مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۱، بهار ۹۰، صفحات ۱۴ تا ۱۷

Original Article

ارتباط هلیکوباکتر پیلوری سوش CagA مثبت با میزان کلونیزاسیون باکتری و میزان پاسخ ایمنی ایجاد شده در سلول‌های اپیتلیال معده

مهران رقاع[۱]، مینا رضایی[۲]، زهرا پور مقدس[۳]، کیوان شیرنشان[۴]، محمود جنتی‌پور[۵]

[۱] استادیار، فوق تخصص گوارش، گروه داخلی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد
[۲] پزشک عمومی، پژوهشگر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد
[۳] پزشک عمومی، پژوهشگر، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد
[۴] پاتولوژیست، بیمارستان دکتر علی شریعتی اصفهان
[۵] استادیار، پاتولوژیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

سابقه و هدف: *این مطالعه برای یافتن ارتباط سوش CagA (سایتو توکسین ایجاد شده از ژن A) مثبت هلیکوباکتر پیلوری با میزان پاسخ ایمنی ایجاد شده در سلول‌های اپیتلیال معده و میزان کولونیزاسیون باکتری انجام شد.*

روش بررسی: *از ۱۳۸ بیمار مبتلا به سوء هاضمه ارجاع شده به واحد آندوسکوپی بیمارستان دکتر شریعتی اصفهان نمونه‌برداری از ۴ محل معده شامل آنگولوس، آنتر، خم کوچک و خم بزرگ انجام شد. نمونه‌ها برای یافتن هلیکوباکتر مورد بررسی پاتولوژی قرار گرفت و اگر تنها یک منطقه آناتومیک در هر فرد از نظر وجود باکتری مثبت بود، نمونه خون برای بررسی وجود آنتی‌بادی ضد CagA گرفته می‌شد. میزان پاسخ ایمنی ایجاد شده در سلول‌های اپیتلیال معده توسط سیستم سیدنی طبقه‌بندی گردید.*

یافته‌ها: *از تعداد ۱۳۸ بیمار، ۹۷ نفر (۷۰/۳ درصد) از نظر وجود هلیکوباکترپیلوری مثبت بودند که ۸۳/۵ درصد آنها دارای آنتی‌بادی ضد CagA بودند. وجود آنتی‌بادی ضد CagA با سن یا جنس ارتباط معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). همچنین، ارتباط معناداری بین وجود آنتی‌بادی ضد CagA و میزان کلونیزاسیون یا پاسخ ایمنی در سلول‌های اپیتلیال معده یافت نشد ($P>0/05$).*

نتیجه‌گیری: *وجود سوش بیماری‌زای CagA مثبت موجب ایجاد پاسخ ایمنی شدیدتر و همین‌طور کلونیزاسیون بیشتر باکتری در بافت معده نمی‌شود. با این حال، به علت وجود شواهدی که از ارتباط این سوش با سرطان‌های معده خبر می‌دهد، لازم است بیماران مبتلا به این عفونت حتی اگر در نمونه‌های بافتی آنها پاسخ ایمنی شدید دیده نشود، مورد پیگیری قرار گیرند.*

واژگان کلیدی: *هلیکوباکترپیلوری، آنتی‌بادی ضد CagA، کلونیزاسیون باکتری، پاسخ ایمنی.*

مقدمه

گسترش عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیش از ۵۰ درصد افراد جهان و ارتباط آن با بیماری‌های دستگاه گوارش همچون گاستریت، بیماری زخم پپتیک و سرطان‌های دستگاه گوارش (۳-۱) محققان را بر آن داشت تا اثر این باکتری را بر پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده در سلول‌های اپیتلیال معده مورد مطالعه قرار دهند. طبق برخی مطالعات، هلیکوباکتر پیلوری توانایی ایجاد تغییر در پاسخ ایمنی سلول‌های میزبان را به نفع خود دارد و این عمل را از طریق تولید بعضی از سیتوکین‌های خاص مانند سیتوتوکسین تولید کننده واکوئل در سلول اپیتلیال معده (VacA) و ایجاد آنتی‌بادی خاصی بر ضد ژن Cag به نام CagA انجام می‌دهد (۴-۱).

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان خیابان خرم مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، دکتر زهرا پورمقدس
(**email**: zahrapormoghadas@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۷/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۸/۱۱

در پژوهش های انجام شده در کشورهای توسعه یافته مشخص شده که حدود۶۰ درصد از سوش‌های هلیکوباکتر دارای ژن تولید کننده آنتی‌بادی ضد CagA می‌باشند و این احتمال مطرح شده است که وجود این ژن در باکتری موجب مستعد شدن آن برای کلونیزاسیون بیشتر و توانایی بیشتر این ارگانیسم جهت ایجاد پاسخ ایمنی شدیدتر در سلول‌های اپیتلیال معده می‌گردد (۴). اما، در مطالعات موازی انجام شده در کشورهای آسیایی این فرضیه مورد تردید قرار گرفت (۵) و در بررسی‌های بعدی، نظریه‌ای مبنی بر اینکه ژنوتیپ‌های مختلف جغرافیایی موجب تفاوت در شدت علایم می شود، قوت گرفت (۶).

در تحقیقات انجام شده در ایران مشخص گردید این باکتری و به خصوص نوع CagA مثبت آن شیوع بیشتری نسبت به کشورهای توسعه یافته دارند (۷)، اما میزان و شدت واکنش‌های ایمنی ایجاد شده در جمعیت ایرانی به خوبی مشخص نمی‌باشد. بدین ترتیب، در این مطالعه سعی شد نقش سوش CagA مثبت هلیکوباکتر پیلوری در میزان پاسخ ایمنی ایجاد شده و میزان کلونیزاسیون باکتری درسلول‌های اپتلیال معده تعیین شود.

مواد و روشها

این مطالعه مقطعی بر روی ۱۳۸ بیمار با علایم سوءهاضمه که جهت آندوسکوپی بین سالهای ۱۳۸۷-۱۳۸۸ به واحد آندوسکوپی بیمارستان دکتر علی شریعتی اصفهان ارجاع شده بودند، انجام گرفت. در این بیماران، داروهای مهارکننده پمپ پروتون، بلوک‌کننده‌های گیرنده H2 و بیسموت چهار هفته قبل از انجام آندوسکوپی قطع شد. سپس در حین انجام آندوسکوپی دو نمونه از هر چهار محل آنتر، آنگولوس، خم کوچک و خم بزرگ معده به دست آمد (۲،۸). سپس این نمونه‌های بافتی بر طبق پروتکل تعدیل شده رنگ‌آمیزی گیمسا رنگ آمیزی شدند (۹). اگر تنها یک نمونه از یک محل از نظر وجود باکتری مثبت بود، نمونه‌های به دست آمده از آن فرد از نظر هلیکوباکتر پیلوری مثبت در نظر گرفته می‌شدند. سپس از افرادی که آلوده به هلیکوباکتر بودند، نمونه خون برای بررسی وجود آنتی‌بادی ضد CagA گرفته شد و وجود این آنتی‌بادی با روش الیزا (توسط کیت DIPR, ITALY) مورد بررسی قرار گرفت.

میزان کلونیزه شدن باکتری در نمونه‌های پاتولوژی به صورت کیفی و با بزرگنمایی ۴۰۰ طبق تقسیم بندی زیر به چهار درجه تقسیم شد:

درجه ۱: اگر تنها یک باکتری در نمونه گرفته شده با بررسی دقیق دیده شود،

درجه ۲: اگر باکتری‌ها به صورت گروهی در نمونه دیده شوند،

درجه ۳: اگر باکتری‌ها حداقل نصف سطح نمونه را پوشانده باشند،

درجه ۴: اگر تمام سطح نمونه با باکتری پوشیده شده باشد.

میزان پاسخ ایمنی در سلول‌های بافت اپیتلیال معده طبق طبقه بندی زیر صورت گرفت (۱۰):

صفر: هیچ سلول ایمنی (اعم از پلی مورفونوکلئر و مونومورفونوکلئر) در بافت وجود نداشت،

۱: سلول‌های ایمنی به تعداد کم در بافت وجود داشتند،

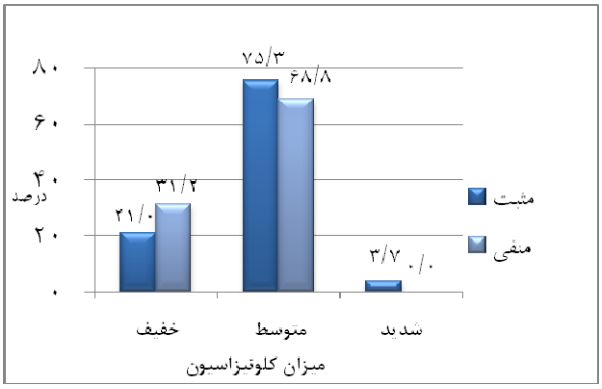
۲: سلول‌های ایمنی به تعداد متوسط در بافت وجود داشتند،

۳: سلول‌های ایمنی به تعداد زیاد در بافت وجود داشتند.

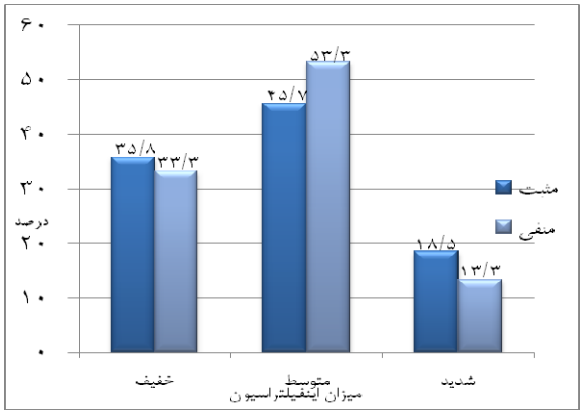
آنالیز آماری با نرم افزار SPSS v. 13.5 و با استفاده از آزمون‌های کای‌دو و t انجام شد و سطح معنی‌دار آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

طی زمان انجام مطالعه، ۱۳۸ بیمار شامل ۷۳ مرد و ۶۵ زن با میانگین سنی ۱۹/۴±۴۸/۶ سال که با علایم سوء هاضمه مراجعه کرده بودند تحت آندوسکوپی قرار گرفتند. از این بین، ۹۷ نفر (۷۰/۳ درصد) بر اساس مطالعات پاتولوژی آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بودند. از این تعداد، ۸۱ نفر (۸۳/۵ درصد) آلوده به سوش CagA بودند. تفاوتی بین گروه‌های Cag مثبت و منفی در توزیع جنسی (نسبت مرد به زن ۴۸ به ۳۳ در مقابل ۷ به ۹، P=۰/۸۷) یا میانگین سنی دیده نشد (۱۹/۹±۴۸/۳ در مقایسه با ۱۶/۴±۵۰/۲، P=۰/۷۲۵).



نمودار ۱- مقایسه میزان کلونیزاسیون باکتری در سلول‌های اپیتلیال معده بین نمونه‌های CagA مثبت و منفی. P-value=۰/۸۳



نمودار ۲- مقایسه میزان انفیلتراسیون سلول‌های ایمنی (اعم از پلی مورفونوکلئر و مونومورفونوکلئر) در اپیتلیوم معده بین نمونه‌های CagA مثبت و منفی. P.value=۰/۵۳

همانطور که در نمودار شماره ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، بین گروه‌های سوش CagA مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری در میزان کلونیزاسیون باکتری یا پاسخ ایمنی (میزان انفیلتراسیون سلول‌های ایمنی در اپیتلیوم معده) مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

بحث

هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط سوش CagA مثبت هلیکوباکتر پیلوری با میزان پاسخ ایمنی ایجاد شده در سلول‌های اپیتلیال معده و میزان کولونیزاسیون باکتری بود. طبق نتایج، بیشتر از ۸۰ درصد افراد آلوده به هلیکوباکتر، دارای آنتی بادی ضد CagA بودند. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین وجود آنتی‌بادی ضد CagA با کلونیزاسیون هلیکوباکتر یا میزان پاسخ ایمنی ایجاد شده در سلول‌های اپیتلیال معده یافت نشد. این بدین معنی است که وجود سوش بیماری‌زای CagA مثبت، الزاما با پاسخ ایمنی شدیدتر و کلونیزاسیون بیشتر باکتری همراه نمی‌باشد. شیوع این سوش از باکتری در مطالعه ما مشابه سایر مطالعات در ایران می‌باشد (۷)، ولی این شیوع نسبت به سایر کشورهای توسعه یافته بیشتر است (۱۳-۱۱). در مطالعات گسترده نشان داده شد وجود ژن CagA موجب بیماری‌زایی بیشتر در افراد مبتلا به عفونت هلیکوباکترپیلوری می‌شود (۱۴) و سوش‌های مثبت با ایجاد التهاب بیشتر و تولید سیتوتوکسین IL-8 بیشتری همراه می‌باشند (۱۴). به همین خاطر، شاید این طور برداشت شود که این‌گونه از باکتری همراه با پاسخ التهابی شدیدتر باید موجب کلونیزاسیون شدیدتر باکتری و بالطبع فراخوانده شدن بیشتر سلول‌های ایمنی گردد (۱۵)، ولی یافته‌های ما در این مطالعه بر خلاف این نظریه بود.

آترتون و همکارانش در ۲۹ نفر میزان کلونیزاسیون هلیکوباکتر را در دو سوش CagA مثبت و منفی ارزیابی کردند و مشاهده کردند که سوش CagA مثبت کلونیزاسیون بیشتری نسبت به نوع منفی آن دارد (۱۶). این نتیجه با نتیجه مطالعه‌ای مشابه در کودکان همخوانی دارد (۱۷)، ولی مغایر با نتایج مطالعه تویسک و همکاران است که بر روی ۲۳۹ بیمار انجام شد (۱۱). با دقت در روش‌های انجام این مطالعات در می‌یابیم در دو پژوهش اول از روش‌های کمی برای بررسی کلونیزاسیون باکتری استفاده شده است، حال اینکه در مطالعه تویسک و مطالعه حاضر از روش کیفی که به طور مستقیم توسط میکروسکوپ بررسی می‌شود استفاده شده است. طبق مطالعه یومیت و همکاران (۱۸)، هلیکوباکتر CagA مثبت موجب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی و کلونیزاسیون بیشتر می‌شود که علت تفاوت بدست آمده را می توان به نحوه توجیه نتایج در مطالعه ایشان دانست، چرا که در این مطالعه میزان پاسخ ایمنی و کلونیزاسیون به تفکیک برای دو محل نمونه گیری شده شامل کورپوس و آنتر بیان شده است و در مطالعه مذکور نیز در منطقه آنتر تفاوت معنی‌داری در میزان کلونیزاسیون باکتری وجود نداشته است. در مطالعه ما شدت پاسخ ایمنی و کلونیزاسیون به تفکیک محل نمونه‌برداری دسته بندی نشد و همان طور که ذکر گردید اگر یک محل از چهار محل مورد بررسی هلیکوباکتر مثبت بودند نمونه جهت بررسی میزان پاسخ ایمنی وکلونیزاسیون بررسی می‌شد. علت دیگر تفاوت در این نتیجه را می‌توان در تفاوت نژاد و محل جغرافیایی مطالعات انجام شده بیان کرد. طبق گزارشات، پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژن‌های VacA و CagA در سه نژاد چینی، مالایی، و هندی متفاوتند و اثرات بیماری‌زایی مختلفی در این نژادها مشاهده شده است (۱۹). در مطالعه مولایی و همکاران که جهت بررسی اثر هلیکوباکتر VacA و CagA مثبت در میزان کلونیزاسیون و پاسخ ایمنی ایجاد شده در سلول‌های معده انجام شد تنها یک زیر گروه خاص از VacA با دو مورد بررسی در ارتباط بوده است (۲۰) که منافاتی با نتیجه مطالعه ما نداشته و باز این نکته را یادآوری می‌کند که ژن‌های متفاوت از این باکتری در نژاد مختلف اثرات گوناگونی به همراه دارند.

در نهایت، می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که عوامل بیماری‌زای این گونه از هلیکوباکتر با وجود خاصیت بیماری‌زایی بیشتر و مرتبط بودن با سرطان‌های دستگاه گوارش موجب کلونیزاسیون بیشتر و ایجاد پاسخ ایمنی شدیدتری در نمونه بافتی نمی‌شود. این نکته از این جهت دارای اهمیت است که تنها با تفسیر نمونه بافتی به دست آمده از بیمار نمی‌توان به راحتی بیمار را از پیش‌آگهی بیماری‌اش

آگاه کرد و وی را تنها با داشتن نمونه‌ای بدون پاسخ ایمنی شدید و کلونیزاسیون زیاد باکتری بدون پیگیری رها کرد. امید است در آینده با طراحی مطالعات کوهورت و پیگیری بیماران مبتلا به این عفونت بتوان بهترین راه جهت تعیین پیش‌آگهی را در گونه‌های مبتلا کننده نژاد ایرانی مشخص کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان سپاس خود را تقدیم به بیماران شرکت کننده در این تحقیق و کارکنان محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان شریعتی اصفهان می‌کنند.

REFERENCES

1. Queiroz DM, Mendes EN, Carvalho AS, Rocha GA, Oliveira AM, Soares TF, et al. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a cagA-positive strain in children. J Infect Dis 2000; 181: 626-30.
2. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 14648-53.
3. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. Gut 1998; 42: 338-43.
4. Tokumaru K, Kimura K, Saifuku K, Kojima T, Satoh K, Kihira K, et al. CagA and cytotoxicity of *Helicobacter pylori* are not markers of peptic ulcer in Japanese patients. Helicobacter 1999; 4: 1-6.
5. Perez-Perez GI, Peek RM, Legath AJ, Heine PR, Graff LB. The role of CagA status in gastric and extragastric complications of *Helicobacter pylori*. J Physiol Pharmacol 1999; 50: 833-45.
6. Perng CL, Lin HJ, Sun IC, Tseng GY. *Helicobacter pylori* CagA, IceA and VacA status in Taiwanese patients with peptic ulcer and gastritis. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18: 1244-49.
7. Salehi Z, Jelodar MH, Rassa M, Ahaki M, Mollasalehi H, Mashayekhi F. *Helicobacter pylori* CagA status and peptic ulcer disease in Iran. Dig Dis Sci 2009; 54: 608-13.
8. Classen M, Tytgat GNJ, Lightdale CJ, eds. Gastroenterological endoscopy. 1st ed. New York: Thieme Publisher; 2002. p.37-496.
9. Potters HV, Loffeld RJ, Stobberingh E, van Spreeuwel JP, Arends JW. Rapid staining of *Campylobacter pyloridis*. Histopathology 1987; 11: 1223.
10. Komoto K, Haruma K, Kamada T, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric neoplasia: correlations with histological gastritis and tumor histology. Am J Gastroenterol 1998; 93: 1271-76.
11. Twisk M, Kusters JG, Balk AG, Kuipers EJ, Loffeld RJ. Colonisation density and topographic localisation of *Helicobacter pylori* do not depend on the cagA status. J Clin Pathol 2001; 54: 771-73.
12. Saruc M, Demir MA, Kucukmetin N, Kandiloglu AR, Akarca US, Yuceyar H. Histological and clinical predictive value of determination of tissue CagA status by PCR in *Helicobacter pylori* infected patients; results of the large population based study in western Turkey. Hepatogastroenterology 2002; 49: 878-81.
13. Bommelaer G, Bruley D, V, Flejou JF, Matysiak T, Poynard T, Richard A, et al. CagA status and virulence of *Helicobacter pylori* strains. Results of a French multicentric prospective study. Gastroenterol Clin Biol 2001; 25: 1084-89.
14. Sasayama Y, Kawano S, Tsuji S, Fusamoto H, Kamada T, Fukui H, et al. Relationship between interleukin-8 levels and myeloperoxidase activity in human gastric mucosa. J Gastroenterol Hepatol 1997; 12: 104-108.
15. Loffeld RJ, Stobberingh E, Flendrig JA, van Spreeuwel JP, Arends JW. Diagnostic value of an immunoassay to detect anti *Campylobacter pylori* antibodies in non-ulcer dyspepsia. Lancet 1989; 1: 1182-85.
16. Atherton J, Tham K,Peek Jr R, Cover TL, Blaser MJ.. Density of *Helicobacter pylori* Infection in vivo as assessed by quantitative culture and histology. J Infect Dis 1996; 174: 552-56.
17. Dzierzanowska-Fangrat K, Crabtree JE, Rozynek E, Dura W, Celiñska-Cedro D, Wojda U, et al. *Helicobacter pylori* CagA genotype and density of colonization in relation to gastric inflammation in children. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 14: 1303-307.
18. Umit H, Tezel A, Bukavaz S, Unsal G, Otkun M, Soylu AR, et al.The relationship between virulence factors of *Helicobacter pylori* and severity of gastritis in infected patients. Dig Dis Sci 2009; 54: 103-10.
19. Yin Lui S, Chuah S, Goh H, Lee KY, Lee VS, Ho B, et al. Different CagA and VacA polymorphisms are found in the Chinese versus the Malay and Indian populations: an analysis of *Helicobacter Pylori* virulence genes in Singapore. Proceedings of Singapore Healthcare 2010; 19: 12-18.
20. Molaei M, Foroughi F, Mashayekhi R. CagA status and VacA subtypes of *Helicobacter pylori* in relation to histopathologic findings in Iranian population. Indian J Pathol Microbiol 2010; 53: 24-27.