اما تنها در عده کمی از بیماران منجر به پیامدهای کلینیکی بارزی مانند بیماری زخم معده یا سرطان معده می‌شود. مکانیسمهای ایجاد کننده حالتهای متفاوت بیماری بطور کامل مشخص نشده‌اند. در عین حال دلایل این تنوع پیامدهای کلینیکی عفونت ممکن است که به فاکتورهای محیطی و میزبان وهمچنین اختلاف در شیوع یا بیان فاکتورهای بیماریزای وابسته به باکتری مرتبط باشند [۵، ۴]. گوناگونی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده در گروههای بیماران مختلف بطور گسترده ای مطالعه شده‌اند [۶،۷،۸،۹،۱۰]. این در حالیست که هنوز وجود سوشهای خوب یا بد هلیکو باکتر پیلوری مورد بحث است [۱۱]. تفاوتهای ژنتیکی در یک ارگانیسم ممکن است که فاکتورهای بیماریزا، عملکرد و خصوصیات آنتی ژنی آنها را تحت تاثیر قرار دهد. بعنوان مثال تنوع آنتی ژنی محصولات و بیان یک ژن خاص ممکن است که یک مکانیسم فرار از سیستم ایمنی را برای سوشهای هلیکوباکتر در میزبان ایجاد نماید. بر این اساس مطالعات وسیعی برای تعیین ژنوتیپ و یا فنوتیپ شاخص بیماریزای هلیکوباکتر پیلوری انجام شده است تا بتوان با استفاده از آنها پیامدهای بیماری یک عفونت را پیشگویی کرد. پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز بس (PAGE-SDS) یک روش آزمایشگاهی با کاربردهای گسترده برای حلیقی از عفونتهای باکتریایی است. از این روش می‌توان جهت مرتبط ساختن الگوهای ویژه پروتئینی با بیماریهای خاص یا بهبود شاخص های پروتئینی اختصاصی استفاده کرد. همچنین این روش جهت پاسخ به سئوالات اپیدمیولوژی ملکولی در میکروب شناسی پزشکی به کار می‌رود [۱۲]. از آنجا که شیوع عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در ایران تقریبا ۹۲ - ۸۲ درصد گزارش شده است [۱۴، ۱۳]، لذا هدف از مطالعه حاضر تمایز سوشهای هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت، سرطان معده یا زخم معده براساس الگوهای پروتئینی می‌باشد که با روش PAGE-SDS انجام می‌گیرد. جستجو جهت باندهای پروتئینی اختصاصی بیماری و نیز مارکر پروتئینی که بتواند جهت شناسایی سوشهای هلیکو باکتر پیلوری مفید واقع شود از دیگر جنبه های این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش تحقیق:

۱ ـ بیماران این مطالعه بصورت Cross sectional در مدت یکسال بر روی ۱۴۴ بیمار که برای انجام اندوسکوپی به بخش اندوسکوپی بیمارستان نمازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز مراجعه کرده بودند انجام شد. تشخیص عفونت هلیکو باکتر پیلوری و تائید بیماری معده با انجام آزمایش های پاتولوژی توسط متخصص آسیب شناسی انجام گرفت. از هر بیمار دو نمونه از بافت قسمت بدنه و آنتروم گرفته شده و درمحیط انتقالی (محیط آبگوشتی عصاره مغز و قلب غنی شده با ۲۰ درصد گلوکز) به آزمایشگاه ارسال شد. معیارهای کلی جهت حذف بیماران ازمطالعه شامل موارد استفاده ازعوامل ضد هلیکو باکتر پیلوری مانند آنتی بیوتیک ها،ترکیبات بیسموت یا ممانعت کننده های پمپ پروتونی در دو هفته قبل از آندوسکوپی و یا عمل جراحی قبلی معده بودند. همچنین در هنگام نمونه گیری، مشخصاتی مثل سن، شغل و جنس بیماران نیز یادداشت شد.

۲ ـ کشت وجدا سازی هلیکو باکتر پیلوری: نمونه های

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

بیوپسی گرفته شده از بیماران به آرامی هموژن شده و سپس بر روی محیط اوره آز سریع و Brucella agar base (شرکت Merck آلمان) که با ۱۰ درصد خون لیز شده اسب غنی گردیده وحاوی آمفوتریسین (۲mg/L)، تریمتوپریم (۵mg/L) ونالیدیکسیک اسید (۱۰mg/L) بود کشت داده شدند. کشت ها در محیط میکروآئروفیلیک حاوی ۶ درصد اکسیژن، ۷/۱ درصد دی اکسید کربن، ۷/۱ درصد نیدروژن و ۷۹/۸ درصد نیتروژن و در حرارت $37^{\circ}C$ بمدت ۱۰-۵ روز قرارگرفتند. سپس نمونه های مذکور به منظور تائید وجود هیلکو باکتر پیلوری با انجام آزمایش های اکسیداز، کاتالاز، تست اوره آز سریع و رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند.

۳ ـ واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تائید هلیکو باکتر پیلوری: ژنوم تام سوش های هلیکو باکترپیلوری جدا شده، با استفاده از روش فنل کلروفرم استخراج و جهت تایید با یک روش Multiple PCR که قبلاً توضیح داده شده [۱۵] مورد آزمایش قرار گرفتند. به طور خلاصه ۱۰میکرولیتر از DNA نمونه ها استفاده شد به ۴۰ میکرو لیتر مخلوط واکنش شامل ۵۰pmol ازهر کدام از پرایمرها، ۲U آنزیم Tag پلی مراز، ۰/۲ میلی مول نوکلئوتید تری فسفات و ۲ میلی مول $MgCl_2$ اضافه گردید. سپس لوله ها در دستگاه چرخه ی حرارتی قرار داده شدند. دو جفت پرایمری که در این روش مورد استفاده قرار گرفتند عبارت بودند از (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Germany) یک جفت بر اساس ژن 16s rRNA و با ترادف 5'-GTA AAG GCT CAC CAA GGC TAT-3' و 5'-CCA CCT ACC TCT CCC ACA CTC- 3' جهت تکثیر یک قطعه ۳۸۹ جفت بازی اختصاصی جنس هلیکو باکتر [۱۶] و جفت دیگر براساس ژن ایزوسیترات دهیدروژناز و با ترادف 5'- ATG GCT TAC AAC CCT AAA ATT TTA CAA AAG CC-3' و 5'-TCA CAT GTT TTC AAT CAT CAC GC-3' جهت تکثیر یک قطعه ۱۲۰۰ جفت باری اختصاصی گونه هلیکو باکتر پیلوری [۱۷] بودند. چرخه ی حرارتی شامل ۵ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ برای دناتوره شدن اولیه و ۳۰ چرخه باهر چرخه شامل: ۱ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$، ۲ دقیقه در دمای $55^{\circ}C$ و ۱۰ دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ و سپس در آخر ۲ دقیقه در دمای 72° برای افزایش نهایی طول قطعه بود. محصولات PCR سپس روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز الکتروفورسیس و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در مقایسه با مارکر bp ۱۰۰ (MBI, Fermentas, Lithuania) طول قطعه PCR تخمین زده شد. در هر واکنش DNA از یک نمونه بالینی خالص هلیکوباکتر پیلوری که بوسیله مرفولوژی براساس رنگ آمیزی گرم و آزمایش های مثبت اکسیداز، کاتالاز و اوره آز تائید شده بودبا روش فنل کلروفرم استخراج شده و بعنوان کنترل مثبت در PCR مورد استفاده قرار گرفت. از آب مقطر استریل نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید تا احتمال هر گونه آلودگی حذف شود.

۴ ـ تهیه پروتئین های تام سلولی: سلولهای هیلکو باکتر پیلوری از سطح محیط جامد جمع آوری شده و از آنها یک سوسپانسیون سلولی با غلظت 6×10^{8} CFU/ml تهیه گردید. سوسپانسیون های تهیه شده دوبار در بافر PBS سرد (۵۰ Mm سدیم فسفات، ۰/۱۵ M سدیم کلراید، با PH= ۷/۲) که حاوی ۱mM ممانعت کننده پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF, sigma, USA) بود، شسته شدند. رسوب باکتری در بافر استخراج حاوی ۰/۷۵ درصد ترپس، ۲ درصد سدیم دودسیل سولفات، ۵ درصد دی تیوتریتول، ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ درصد برموفنل بلو حل شده و در مرحله بعد این محلول هموژن برای مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده و سپس در دمای $-20^{\circ}C$ تا زمان استفاده فریز شدند.

۵ - SDS-PAGE: اجزای پروتئین تام سلول با استفاده ازروش SDS-PAGE در دستگاه ۶۶۰ (Amersham Biosciences)Hoefer SE 600/SE

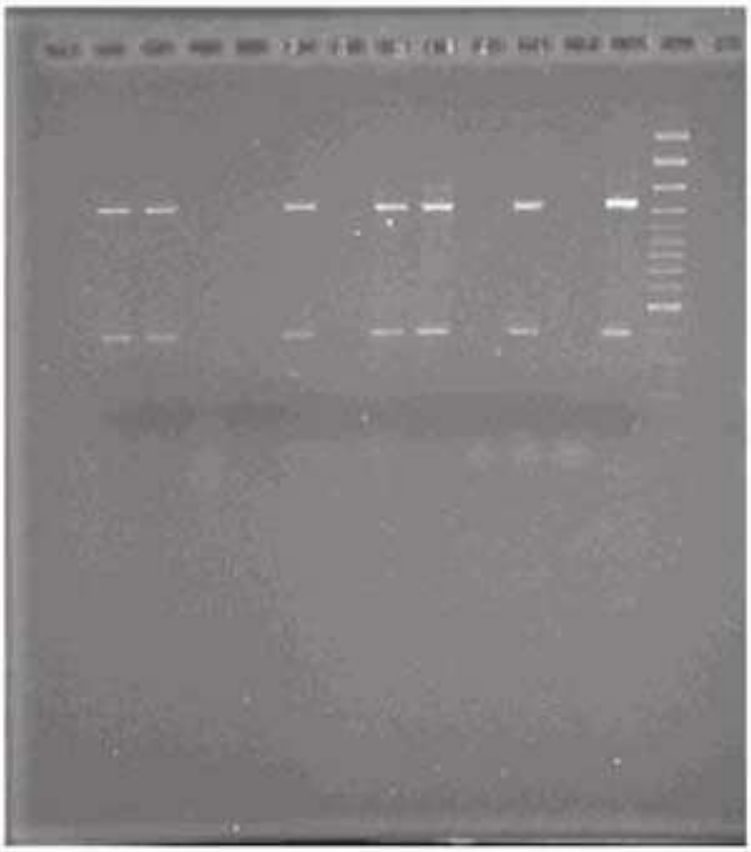
This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

وژل ۱۰ درصد طبق متد Laemmli جدا شدند [۱۸]. پس از الکتروفورز، ژل ها با استفاده از کومassی بریلیانت بلوی ۲۵۰ - G طبق روش Sambrook [۱۹] رنگ آمیزی شده و پس از اسکن وزن های مولکولی باندهای مرتبط طبق شاخص وزن مولکولی مارکر پروتئینی تعیین شدند.

یافته ها:

۱ ـ گروه بیماران: دراین مطالعه، ۱۴۴ بیمار با بیماری های مختلف گوارشی وارد شدند که بر طبق یافته های بالینی و آسیب شناسی به سه گروه شامل بیماران دارای زخم (۳۷ نفر)، بیماران بدون زخم (۷۷ نفر) وبیماران سرطانی (۳۰ نفر) دسته بندی شدند.

۲ ـ جدا سازی و تائید هلیکو باکترپیلوری: کلاً از قسمت های بدنه و آنتروم معده بیماران دارای زخم به ترتیب ۲۸ و۳۰، بیماران بدون زخم ۳۱ و ۳۵ و بیماران سرطانی ۱۲ و ۱۳ مورد هلیکو باکتر پیلوری جدا گردید. با استفاده از روش Multiplex PCR در تمامی نمونه های DNA تهیه شده از هلیکوباکترهای جدا شده دو قطعه مورد انتظار bp ۳۸۹ - bp و bp ۱۲۰۰ - اختصاصی بترتیب جنس، هلیکوباکتر و گونه هلیکوباکترپیلوری تکثیر گردیدند شکل (۱).

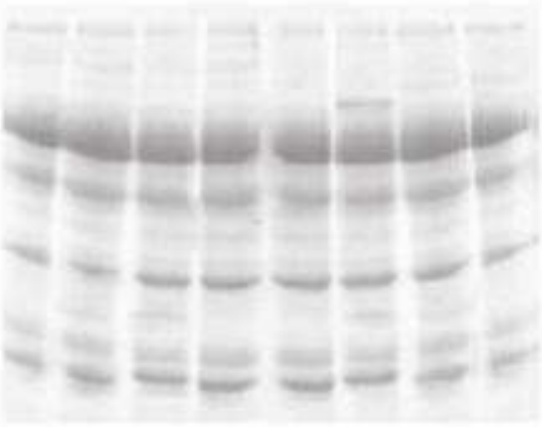


شکل (۱) : ژل الکتروفورزپس محصول PCR ناحیه 16S RNA (۳۸۹-bp) و ژن ایزوسیترات دهیدروژناز (۱۲۰۰-bp) سوش های هلیکو باکتر پیلوری. ردیفهای۲، ۳، ۶، ۸، ۹، ۱۱ ایزوله های هلیکو باکتر پیلوری؛ ردیفهای ۱، ۴، ۵، ۷ ایزوله های غیر هلیکو باکتر پیلوری، ردیف ۱۲ کنترل منفی؛ ردیف ۱۳ کنترل مثبت؛ ردیف ۱۴ مارکر

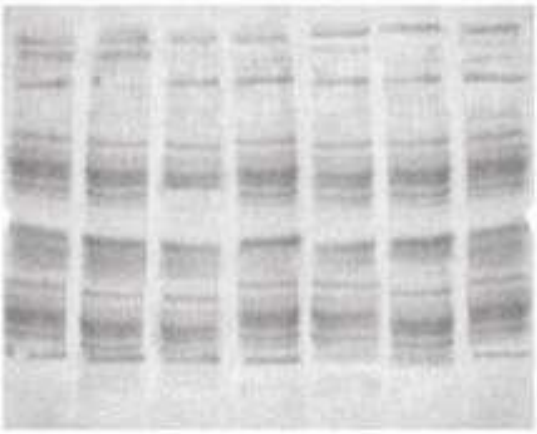
This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

۳ ـ الگوهای پروتئینی هلیکوباکترهای جدا شده با روش SDS- PAGE :

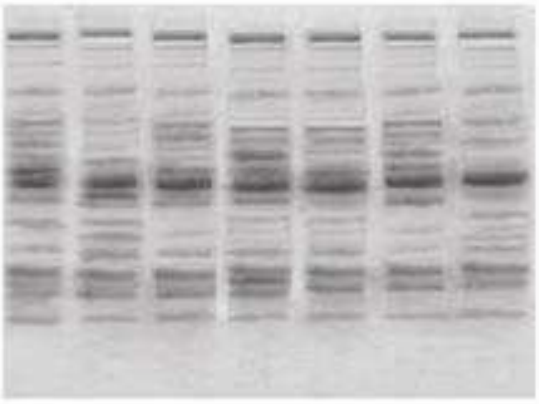
الگوی پروتئینی سوش های متفاوت هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری های مختلف گوارشی برخی تفاوت ها را در الگوی بیان شده نشان دادند شکل (۲) .



(A)



(B)



(C)

شکل (۲) : 1D-SDS-PAGE پروتئین تام هفت نمونه از سوش های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران بدون زخم (A)، با زخم معده (B) و یا سرطان معده (C)

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/

Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

الگوهای پروتئینی برخی سوش های شاخص از ۳ گروه بیماران را نشان می‌دهد . اعضاء هرگروه ارتباط بالایی را بر اساس شباهت در الگویشان نشان دادند و در نتیجه در یک دسته مشابه قرار گرفتند جدول (۲و۱) .

جدول (۲) : باندهای اختصاصی و مشترک در سوش های هلیکوباکتر جدا شده از گروه های مختلف بیماران

باندهای پروتئینی مشاهده شده					
درصد	باندهای اختصاصی (KDa)	درصد	باندهای مشترک (KDa)	تعداد کل باندها	بیماران
۲۵	۱۰۶ و ۶۱/۵ و ۴۵ و ۳۴ و ۳۰	۷۵	۱۴و ۲۶/۵و ۳۰و ۳۴و ۴۴و ۴۵و ۴۷و ۵۸/۵و ۶۰و ۶۳و ۹۴و ۱۰۶و ۱۶۰	۲۰	سرطان معده
۵/۱۸	۲۲	۷۶/۴۷	۱۴و ۲۲و ۲۷و ۳۸و ۴۴و ۴۵و ۴۷و ۵۳و ۵۸/۵و ۶۰و ۶۳و ۹۴و ۱۶۰	۱۷	بیماری زخم معده
۷/۱۴	۱۳	۷۸/۵۷	۱۳و ۱۴و ۲۶/۵و ۴۴و ۴۷و ۵۳و ۵۸/۵و ۶۰و ۶۳و ۹۴و ۱۶۰	۱۴	بیماری گاستریت بدون زخم
-	-	۳۰/۷۶	۱۴و ۴۴و ۴۷و ۵۸/۵و ۶۰و ۶۳و ۹۴و ۱۶۰	۲۶	تعداد کل

بالاترین تعداد باندها در گروه بیماران سرطانی (۲۰ باند) و کمترین باند در گروه بیماران بدون زخم مشاهده گردید (۱۴ باند) . بزرگترین باند با وزن ملکولی ۱۶۰ کیلودالتون در تمام استرین ها مشترک بود و کوچک ترین باند با ۱۳ کیلو دالتون وزن ملکولی تنها درنمونه های بیماران بدون زخم اختصاصی بود . باندهای اختصاصی برای اعضای هر گروه شامل باندهای ۱۰۶، ۶۱/۵، ۴۵، ۳۴ و ۳۰ کیلو دالتونی برای بیماران سرطانی، باند ۲۲ کیلو دالتونی برای بیماران دارای زخم و باند ۱۳ کیلو دالتونی جهت بیماران فاقد زخم بودند . گرچه تفاوت های جزئی بین استرین های جدا شده از بدنه و آنتروم هر یک بیمار مشاهده شد ولی به نظر نمی‌رسد هیچگونه تفاوت معنی داری در تولید پروتئین ها وجود داشته باشد بطوری که بتوان آن را به جدا سازی ارگانیسم از بخش خاصی از معده نسبت داد ($p<0/05$) .

بحث و نتیجه گیری :

گرچه هیلکو باکتر پیلوری به عنوان عامل بیماری های گوارشی مختلفی نظیر زخم های اثنی عشر و سرطان های گوارشی شناخته شده است ولی معلوم نیست که چه عواملی تعیین کننده این پیامدهای متفاوت ناشی از عفونت می باشند . با این وجود، دانستن این حقیقت که سوش های هیلکو باکتر پیلوری در بیماری زایی متفاوتند یک نیاز مبرم برای راه‌اندازی روش های پیشرفته وجدید جهت تشخیص و درمان سوش های بیماری زا عفونت ایجاد کرده است . در مطالعه فعلی الگو های پروتئینی سوش های مختلف هیلکو باکتر پیلوری جدا شده از سه گروه بیمار با استفاده ازروش ID-PAGE-SDS مورد تحلیل قرار گرفتند . الگوهای سوش های مختلف هیلکو باکتر پیلوری بسیار متنوع بودند . درحدود ۳۰/۷۶ درصد (۷ از ۲۶ باند) پروتئینی های مشاهده شده در تمام سوش های جدا شده از سه گروه بیماران مشابه بودند . این تشابه درون اعضای هر گروه ۷۵ درصد (۱۵از ۲۰باند) ، ۷۶/۴۷ درصد (۱۳از ۱۷ باند) و ۷۸/۵۷ درصد(۱۱ از ۱۴ باند) به ترتیب برای بیماران سرطانی ، بیماران بدون زخم و بیماران دارای زخم بود . برخی از باندهای مشاهده شده به طور معنی داری برای هر گروه اختصاصی بودند جدول (۲) .

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

جدول (۱): فراوانی ۲۶ باند پروتئینی مشخص شده در الگوی SDS-PAGE سوش های هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از سه گروه بیمار مبتلا به بیماری های مختلف گوارشی

وجود (pos) یا عدم وجود (neg) باندهای پروتئینی در گروه های مختلف		باندهای پروتئینی (KDa)																								
		۱۴۰	۱۲۵	۱۱۳	۱۰۶	۱۰۵	۹۳	۹۰	۸۵	۸۲	۶۲	۶۱/۵	۶۰	۵۸/۵	۵۲	۴۷	۴۵	۴۲	۳۸	۳۴	۳۰	۲۷	۲۶/۵	۲۲	۲۰	۱۲	۱۲
CD*	تعداد	۱۳	۱۳	۰	۱۳	۱۳	۱۳	۷	۰	۱۰	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۰	۱۳	۱۳	۱۳	۰	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۳	۰	۰	۰
pos	درصد	۱۰۰	۹۲/۳	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۴	۰	۷۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۷۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۲۳	۰	۰	۱۰۰
	تعداد	۰	۲	۱۳	۰	۰	۰	۶	۱۳	۳	۰	۰	۰	۰	۳	۰	۰	۰	۱۳	۰	۰	۰	۰	۱۰	۱۳	۰	۱۳
neg	درصد	۰	۷۶	۱۰۰	۰	۰	۰	۴۶	۱۰۰	۲۳	۰	۰	۰	۰	۲۵	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۷۷	۱۰۰	۰	۱۰۰
UD*	تعداد	۳۰	۰	۰	۰	۲۵	۳۰	۰	۱۵	۳۰	۳۰	۰	۳۰	۳۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۱۳	۳۰	۰
pos	درصد	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۸۳/۳	۱۰۰	۰	۵۰	۶۶/۷	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۴۳/۳	۱۰۰	۰
	تعداد	۰	۳۰	۰	۳۰	۵	۰	۳۰	۱۵	۱۰	۰	۳۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۷	۰	۳۰
neg	درصد	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۶/۷	۰	۱۰۰	۵۰	۳۳/۳	۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۶/۷	۰	۱۰۰
NUD*	تعداد	۲۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۸	۲۵	۰	۲۵	۲۵	۲۵	۰	۰	۲۵	۰	۰	۰	۰	۰	۲۵	۰	۲۵	۲۵
pos	درصد	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۲۲/۹	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۰۰
	تعداد	۰	۲۵	۲۹	۲۵	۲۵	۰	۲۵	۲۵	۲۷	۰	۲۵	۰	۰	۰	۰	۲۵	۰	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۰	۱۸	۱۷	۰	۰
neg	درصد	۰	۱۰۰	۸۲/۹	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۷۷/۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۱/۸	۴۶/۶	۰	۰

۱= مثبت ۲= منفی ۳= سرطان معده ۴= بیماری زخم معد ۵= بیماری گاستریت بدون زخم

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

باندهای ۱۰۶، ۶۱/۵، ۴۵، ۳۴ و ۳۰ کیلو دالتونی در گروه بیماران سرطانی مشاهده شدند. باندهای ۲۲ و ۱۳ کیلودالتونی به ترتیب مختص گروه بیماران دارای زخم و بیماران بدون زخم بودند. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که برخی سوش های هلیکو باکتر پیلوری احتمالاً بیشتر از سایر سوش ها با برخی بیماری های اختصاصی مرتبط هستند و به همین دلیل می‌توان برخی سوش های هلیکوباکتر پیلوری و نه همه آنها را در داخل هر گروه بیماری، دسته بندی نمود. یافته های ما با نتایج مطالعات بدست آمده بوسیله انروت و همکارانش [۱۳] که در سال ۲۰۰۰ صورت گرفت همخوانی داشت ولی با بعضی دیگر از نتایج تفاوت داشتند [۷]. با توجه به تعداد باندهای مشاهده شده در سوش های مورد مطالعه ما به نظر می‌رسد که از گروه بیماران بدون زخم به سمت بیماران دارای زخم و سپس بیماران سرطانی بروز پروتئین ها به صورت بالقوه افزایش می‌یابد. این پدیده می‌تواند ناشی از تنوع در محتویات ژنومی سه گروه سوش هلیکو باکتر پیلوری باشد سوشهای بالینی هلیکوباکتر پیلوری یک تنوع داخل سوشی بالایی را در سطح ژنومی نشان می‌دهند [۷،۱۳،۲۰،۲۱]. با این وجود یک تنوع بالادر سطح ژنومی سوش ها به علت وقوع جهش های خاموش مثل جهش در قسمتی از ژنوم که کد نمی‌شود و یا در قسمت سوم کدون، نمی‌تواند بر تفاوت های عملکردی آنها دلالت داشته باشد. جهش هایی که منجر به تغییرات آمینو اسیدی می‌شوند به احتمال بیشتری، عملکردی و با نتیجه انتخاب طبیعی هستند. چنین تغییراتی می‌توانند بعضی از تفاوت های موجود در الگوهای پروتئینی مشاهده شده در این مطالعه را توصیف کنند. البته با وجود این نظریه که حضور ژن های خاص در هلیکو باکتر پیلوری می‌تواند مرتبط با وضعیت بالینی خاصی باشد [۲۲]. نباید تاثیر عوامل مرتبط با بیمار با وضعیت بیماری بر بیان پروتئین ها در سوش هایی با ژنوم مشابه را از نظر دور نگه داشت. در حال حاضر اساس تفاوت ژنومی میان سوش های جدا شده در این مطالعه تحت بررسی است از طرفی در حال حاضر تفاوت ژنومی میان سوش های جدا شده مربوط به این مطالعه در آزمایشگاه ما تحت بررسی است. بعلاوه در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین اطلاعات بیماران مثل جنس و سن با الگوی باندها دیده نشد. تنها در مورد بیماران سرطانی، سن همبستگی خاصی را نشان داد. این بیماران بطور متوسط میانگین سنی بالاتری را نسبت به بیماران دارای زخم داشتند و بنا بر این می‌توانستند هلیکو باکتر پیلوری را به مدت طولانی تری در زمان حیات شان حمل کرده باشند. در این زمینه نتایج متفاوتی وجود دارد. در مطالعه ای با استفاده از 2D-PAGE-SDS، شناسایی پروتئین GroES مرتبط با سن بود [۲۳] ولی مطالعه دیگری این یافته را تائید نکرده است [۲۴]. بنابر این واضح است که شناسایی افتراقی پروتئین های وصف شده مذکور می‌توانند نتیجه بیماری ها باشند تا این که با علت بالقوه شان ارتباط داشته باشد. این مطالعه برای تمایز بین این احتمالات طراحی نشده بود ولی با کاندیدهایی که شناخته شدند این بررسی در آینده امکان پذیر خواهد بود. بیان عوامل بیماری زا، سن بروز عفونت و طول دوره آن، پاسخ ایمنی، میزان ترشح اسید و عوامل محیطی همگی مواردی هستند که احتمال دارند بتوانند بر روی نتایج حاصل از عفونت هلیکو باکتر پیلوری موثر باشند [۲۵،۲۶،۲۷] ولی سهم مشارکت نسبی آنها مشخص نیست. بطور خلاصه، مطالعه حاضر نشان داد که پروفایل پروتئینی می‌تواند شاخصی در جهت تمایز سوشهای غالب هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیمارپهای متفاوت بالینی گوارشی باشد. باندهای اختصاصی شناسائی شده برای اعضای هر گروه شامل باندهای ۱۰۶، ۶۱/۵، ۴۵، ۳۴ و ۳۰ کیلودالتونی برای

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

بیمـــــاران سرطانی، باند ۲۲ کیلودالتونـی برای بیمـــاران دارای زخـــم و باند ۱۳ کیلو دالتونـــی جهت بیمـــاران فـــاقد زخم بودند که می توان آنهـــا را کاندیدهـــایی بـــرای بررسی بیشتر جهت راه انـــدازی تست هـــای آزمایشـــگاهی که سوشهای هلیکو بـــاکتری مختص بیمـــاری را تجزیه و تحلیل کنند و نیز بـــرای تشخیص بیماریها و پیامدهـــای مختلف ناشی از این بـــاکتری فـــراگیر در نظر گـــرفت. در عین حال مطالعات بیشتری نیاز می باشد تا ارزش پیشگویی پروتئین هـــای توصیف شده را برای وضعیتهـــای بالینی نشـــان دهند.

تقدیـــر و تشکر :

این مطالعـــه در مرکـــز تحقیقات میکروب شنـــاسی بالینی اســـتاد البرزی، دانشگاه علوم پزشـــکی شیراز و تحت حمـــایت مالی طرح شماره ۵-۸۱ انجام گرفته است. نویسندگان از آقـــای دکتر داود مهربـــانی در مرکز توسعه پژوهش های بالینی بیمارســـتان نمازی برای همـــکاری در ویـــرایش این مقاله کمـــال قدردانی و تشکر را دارند.

REFERENCES :

منـــابع :

1) Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol 2000; 615-640.

2) IARC working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:1-241.

3. Laberz J, Meining A, Tillenburg B, et al. Helicobacteriose: update. Leber Magen Dam 1999; 29:80-92.

4) Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991; 325: 1127-1131.

5) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001; 345: 784-789.

6) Blaser MJ. Not all Helicobacter pylori strains are created equal: should all be eliminated? Lancet 1997; 349: 1020-1022.

7) Hazell SL, Andrews RH, Mitchell HM, et al. Genetic relationship among isolates of Helicobacter pylori; evidence for the existence of a Helicobacter pylori species-complex. FEMS Microbiol Lett 1997; 150: 27-32.

8) Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor DE. Variability of gene order in different Helicobacter pylori strains contributes to genome diversity. Mol Microbiol 1996; 20: 833-842.

9) Salaun L, Audibert C, Le Lay G, et al. Panmictic structure of Helicobacter pylori demonstrated by the comparative study of six genetic markers. FEMS Microbil Lett 1998; 161: 231-239.

10) Van der Ende A, Rauws EAJ, Feller M, et al. Heterogenous Helicobacter pylori isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. Gastroenterology 1996; 111: 638-647.

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

REFERENCES : منـــــابع :

11) Blaser MJ. In a world of black and white, Helicobacter pylori is grey. Ann Intern Med 1999; 130: 695-697.

12) Censini S, Lang C, Crabtree JE, et al. Cag A pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I- specific and disease -associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 14648-53.

13) Enroth H, Akerlund T, Sillen A, et al. Clustering of clinical strains of Helicobacter pylori analyzed by two-dimensional gel electrophoredsis. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 301-306.

14) Farshad SH, Rasouli M, Alborzi A. Simultaneous Detection of Helicobacter Genus and Helicobacter pylori species using a Multiplex PCR Method. Iran Biomed J 2004; 8: 205-209.

15) Choi YK Han JH Joo HS. Identification of novel Helicobacter species in Pig stomachs by PCR and partial sequencing. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3311-3315.

16) Argyros FC, Ghosh M, Huang L, et al P. Evaluation of a PCR Primer based on the Isocitrate Dehydrogenase gene for Detection of Helicobacter pylori in Feces. J Clin Microbiol 2000; 38; 3755-3758.

17) She FF, Su DH, Lin JY, et al. Virulence and potential pathogenicity of coccoid Helicobacter pylori induced by antibiotics. Word J Gastroenterol 2001; 7: 254-258.

18) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature London 1970; 227: 680-685.

19) Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd edition. 2001: Volume 3: A8.40-A8.51.

20) Enroth H, Nyren O, Engstrand L. One stomach -one strain: does Helicobacter pylori strain variation influence disease outcome? Dig Dis Sci 1999; 44: 102-107.

21) Taylor DE, Eaton M, Chang N, et al. Construction of a Helicobacter pylori genome map and demonstration of diversity at the genome level. J Bacteriol 1992; 174: 6800-6806.

22) Graham DY, Yamaoka Y. Disease-specific Helicobacter pylori virulence factors: the unfulfilled promise. Helicobacter 2000;5: S3-9.

23) Iaquinto G, Todisco A, Giardullo N, et al. Antibody response to Helicobacter pylori Cag A and heat-shock proteins in determining the risk of gastric development. Dig Liver Dis 2002; 32: 378-383.

24) Krah A, Mihlke S, Pleissner KP, et al. Identification of candidate antigens for serologic detection of Helicobacter pylori-infected patients with gastric carcinoma. Int J Cancer 2004; 108: 456 -463.

25) Graham DY. Helicobacter pylori infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. Gastroenterology 1997; 113: 1983-1991.

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

REFERENCES : منـــــابع :

26) Farthing MJ, Fitzgerald R, Zhang ZW. Acid, Helicobacter and immunity: a new paradigm for oesophagogastric cancer. J Physiol Paris 2001; 95: 423-427.

27) Calam J, Baron JH. ABC of the upper gastrointestinal tract: pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. BMJ: 2001; 323: 980-982.

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/
Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com

Discrimination of Dominant H. Pylori Strains Isolated From Patients With Different Gastroduodenal Pathologies By Protein Profiling

Farshad Sh.[1] Japoni A.[2] Alborzi A.[3] Taghavi A.[4] Hoseini M[5]

1- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Sciences. Shiraz. Iran.

2- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Sciences. Shiraz. Iran.

3- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Sciences. Shiraz. Iran.

4- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Research Center. University of Medical Sciences. Shiraz. Iran.

5- Dept. of Prof-Alborzi Clinical Microbiology Research Center. University of Medical Sciences. Shiraz. Iran.

(Received 15 Oct, 2008 Accepted 23 August, 2008)

Abstract:

Introduction: It is not clear what factors determine divergent outcomes of infections caused by H. pylori. The aim of this study was to differentiate H. pylori strains isolated from the patients with different gastroduodenal pathologies by protein profiling.

Materials and Methods: The protein profiles of different strains of H. pylori isolated from 3 groups of patients with ulcerative disease, nonulcerative gastritis and cancer disease were analyzed using 1D-SDS-PAGE.

Results: Based on the highly divergent protein patterns, the similarity of the strains inside each group was 75%, 76.47% and 78.57% for cancerous, ulcerative and no ulcerative groups respectively, while about 30.76% of the protein bands were common in all strains isolated from three groups of the patients. Some of the observed bands were significantly specific for each group. We speculated that some H. pylori strains might be more associated with a specific disease than others, leading to the clustering of some, but not all, strains within each disease group.

Conclusion: This study showed that protein profile can be a criterion used for discriminating of dominant states in different gastric clinical states. Specific and dominant proteins of different strains isolated from three groups of patients under the study could be welcome candidates for further exploration to be used both for laboratory tests, which analyze disease-specific H. pylori strains, and for diagnosis of different diseases and outcomes associated with this widespread bacterium.

Key Words: Helicobacter pylori, SDS-PAGE, Protein profile

This document was created with the trial version of Print2PDF!
Once Print2PDF is registered, this message will disappear!
Purchase Print2PDF at http://www.software602.com/

Document Produced by deskPDF Unregistered :: http://www.docudesk.com