بررسی سطح سرمی و پلی مورفیسم های ژن اینتر لوکین ۱۳ در موقعیت‌های G/A 2044+، وC/A1512- در بیماران مبتلا به *H.pylori*

سیروس نعیمی [*۱]، مدیسا کعبی [۲]، امین عبادی [۳]

[۱] استادیار ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک ، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
[۲] کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی،کازرون، ایران
[۳] استادیار شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه ، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۸/۱۷؛ تاریخ پذیرش:۹۶/۱۲/۱۲

چکیده

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری(*H. pylori*) یک باکتری گرم منفی است که در مخاط معده مستقر شده و باعث بیماری‌های دستگاه گوارش فوقانی می‌شود. اینترلوکین ۱۳، سایتوکاین ایمنی بازدارنده ای است که توسط تعدادی از سلولهای سیستم ایمنی ترشح می‌شود. ژن IL13 روی کروموزوم 5q,25bp قرار دارد. ژن این سایتو کاین در موقعیتهای - , C/A1512-) (G/A 2044+ دارای پلی مورفیسم می‌باشد که با میزان بیان این سایتوکاین در ارتباط می‌باشد.هدف از این تحقیق، بررسی سطح سرمی و پلی مورفیسم‌های ژن IL13 در بیماران مبتلا به هلیکو باکتر پیلوری می‌باشد.

روش بررسی: در این تحقیق موردی شاهدی،DNA ۱۵۰ نفر از بیماران مبتلا به هلیکو باکتر پیلوری را که توسط دکتر متخصص تشخیص داده شده از خون محیطی و با روش salting out جداسازی نموده و سپس به وسیله روش - PCR RFLP، پلی مورفیسم‌های ژن مذکور را ، بررسی نموده و نتایج را با نتایج حاصله از آزمایش ۱۵۰ نفر از افراد سالم و با استفاده از تست مجذور کای(Chi square) و با نرم افزار SPSS مقایسه گردید. برای بررسی سطح سرمی سایتوکاین اشاره شده، نسبت به تهیه سرم ۴۰ نفر از افراد بیمار و ۴۰ نفر از افراد کنترل اقدام نموده و سطح سرمی سایتو کاین اشاره شده را با استفاده از کیت الیزا، بررسی شد. .

نتایج: نتایج حاصله از این تحقیق نشان می‌دهد که در موقعیتG/A2044+، اختلاف معنی داری در ژنوتیپ (۱/۰۶-۰/۰۹ :CI، ۰/۳۲:OR)(P=0/005)GA و (۱/۰۸-۰/۵۲:CI ، ۰/۴۵:OR)(P=0/045)GG میان بیماران و گروه کنترل وجود دارد.این اختلاف در موقعیت A/C 1512- ،مشاهده نشد . همچنین تفاوت معنی داری میان سطح سرمی این سایتوکاین و بیماری مشاهده نگردید(P>0/05).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که ژنوتیپهای GG و GA در موقعیت ۲۰۴۴+ ژن اینتر لوکین۱۳ ، افراد را نسبت به عفونت به باکتری هلیکو باکتر پیلوری مستعدتر می‌نماید.

کلمات کلیدی: هلیکو باکتر پیلوری ، ژنوتیپ ، ژن اینترلوکین ۱۳، پلی مورفیسم

[*]**نویسنده مسئول:**
استادیار ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک ، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۰۹۱۷- ۱۳۹۱۴۲۰
E-mail: naeimis@kau.ac.ir

مقدمه

عفونتH. pylori . عامل اصلی خطرزیست محیطی برای آدنوکارسینوما یا تومور غده ای (سرطان) بدخیم غیرکاردیای معده (non-cardia gastric adenocarcinoma) است. اگرچه تخمین زده می‌شودکه ۵۰ ٪ ازجمعیت سراسر جهان آلوده به این باکتری شده‌اند، تنها در زیر مجموعه ای از ۲-۱ ٪ ازاین افراد، بدخیمی‌های (سرطان) معده توسعه خواهدیافت.[۱و۲] شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری ممکن است، بسته به جمعیت موردمطالعه متفاوت باشد. علاوه براین، محققان افزایش شیوع H.pylori را با شاخص‌های اجتماعی و اقتصادی مرتبط دانسته‌اند، بطوری که بروز عفونت درکشورهای در حال توسعه بالاتراست.[۳] مکانیسم اصلی بقای H. pylori در معده به علت عمل (فعالیت) اوره- آز است که اوره موجود در معده را هیدرولیز و به دی‌اکسیدکربن و آمونیاک تبدیل می‌کند که به دنبال آن اسید معده خنثی می‌شود.[۴] H. pylori. با عبور از مخاط معده و پیوستن به اپیتلیوم معده، یعنی جایی که در آن موادغذایی لازم را به دست آورده وبطور همزمان ازحمله سیستم ایمنی میزبان اجتناب می‌کند، شروع به استقرار در مخاط معده (تشکیل کلونی) می‌نماید[۵]. التهاب ناشی ازعفونت H.pylori در مسیرهای متعدد سلول‌های اپیتلیال معده (که خط مقدم دفاعی میزبان در مقابل این ارگانیسم هستند) وسلول‌های ایمنی در گردش (که درمحل عفونت به خدمت گرفته شده اند) ایجادمی شود.[۶] یکی از عناصر ضروری لازم برای تداوم عفونت هلیکوباکترپیلوری به ترشح پروتئینVacA که برای مهار تکثیر سلولی T و همچنین تولید عوامل رونویسی مورد نیاز در تولید IL-2 گزارش شده، مربوط است.[۷] VacA تولیدسایتوکاین‌های پیش التهابی نظیرعامل نکروزتوموری آلفا (TNF-α)،پروتئین التهاب ماکروفاژی1α، IL-1β، IL-6، IL-10 و IL-13 درشیوه وابسته به دوز،بدون ایجاد دگرانولاسیون،ماست- سلها را تحریک می‌کند.[۸] اگرچه انتظار می‌رود که پاسخ ایمنی Th2 برای حفاظت در برابر باکتری‌های خارج سلولی لازم باشد، سلول‌های Th2 به‌طور ضعیفی با عفونت H. pylori همراه هستند.[۹] با این حال، پاسخ ایمنی Th2غالب توسط سلول‌های ترشح کننده IL-13 شناسایی می‌شود. پاسخ Th2 در بیماران مبتلا به متاپلازی روده‌ای و سرطان معده از نوع روده‌ای مرتبط با H. pylori مشاهده شده است که نشان می‌دهد سلول‌های Th2 می‌توانند در نتایج متفاوت عفونت هلیکوباکتر پیلوری دخیل باشند.[۱۰] IL-13 اولین بار به دلیل اثرات خود بر سلول‌های B و مونوسیت‌ها شناخته شد که باعث تعویض کلاس به سمت IgE می‌گردد واز تولید سایتوکاین‌های التهابی جلوگیری می‌کند. اینترلوکین ۱۳ (IL-13) یک سایتوکاین TH2با عملکردهای مستقیم و غیرمستقیم تنظیم کننده ایمنی سلول‌های سرطانی است. گزارش شده که این سایتوکاین برخی تغییرات پلی‌مورفیک در سطح ژن همراه با برخی بیماری‌های ایمنی مربوطه از جمله آسم و آلرژی دارد.[۱۱] اینترلوکین ۱۳، سایتوکاین ایمنی بازدارنده‌ای است که در اصل توسط لنفوسیت‌های فعال TH2 و نیز سلول‌های T کشنده طبیعی ترشح می‌شود.[۱۲] IL-13 باعث بازداری از تکثیر خطوط سلول سرطان انسان مانند سرطان سینه، کارسینومای سلول کلیه و لوکمی لنفوبلاستیک حاد دودمانی B می‌شود. ژن IL13 روی کروموزوم 5q,25bp قرار دارد. ژن این سایتو کاین در موقعیت‌های (-1512A/C , - +2044 G/A) دارای پلی‌مورفیسم می‌باشد که با میزان بیان این سایتوکاین در ارتباط می‌باشد.[۱۳و۱۴] با توجه به مطالب فوق و نظر به افزایش روزافرون ابتلا به این بیماری ،هدف از این تحقیق بررسی سطح سرمی و پلی مورفیسم ژن اینترلوکین ۱۳ در بیماران مبتلا به باکتری هلیکوباکتر پیلوری و مقایسه آن با افراد سالم می‌باشد تا بتوان گوشه‌ای از عملکرد پیچیده سیستم ایمنی انسان را در مقابل این ارگانیسم، رمزگشایی نموده تا بتوانیم به صورت مطلوب‌تری در پیشگیری و درمان این بیماری عمل نمائیم.

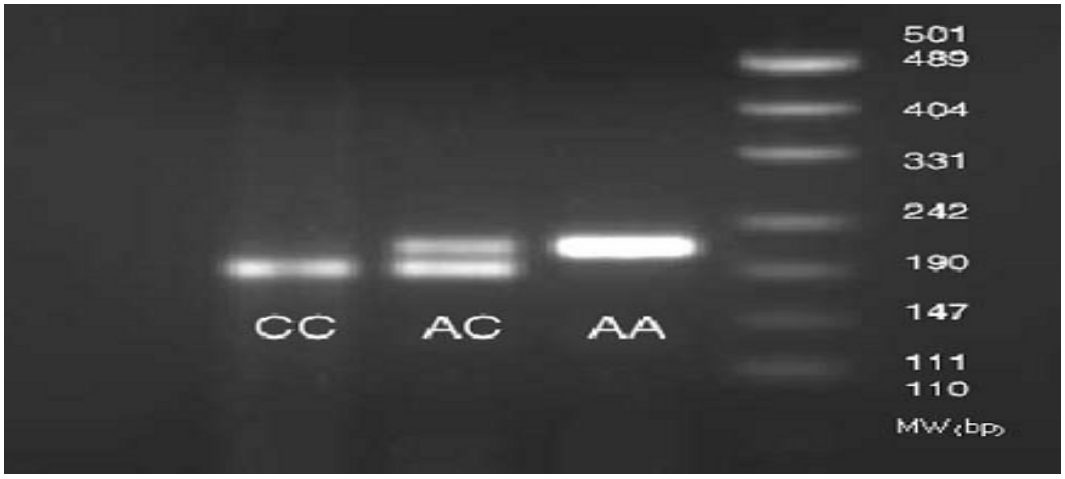
مواد و روش‌ها

در این تحقیق موردی – شاهدی، DNA ۱۵۰ نفر از بیماران مبتلا به H. pylori .که توسط دکتر متخصص تشخیص داده شده است و۱۵۰ نفر از افراد کنترل مورد مطالعه از میان مراجعه‌کنندگان به متخصص داخلی، به طور تصادفی انتخاب گردیدند . افراد کنترل از نظر سن و جنس با بیماران مطابقت داده شدند.میانگین سنی افراد مورد مطالعه در بیماران و گروه کنترل به ترتیب ۷±۴۸ و ۶±۴۷ سال می‌باشد. حجم نمونه لازم برای آزمون مربع کای (x^2)، تفاوت نسبت وجود پلیمورفیسم مورد نظر در دو گروه مستقل (گروههای

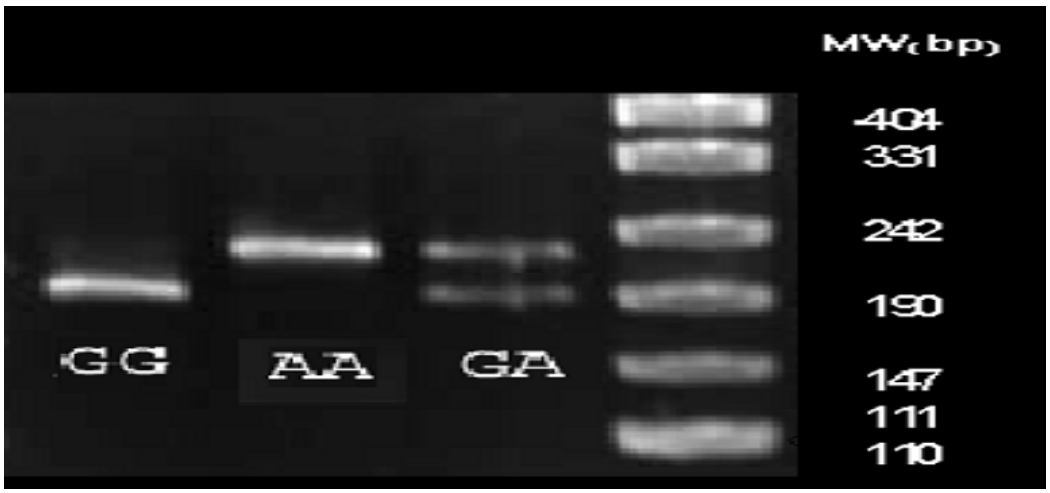
مورد و شاهد) محاسبه گردید. شیوع پلی مورفیسم مورد نظر در جمعیت گروه کنترل ۱۰ ٪ در نظرگرفته شد. میزان خطای آلفا و بتا به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۲۰ درنظرگرفته شد. حجم نمونه مورد نظر برای تعیین تفاوت برابر ۱۰ ٪ در دو جمعیت مورد و شاهد حدود ۱۵۰ نفر در هر گروه محاسبه گردید. از افراد مورد مطالعه ۶-۵ سی‌سی خون همراه با ماده ضد انعقاد، گرفته شد و با استفاده ازکیت طراحی شده توسط گروه شیمی دانشگاه آزاد کازرون ، اقدام به استخراج ژنوم افراد گردید. کیت مورد استفاده براساس کروماتوگرافی تعویض یونی ، طراحی شده بود. ماده ضد انعقاد مورد استفاده، EDTA بود که به صورت محلول ۱۰ ٪ درصد تهیه گردید. جهت تعیین ژنوتیپ افراد مورد مطالعه در موقعیت 1512- و 2044+، از روش PCR-RFLP استفاده گردید، بدین صورت که ابتدا قطعه مورد نظر DNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) تکثیر شد، سپس محصول PCR تحت تأثیر آنزیم محدودکننده (Restriction Endonuclease) مربوطه قرار گرفت و به قطعاتی تبدیل شدند که بر اساس تعداد و اندازه قطعات بدست آمده، به ژنوتیپ فرد مورد آزمایش پی برده شد. برای انجام واکنش در یک تیوب اپندروف با حجم ۰/۵میلی لیتر برای هر نمونه DNA مواد شامل :۹/۶ میکرولیتر آب مقطر تزریقی استریل،۵ /۱ میکرولیتر بافر،۴۵ /۰میکرولیتر منیزیم کلراید، ۰/۴۵میکرولیتر dNTP ، ۰/۶میکرولیتر آغازگر رفت، ۰/۶ میکرولیتر آغازگر برگشت، یک میکرولیتر DNA و دو میکرولیتر آنزیم Taqپلی مراز استفاده شده است. مجموعه توالی‌های آغازگرها، آنزیم‌های محدود کننده و شرایط ارزیابی برای تعیین ژنوتیپ در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. پس از هضم آنزیمی، محصولات حاصل، در ژل آگارز ۳ درصد تحت تاثیر نیروی الکتروفورز از هم جدا شدند. نتایج حاصل از آزمایش PCR-RFLP بر روی بیماران و گروه کنترل با شرایط ذکر شده مورد آزمایش منجر به تولید محصولی به طول ۱۹۲ و ۲۱۶ جفت باز (basepair) به ترتیب، برای موقعیت‌های ۱۵۲۱- و ۲۰۴۴+ به عنوان قطعه مورد آزمایش گردید (تصاویر ۱و۲). همچنین برای بررسی سطح سرمی، نسبت به تهیه سرم ۴۰ نفر از افراد بیمار و ۴۰ نفر از افراد کنترل اقدام نموده و سطح سرمی اینترلوکین۱۳ را با استفاده ازکیت تجاری الیزا با نام تجاری (BOSTER BILOGICAL TECHNOLOGY) ، تعیین نمودیم. مطالعه آماری بااستفاده از برنامه آماری SPSS 20 و با آزمون‌های مربع کای (2 x)وt-test دو نمونه‌ای مستقل، و رگرسیون لجستیک با فاصله اطمینان ۹۵ ٪ انجام شد.سطح Pvalue≤0/05 به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.برای بررسی این که گروه های مورد مطالعه در جایگاه‌های مورد بررسی، از تعادل هاردی واینبرگ تبعیت می‌کنند یاخیر، از آزمون آماری مربع کای وبرنامه آرلیکویین ویرایش۲۰۰۰ استفاده شد که براساس این نتایج می‌توان اظهار کرد که جایگاه‌های مورد بررسی در این مطالعه در تعادل هاردی – واینبرگ قرار دارد (P>۰/۰۵).

جدول ۱: توالی آغازگرها، دمای هم سرشته شدن،آنزیم‌های محدود کننده و اندازه قطعات حاصل از شکست آنزیمی

جایگاه ژنی	توالی آغازگرهای رفت و برگشت	دمای اتصال آغازگر	آنزیم محدود کننده	قطعا ت ایجاد شده
-۱۵۱۲A/C	F: 5'-CAACCGCCGCGCCAGCG CCTTCTC-3' R: 5'-CCGCTACTTG GCCGTGT GACCGC-3'	65 C	*Bsh 1236I*	AA= 214bp AC=214، 192،22bp CC=192 ، 22bp
+۲۰۴۴ G/A	F: 5'-CTTCCGTGAGGACTGAA TGAGACGGTC-3' R: 5'-GCAAATAATGAT GCTTT CGAAGTTTCAGTGGA-3'	62.5 C	*NlaIV*	GG= 178 ،32، 26 bp GA=216، 178، 32 ،26 bp AA= 216 ،26 bp



شکل ۱: پلی مورفیسم ژن IL_13 در جایگاه ۱۵۱۲_ بعد از هضم آنزیم Bsh1236I



شکل ۲: پلی مورفیسم ژن IL_13 در جایگاه ۲۰۴۴+ بعد از هضم آنزیم NlaIV

یافته‌ها

در این بررسی میانگین سن بیماران مورد مطالعه میانگین سنی گروه بیمار ۱۱/۶۵±۴۵/۳۳، و میانگین سنی گروه سالم ۱۱/۳۲±۴۷/۳۵ بود.نتایج حاصل از آزمایش PCR منجر به ایجاد قطعاتی از ژنوم گردید که شرح آن در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد.از میان ۱۵۰ نفر بیمار مورد مطالعه در موقعیت A/C ۱۵۱۲-، (۲۰/۰ ٪) ژنوتیپ AA، (۳۲/۰ ٪) ژنوتیپ AC و (۴۸/۰ ٪) ژنوتیپ CC را نشان دادند که این درصد در مقابل گروه کنترل به ترتیب (۱۳/۳ ٪) ، (۵۴/۰ ٪) و (۳۲/۷ ٪) می‌باشد. از طرف دیگر بررسی آلل‌های ژن اینترلوکین 13 در موقعیت A/C ۱۵۱۲- نشان داد که، (۶۹ ٪) از افراد بیمار آلل A و (۳۱/۰ ٪) دارای آلل C می‌باشند که این نسبت در افراد گروه کنترل به ترتیب (۶۶/۳ ٪) و (۳۳/۷ ٪) می‌باشد. با استفاده از آزمون‌های آماری تفاوت معنی‌داری میان ژنوتیپ و آلل افراد بیمار و گروه کنترل مشاهده نشد (جدول ۲).

اما در موقعیت G/A ۲۰۴۴ + افراد بیمار (۲۰/۰ ٪) ژنوتیپ AA، ژنوتیپ(۳۲/۰ ٪) AGو ژنوتیپ (۴۸/۰ ٪) GG را نشان دادند که این درصد در مقابل گروه کنترل به ترتیب (۱۳/۳ ٪) ،(۵۴/۰ ٪)

و (۳۲/۷ ٪) می‌باشد. همچنین مشخص شد که (۶۴/۰ ٪) از افراد بیمار آلل G و(۳۶/۰ ٪) دارای آلل A می‌باشند که این نسبت در افراد گروه کنترل به ترتیب (۵۹/۷ ٪) و(۴۰/۳ ٪) می‌باشد. با استفاده از آزمون‌های آماری تفاوت معنی داری بین افراد بیمار و گروه کنترل وجود دارد. بدین صورت که در GA و GG اختلاف معنی دار بین گروه کنترل و بیمار وجود دارد P=0/005، P=0/045 (جدول ۳).

در ادامه این تحقیق به بررسی سطح سرمی اینترلوکین ۱۳و مقایسه آن در گروه بیمار و کنترل پرداخته شد. برای بررسی از آزمون پارامتری t-test دونمونه ای مستقل استفاده شده است. در جدول تعداد داده‌ها و میانگین و انحراف معیار داده‌ها در گروه کنترل و بیمار به تفکیک نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود سطح معنی‌داری P-value بیشتر از ۰/۰۵ بدست آمده است (p=0.73) که حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار بین میانگین دو گروه مذکور می‌باشد.(جدول شماره۴). همچنین به بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های اینترلوکین۱۳و سطح سرمی این سایتوکاین پرداخته شد. نتایج حاصل از بررسی در جدول شماره ۵ آورده شده است. .برای موقعیت A/C 1512– ،تعداد افراد با سطح سرمی کمتر از ۰/۷۲ ، ۲۰ نفر بوده که ۱۲ نفر ژنوتیپ AA،۷ نفر زنوتیپ AC و ۱ نفر ژنوتیپ CC داشته اند. تعداد افراد با سطح سرمی بین،۰/۷۳-۰/۸۵ ، ۱۳ نفر بوده که ۵ نفر ژنوتیپ AA، ۵ نفر ژنوتیپ AC و ۳ نفر ژنوتیپ CC داشته اند. همچنین افراد با سطح سرمی بیشتر ۰/۸۵، ۷ نفر بودند که ۲نفر ژنوتیپ AA، ۳نفر زنوتیپ AC و ۲ نفر ژنوتیپ CC داشته اند.نتایج مربوط به فرضیه و آزمون مربع کای نشان داده است که بین سطح سرمی و ژنوتیپ A/C1512 – ارتباط معنی داری وجود ندارد. این بررسی در موقعیتG/A ۲۰۴۴ +، نیز انجام شد که تعداد افراد با سطح سرمی کمتر از ۰/۷۲ ، ۲۰ نفر بوده که ۱ نفر ژنوتیپ AA،۸ نفر زنوتیپ GA و ۱۱ نفر ژنوتیپ GG داشته اند.همچنین تعداد افراد با سطح سرمی بین ۰/۷۳–۰/۸۵، ۱۳ نفر بوده که ۳ نفر ژنوتیپ AA، ۶ نفر زنوتیپ GA و ۴ نفر ژنوتیپ GG داشته‌اند. تعداد افراد با سطح سرمی بیشتر از ۰/۸۵ ، ۷ نفر بوده که ۳ نفر ژنوتیپ AA، و ۲ نفر زنوتیپ GA و ۲ نفر ژنوتیپ GG داشته‌اند. نتایج مربوط به بررسی و آزمون مربع کای نشان داده که بین سطح سرمی و ژنوتیپ A/G 2044+ ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (P=0/08).

جدول ۲: مقایسه ژنوتیپ و آلل IL-13 در موقعیت A/C1512- در گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ	کنترل ٪، n=150	بیمار ٪، n=150	P*	Odd Ratio (OR)	%95 CI
AA	۷۵(%۱۳/۳)	۷۹(%۰/۲۰)	۰/۸۹	۰/۶۹	۰/۲۵–۱/۳۹
CC	۲۶(%۳۲/۷)	۲۲(%۰/۴۸)	۰/۰۸	۰/۳۲	۰/۰۹–۱/۰۶
AC	۴۹(%۵۴/۰)	۴۹(%۳۲/۰)	۰/۰۸	۰/۷۱	۰/۴۱–۱/۱۹
آلل					
A	۱۹۹(۶۶/۳)	۲۰۷(۶۹/۰)	۰/۷۷	۰/۸۴	۰/۶۲–۱/۸۲
C	۱۰۱(۳۳/۷)	۹۳(۳۱/۰)	۰/۴۸	۰/۶۸	۰/۴۶–۱/۰۱

جدول ۳: مقایسه ژنوتیپ و آلل IL-13 در موقعیت 2044G/A+ در گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ	کنترل ٪، n=150	بیمار ٪، n=150	P*	Odd Ratio (OR)	%95 CI
GG	۴۹(%۳۲/۷)	۷۲ (% ۰/۴۸)	۰/۰۴۵	۰/۴۵	۰/۵۲–۱/۰۸
GA	۸۱(%۵۴/۰)	۴۸(%۳۲/۰)	۰/۰۰۵	۰/۳۲	۰/۰۹–۱/۰۶
AA	۲۰(%۱۳/۳)	۳۰(%۲۰/۰)	۰/۲	۰/۷۱	۰/۴۱–۱/۱۹
آلل					
A	۱۲۱(۴۰/۳)	۱۰۸(۳۶/۰)	۰/۳۵	۰/۷۶	۰/۳۱–۱/۳۵
G	۱۷۹(۵۹/۷)	۱۹۲(۶۴/۰)	۰/۲۷	۰/۶۸	۰/۴۶–۱/۰۱

جدول۴: بررسی سطح سرمی ژنوتیپ IL13 میان بیماران و گروه کنترل

گروه ها	تعداد	میانگین	انحراف معیار	Pv
بیمار	۴۰	۰/۷۳	۰/۹۴۰	۰/۷۳
کنترل	۴۰	۰/۷۴	۰/۰۹۰	

جدول ۵: بررسی سطح سرمی وپلی مورفیسم اینترلوکین ۱۳در بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری

موقعیت	ژنوتیپ	سطح سرمی کمتر از ۰/۷۲	سطح سرمی بین ۰/۷۳_۰/۸۵	سطح سرمی بیشتر از ۰/۸۵	P value
۲۰۴۴ G/A +	AA	۱(۵/۰)	۳(۲۳/۱)	۳(۴۲/۹)	۰/۰۸
	GA	۸(۴۰/۰)	۶(۴۶/۲)	۲(۲۸/۶)	
	GG	۱۱(۵۵/۰)	۴(۳۰/۸)	۲(۲۸/۶)	
-۱۵۱۲ A/C	AA	۱۲(۶۰/۰)	۵(۳۸/۵)	۲(۲۸/۶)	۰/۱۳
	AC	۷(۳۵/۰)	۵(۳۸/۵)	۳(۴۲/۹)	
	CC	۱(۵/۰)	۳(۲۳/۱)	۲(۲۸/۶)	

بحث

گزارشاتی وجود دارد که تغییرات پلی‌مورفیک در سطح ژن این سایتوکین با بروز برخی از بیماریهای ایمنی در ارتباط است [۶]. ژن IL-13 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۵ در موقعیت 5q,25bp قرار دارد. این ژن در موقعیت‌های (G/A 2044+، و1512A/C-) دارای پلی‌مورفیسم می‌باشد و نشان داده شده است که این پلی‌مورفیسم‌ها با میزان بیان این سایتوکاین در ارتباط هستند.[۱۵و۱۶] پژوهش‌های بسیاری بر این موضوع تاکید دارند که هلیکوباکتر پیلوری از طریق تعدیل سیستم ایمنی به بقا و بیماری زایی خود کمک می‌کند. از سوی دیگر نشان داده شده که این قابلیت هلیکوباکتر پیلوری در ارتباط تنگاتنگ با زمینه ژنتیکی فرد، خصوصا برخی پلی مورفیسم‌های شناخته شده در ژن‌های سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله ژن‌های IL-1، IL-10 و TNF-α می‌باشد.[۷و۱۷] در مورد سرطان معده و ارتباط آن با ابتلا با عفونت هلیکوباکتریایی نقش پلی مورفیسم ها، مهم به نظر می‌رسد به همین دلیل پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های مرتبط با تکثیر سلولی در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است.[۱۸] نتایج مقاله فرا تحلیلی (Meta Analysis) که بر روی همبستگی پلی‌مورفیسم‌های ژن سایتوکاین‌ها و خطر ایجاد ضایعات پیش‌سرطانی (Precancerous Lesions) انجام شده است نشان می‌دهد برخی از این پلی‌مورفیسم‌ها همچون ژن IL-1 با خطر ایجاد این ضایعات مرتبط می‌باشند.[۹] در راستای مطالعه حاضر، لی تی جی و همکاران به بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن اینترلوکین-۱۷ (IL-17F) و افزایش استعداد ابتلا به سرطان معده پرداختند. آنها نیز به این نتیجه رسیدند که بین پلی مورفیسم در جایگاه ۷۴۸۸ از ژن IL-17F و احتمال ابتلا به سرطان معده رابطه معنی‌داری وجود ندارد.[۱۹] این یافته‌ها با نتایج مطالعه Shibata و همکاران در ژاپن همسو می‌باشند که نشان دادند فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مبتلا به سرطان معده و افراد غیر مبتلا برابر می‌باشد.[۲۰] در این مطالعه برای اولین بار رابطه بین پلی‌مورفیسم در جایگاه 1512A/C- از ژن IL-13 و احتمال ابتلا به عفونت با هلیکوباکتر پیلوری را مورد

مطالعه قرارداده شد. اما در مطالعات مشابه به عنوان مثال رابطه بین پلی‌مورفیسم در این جایگاه و ابتلا به لیشمانیوز احشایی مورد مطالعه قرار گرفته است. معظمیان و همکاران در این مطالعه، ۵۲ فرد مبتلا به لیشمانیوز احشایی و ۱۰۴ نفر فرد سالم از ناحیه اندمیک جنوب فارس را مورد مطالعه قرار دادند. این مطالعه نشان داد که هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها در جایگاه پلی-مورفیسم 1512A/C- از ژن IL-13 در بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی و افراد سالم وجود ندارد.[۲۱] پس با در نظر گرفتن نتایج مربوط به پلی‌مورفیسم در جایگاه 1512A/C- و فراوانی ژنوتیپی در این جایگاه می‌توان به روشنی دریافت رابطه معنی‌داری بین وجود ژنوتیپ خاصی در این جایگاه و افزایش بیان و در نهایت افزایش سطح سرمی IL-13 و احتمال بروز عفونت توسط هلیکوباکتر پیلوری وجود ندارد.در ادامه مطالعه پلی‌مورفیسم ژن IL-13 در جایگاه A/G 2044+ مورد بررسی قرار گرفت. بین فراوانی ژنوتیپی در جایگاه A/G 2044+ بروز عفونت توسط هلیکوباکتر پیلوری رابطه معنی‌داری وجود دارد. زیرا سطح معنی‌داری در این آزمون کمتر از ۰/۰۵ بدست آمد. (p-value =0/001). در مطالعه‌ای مشابه Lu و همکاران نقش پلی‌مورفیسم در دو جایگاه مربوط به ژن IL-10 را مورد بررسی قرار دادند. آنها به این نتیجه رسیدند که این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند خطر عفونت توسط هلیکوباکتر پیلوری را تحت تاثیر خود قرار دهند. این محققین در ادامه نشان دادند که پلی مورفیسم‌های IL-10 می‌تواند سطوح تولید سایتوکاین را تعدیل کند.[۲۲] با توجه به نتایجی که در این بخش بدست آورده شد، مشاهده گردید که رابطه معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپی در جایگاه A/G 2044+ از ژن IL-13 و بروز عفونت وجود دارد، در ادامه پژوهش نقش این پلی‌مورفیسم در تغییر سطح بیان IL-13 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مربوط به آزمون مربع کای نشان داده از آنجا که سطح معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵ بدست آمده است (p-value =0/27) بنابراین بین سطح سرمی IL-13 و فراوانی ژنوتیپی در جایگاه 2044 A/G+ ارتباط معنی داری وجود ندارد. از مجموع این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً وجود رابطه بین پلی‌مورفیسم در این جایگاه و بروز عفونت توسط هلیکوباکتر پیلوری به نحوی غیر از تغییر در الگوی بیان سایتوکاین IL-13 صورت گرفته است. به علاوه در این تحقیق علاوه بر نقش پلی‌مورفیسم در ژن سایتوکاین IL-13 در بروز عفونت توسط هلیکوباکتر پیلوری، سطح سرمی این سایتوکاین در دو گروه کنترل و بیمار،مستقل از پلی‌مورفیسم در این جایگاه‌ها مورد بررسی قرار دادیم. آنالیز آماری مربوطه به صورت t-test انجام شد تا به این سوال پاسخ داده شود آیا بین میانگین سطح سرمی IL-13 در دوگروه بیمار و کنترل رابطه‌ای وجود دارد یا خیر. آنالیز t-test نشان داد p-value =0/73 است و این بدان معناست هیچ رابطه معنی‌داری بین سطح سرمی IL-13 و شانس ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری وجود ندارد.(p-value =0/05).در مطالعه‌ای که اسکندری نسب و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند بدست آمد. این محققین یک گروه متشکل از ۶۷ نفر مبتلا به زخم معده ۲۶ نفر فرد سالم را مورد مطالعه قرار دادند. در بخشی از این مطالعه، سطح سرمی IL-13 بین دو گروه سالم و بیمار مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز t-test نشان داد هیچ اختلاف معنی‌داری بین سطح سرمی IL-13 بین دو گروه سالم و بیمار وجود ندارد.[۲۳] البته در مطالعه‌ای که ماروتی و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام دادند تفاوت معنی‌دار بین سطح سرمی IL-13 در دو گروه بیماران هلیکوباکتر پیلوری مثبت و منفی را به اثبات رساندند.[۹] گزارشاتی مبنی بر اثر تعدیل کننده بالقوه عفونت هلیکوباکتر پیلوری با ارتباط میان پلی مورفیسم‌های ژنتیکی و خطر سرطان معده، زخم معده، التهاب معده و توسعه لنفوم فولیکول لنفاوی وجود دارد. پلی مورفیسم در جایگاه‌های ژنی متعددی گزارش شده اند؛ بیشترین موارد مطالعه شده ژن‌های IL-1، IL-10 و TNF-α هستند.[۲۴] دو پلی مورفیسم دو آللی در موقعیت‌های ۵۱۱- و ۳۱- در IL-1β بطور گسترده در بیماری‌های مختلف مطالعه شده‌اند. طی مطالعه ای El-omar و همکارانش گزارش کردند که پلی مورفیسم کلاستر ژن اینترلوکین-۱ با افزایش خطر هیپوکلریدری (بیماری کمبود اسید معده) ناشی از هلیکوباکتر پیلوری و سرطان معده مرتبط است. بر اساس نتایج آن ها، مطالعات متعددی روابط چندشکلی‌های IL-1 با عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماری‌های دستگاه گوارش را بررسی کرده اند.[۲۵]

نتیجه‌گیری

مطالعات اپیدمیولوژیک مختلفی نشان می‌دهند که عفونت با

هلیکوباکتر پیلوری شیوع نسبتاً بالایی دارد. با توجه به خطر ابتلا بـه سرطان معده در صورت آلودگی با ایـن بـاکتری و همچنـین نقـش زمینه ژنتیکی فرد در بالا بردن شانس ابتلا به سرطان به نظر می‌رسد بررسی پلی مورفیسم در ژن‌های مختلفـی کـه بـه نحـوی در پاسـخ سیستم ایمنی به این عامل باکتریایی نقش دارند بتواند در پیشگیری، غربالگری و درمان مبتلایان کمک شایانی کند.

امید است روند سـریع توسـعه روش‌هـای تشـخیص و درمـان بیماران با شناسـائی مارکرهـای مولکـولی، ژنتیکـی و ویژگـی‌هـای فارماکوژنتیک جدید بتواند کیفیت زندگی را بهبود بخشد.

Refrences

1. Ford AC, Axon AT. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implicationsHelicobacter.Helicobacter. 2010 Sep;15 Suppl 1:1-6.
2. Goh KL, Chan Wk Fau - Shiota S, Shiota S Fau - Yamaoka Y, et al. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications. Helicobacter. 2011 Sep;16 Suppl 1:1-9.
3. Dattoli VC, Veiga Rv Fau - da Cunha SS, da Cunha Ss Fau - Pontes-de-Carvalho LC, et al. Seroprevalence and potential risk factors for Helicobacter pylori infection in Brazilian children. Helicobacter. 2010 Aug;15(4):273-8.
4. Izuhara K, Arima K. Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma. Drug News Perspect. 2004 Mar;17(2):91-8.
5. Lamb A, Chen LF. Role of the Helicobacter pylori-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. J Cell Biochem. 2013 Mar;114(3):491-7
6. Robinson K, Argent Rh Fau - Atherton JC, Atherton JC.The inflammatory and immune response to Helicobacter pylori infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007;21(2):237-59.
7. Serelli-Lee V, Ling Kl Fau - Ho C, Ho C Fau - Yeong LH, et al. Persistent Helicobacter pylori specific Th17 responses in patients with past H. pylori infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1beta. PLoS One. 2012;7(6).
8. Salimzadeh L, Bagheri N, Zamanzad B,et al. Frequency of virulence factors in Helicobacter pylori-infected patients with gastritis.Microb Pathog. 2015 Mar;80:67-72.
9. Marotti B, Rocco A Fau - De Colibus P, De Colibus P Fau - Compare D, et al. Interleukin-13 mucosal production in Helicobacter pylori-related gastric diseases. Dig Liver Dis. 2008 Apr;40(4):240-7.
10. Martínez-Becerra F, Castillo-Rojas G, de León SP. IgG subclasses against Helicobacter pylori isolates: an important tool for disease characterization. Scandinavian journal of immunology. 2012;76(1):26-32.
11. Raza Y, Khan A, Khan AI,et al. Combination of Interleukin 1 Polymorphism and Helicobacter pylori Infection: an Increased Risk of Gastric Cancer in Pakistani Population. Pathol Oncol Res. 2017 Oct;23(4):873-880.
12. Hartland S, Newton Jl Fau - Griffin SM, Griffin Sm Fau - Donaldson PT, et al. A functional polymorphism in the interleukin-1 receptor-1 gene is associated with increased risk of Helicobacter pylori infection but not with gastric cancer. Dig Dis Sci. 2004 Sep;49(9):1545-50.
13. Achyut BR, Tripathi P Fau - Ghoshal UC, Ghoshal Uc Fau - Moorchung N, et al. Interleukin-10 (-819 C/T) and tumor necrosis factor-alpha (-308 G/A) gene variants influence gastritis and lymphoid follicle development. Dig Dis Sci. 2008 Mar;53(3):622-9.
14. Bockerstett KA, DiPaolo RJ. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2017 Mar 14;4(1):47-53.
15. Caruso R Fau - Pallone F, Pallone F Fau - Monteleone G, Monteleone G. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H pylori-associated pathologyWorld J Gastroenterol. 2007 Nov 14;13(42):5547-51.
16. Backert S, Naumann M. What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by Helicobacter pylori. Trends Microbiol. 2010 Nov;18(11):479-86.
17. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 Nov;7(11):629-41.
18. Yamauchi K, Choi Ij Fau - Lu H, Lu H Fau - Ogiwara H, et al . Regulation of IL-18 in Helicobacter pylori infection.J Immunol. 2008 Jan 15;180(2):1207-16.
19. Li TJ, Jiang YM, Hu YF, Huang L,et al. Interleukin-17-Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer. Clin Cancer Res. 2017 Mar 15;23(6):1575-1585
20. Watanabe M, Kato J Fau - Inoue I, ,et al. Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and Helicobacter pylori antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis. Int J Cancer. 2012 Dec 1;131(11):2632-42.
21. Moazamian E, Rasouli M, Asaei S. The association of interleukin-13 gene polymorphism withkala-azar patients. JFUMS. 2013;3(2):174-8.

22. Lu W, Pan K Fau - Zhang L, Zhang L Fau - Lin D, et al. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor {alpha} and risk of gastric cancer in a Chinese population.Carcinogenesis. 2005 Mar;26(3):631-6.

23. Eskandari-Nasab E, Sepanjnia A Fau - Moghadampour M, Moghadampour M Fau - Hadadi-Fishani M, et al. Circulating levels of interleukin (IL)-12 and IL-13 in Helicobacter pylori-infected patients, and their associations with bacterial CagA and VacA virulence factors.Scand J Infect Dis. 2013 May;45(5):342-9.

24. de Oliveira JG, Rossi AF, Nizato DM,et al. Influence of functional polymorphisms in TNF-alpha, IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer.Tumour Biol. 2015 Dec;36(12):9159-70

25. Kao JY, Zhang M Fau - Miller MJ, Miller Mj Fau - Mills JC,et al. Helicobacter pylori immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. Gastroenterology 2010 Mar;138(3):1046-54.

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences

Alborz University of Medical Sciences Journal, May 2019, Vol. 8, No. 2: 116-125 *Orginal Article*

Sirous Naeimi[1]*, Medisa Kaabi[2], Amin Ebadi[3]

[1] *Assistant Professor of Molecular Genetics, Department of Genetics, Colleague of Science, Kazerunbranch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*

[2] *Master Science of Microbiology, Department of Microbiology, Colleague of science, Kazerunbranch,Islamic Azad University,Shiraz, Iran*

[3] *Assistant Professor of Chemistry, Department of Chemistry, Colleague of science, Kazerunbranch,Islamic Azad University,Kazerun, Iran*

Investigation of Serum Level and IL-13 Genetic Variations in Positions +2044 G/A and -1512A/C in Southern Iranian Patients with *H. Pylori*

Received: 8 Nov. 2017 ; Accepted: 3 Mar. 2018

Abstract

Background: *Helicobacter pylori (H. pylori)*is agramnegative bacterium thatcolonizes stomach mucosa andcausesupper gastrointestinal diseases.Interleukin-13 is a preventive immune cytokine produced by many immune cells. IL-13 gene is located on chromosome 5 q 25 bp. It has polymorphisms at positions -1512 A/ C and +2044 G/A, which are associated with the expression rate of this cytokine .The aim of this study is to investigate the serum level and polymorphisms of IL-13 gene in patients with *H.pylori* infection.

Methods: In this case control study, DNA was isolated by salting out method from peripheral blood of 150 patients with H.pylori infection diagnosed by an expert. PCR-RFLP was used to examine polymorphisms of IL-13 gene . The results were compared with 150 healthy controls by SPSS software and Chi-square test.Tostudy, the serum levels of IL-13 cytokine, serum samples of 40 patients and 40 controls were prepared and examined using ELISA kit.

Results: According to the findings, there is a significant difference in (CI: 06/1-09/0, OR 32.0 MB) GA (P = 0/005) and (08/1-52/0: CI, OR: 45.0) GG (P = 0/045) genotypes at A/2044 G +, position between patients and the control group. No significant differences were observed at the position of -1512 A/C. Also, no significant differences were seen between serum level of IL-13 cytokine and *H. pylori* disease (P >. 0.05).

Conclusion: Based on the results obtained, it seems that GA and GG genotypes of interleukin-13 gene at position 2044+ make people more susceptible to H. pylori infection.

Keywords: H.Pylori, Genotype, IL-13 Gene, Polymorphism

***Corresponding Author:**
Department of Genetics, Colleague of Science, Kazerunbranch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Tel: 071-42230505
E-mail: naeimis@kau.ac.ir