

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

به نام خدا

برهم کنش هلیکوباکتریلوری و اتوفاژی در سرطان زایی معده

مولفان :

دکتر مرضیه اسمعیل زاده

دکتر مهیار زینی وند

دکتر مرضیه احمدی خوزانی

انتشارات ارسطو

(سازمان چاپ و نشر ایران - ۱۴۰۵)

نسخه الکترونیکی این اثر در سایت سازمان چاپ و نشر ایران و اپلیکیشن کتاب رسان موجود می باشد

Chaponashr.ir



شماره کتابشناسی ملی: ۱۰۵۳۴۰۰۸

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۱۲۹-۳۱۸-۶

سرشناسه: اسمعیل زاده، مرضیه، ۱۳۶۷-

عنوان و نام پدیدآور: برهم کنش هلیکوباکتریلوری و اتوفاژی در سرطان زایی معده [منابع الکترونیکی: کتاب]/
مولفان مرضیه اسمعیل زاده، مهیار زینی وند، مرضیه احمدی خوزانی.

مشخصات نشر: مشهد: ارسطو، ۱۴۰۵.

مشخصات ظاهری: ۱ منبع برخط (۱۰۸ص).

وضعیت فهرست نویسی: فیبا

یادداشت: کتابنامه: ص. [۹۱] - ۱۰۸.

نوع منبع الکترونیکی: فایل متنی. (PDF)

یادداشت: دسترسی از طریق وب.

شناسه افزوده: زینی وند، مهیار، ۱۳۶۶-

شناسه افزوده: احمدی خوزانی، مرضیه، ۱۳۶۴-

موضوع: هلیکوباکتریلوری

موضوع: Helicobacter pylori

موضوع: کریچه های اتوفاژیک

موضوع: Autophagic vacuoles

موضوع: معده -- سرطان

موضوع: Stomach -- Cancer

رده بندی کنگره: ۸۴۰ / ه ۸ / RC

رده بندی دیویی: ۳۳۰/۱۴۶۱۶/

دسترسی و محل الکترونیکی: آدرس الکترونیکی منبع

نام کتاب: برهم کنش هلیکوباکتریلوری و اتوفاژی در سرطان زایی معده

مولفان: دکتر مرضیه اسمعیل زاده - دکتر مهیار زینی وند - دکتر مرضیه احمدی خوزانی

ناشر: انتشارات ارسطو (سازمان چاپ و نشر ایران)

صفحه آرای، تنظیم و طرح جلد: محدثه فرهنگد

تیراژ: ۱۰۰۰ جلد

نوبت چاپ: اول - ۱۴۰۵

چاپ: زبرجد

قیمت: ۱۸۵۰۰۰ تومان

فروش نسخه الکترونیکی - کتاب رسان:

<https://chaponashr.ir/ketabresan>

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۱۲۹-۳۱۸-۶

تلفن مرکز پخش: ۰۹۱۲۰۲۳۹۲۵۵

www.chaponashr.ir



تقدیم به

مقدس ترین واژه ها در لغت نامه دلم

مادر مهربانم که زندگیم را مادیون مهر و عطوفت آن می دانم.

پدر، مهربانی مشفق، بردبار و حامی.

فهرست

پیشگفتار	۹
فصل اول: کلیات	۱۱
مقدمه	۱۱
هلیکوباکتریپیلوری	۱۱
باکتریولوژی	۱۱
اپیدمیولوژی	۱۳
پروسه عفونت	۱۴
فاکتورهای ویروالانس هلیکوباکتریپیلوری	۱۵
سیتوتوکسین واکوئله کننده A	۱۸
جزیره بیماریزایی cag (cagPAI)	۲۰
CagA	۲۵
CagL	۲۸
پاتوژنز هلیکو باکتریپیلوری	۳۰
هلیکوباکتریپیلوری و نقش آن در رخ داد سرطان معده	۳۲
سیستم عرضه و نمایش روی سطح اسپور باسیلوس سوبتیلیس	۳۹
CotB فراوان ترین پروتئین پوشش خارجی اسپور باسیلوس سوبتیلیس	۴۱
اتوفاژی	۴۲
انواع اتوفاژی	۴۷
فرایند اتوفاژی	۵۱
مکانیسم ملکولی اتوفاژی	۵۲
ادغام شدن با لیزوزوم و تجزیه محتویات اتوفاگوزوم	۵۴

تنظیم اتوفاژی	۵۸
نقش های اتوفاژی	۶۲
نقش اتوفاژی در تعادل انرژی سلولی	۶۲
نقش اتوفاژی در تخریب پروتئین	۶۲
نقش اتوفاژی در مرگ سلولی	۶۳
اتوفاژی و سرطان	۶۴
نقش دوگانه اتوفاژی در سرطان زایی (ضد توموری و بقای سلول های توموری)	۶۶
تنظیم ملکولی اتوفاژی در سرطان	۶۸
اتوفاژی و سرطان معده	۷۳
تخریب ژن های مربوط به اتوفاژی در GC	۷۳
اتوفاژی می تواند GC را مهار کند	۷۵
مسیرهای سیگنالینگ کلیدی اتوفاژی در GC	۷۷
نقش اتوفاژی در عفونت و بیماری	۷۸
اتوفاژی میزبان در عفونت هلیکوباکتریلوری	۸۰
منابع	۹۱

پیشگفتار

با وجود مطالعات مختلفی که در سال‌های اخیر در رابطه با تاثیر عفونت هلیکوباکتر پیلوری بر افزایش یا کاهش بیان مدياتورهای مسیر سیگنالینگ اتوفاژی در سلول‌های میزبان انجام شده است، هنوز عوامل باکتریال القاء کننده و پیش برنده این میانکنش‌های بین پاتوژن میزبان بخوبی شناخته نشده است. پروتئین CagL هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یکی از مهمترین عوامل ویروالانس این پاتوژن محسوب می‌شود که نقش مهمی در اتصال و میانکنش با گیرنده‌های اینترگرینی سلول‌های اپیتلیال بافت معده میزبان و ترانسلوکاسیون افکتورهای هلیکوباکتر پیلوری به درون سلول دارد. همچنین این فرضیه وجود دارد که پروتئین CagL هلیکوباکتر پیلوری احتمالاً می‌تواند با القای مسیر سیگنالینگ اتوفاژی سلول منجر به افزایش یا کاهش بیان مدياتورهای اتوفاژی شود. لذا هدف اصلی کتاب حاضر بررسی اثرات و نقش‌های احتمالی پروتئین CagL هلیکوباکتر پیلوری و دو واریانت اسید آمینه ای این پروتئین در تغییرات سطوح بیان تعدادی از مدياتورهای کلیدی اتوفاژی در مسیرهای بیماری زایی و سرطانزایی مرتبط با عفونت هلیکوباکتر پیلوری و سرطان معده می‌باشد.

در کتاب حاضر باسیلوس سوبتیلیس با روش Nutrient exhaustion برای تولید اسپور القا شد و پس از تخلیص اسپور، رنگ‌آمیزی اختصاصی اسپور به روش شفر-فولتون به منظور بررسی خالص بودن اسپور انجام شد. دو واریانت ژن CagL (OC824 , OC975) بر روی سطح پوشش خارجی اسپور باسیلوس سوبتیلیس با روش عرضه روی سطح اسپور بیان شدند.

روش عرضه روی سطح اسپور یکی از پرکاربردترین و کارآمدترین روش‌های بیان پروتئین‌های هترولوگ و نوترکیب بر روی سطح می‌باشد، که در کتاب حاضر برای اولین بار جهت بیان پروتئین‌های هترولوگ CagL هلیکوباکتر پیلوری به منظور بررسی اثرات آنها بر روی سطح بیان مدياتورهای اتوفاژی سلول استفاده شد. سپس کشت همزمان و انجام میانکنش اسپورهای نوترکیب و غیرنوترکیب باسیلوس سوبتیلیس سویه PY-79 با سلولی رده AGS انجام شد. میزان تغییرات بیان مدياتورهای کلیدی اتوفاژی در سلول‌های AGS آلوده شده با اسپورهای نوترکیب در مقایسه با کشت همزمان با اسپور غیر نو ترکیب پس از ۳ و ۶ ساعت انکوباسیون با روش Quantitative Real-time PCR ارزیابی شد. آنالیز نتایج بدست آمده به روش $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ Fold Change انجام گرفت و $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. سطح بیان Atg12 به طور معناداری ۳ ساعت بعد از عفونت افزایش یافت ولی در مورد Beclin-1 ۳ ساعت بعد از عفونت کاهش بیان مشاهده شد.

در مورد مدیاتورهای Atg5, Atg 16L1, LC3-II افزایش بیان معنا داری ۳ ساعت بعد از عفونت مشاهده نشد. افزایش بیان ۴ مدیاتور Atg5, Atg12, Atg16L1, LC3-II ۶ ساعت بعد از عفونت به طور معناداری مشاهده شد و در مورد Beclin-1 ۶ ساعت بعد از مواجهه با عفونت کاهش بیان مشاهده شد.

هم چنین افزایش بیان مدیاتورهای ذکر شده بیشتر در واریانت OC824 CagL که بیماری زایی بیشتری نسبت به OC975CagL دارد مشاهده شد که نشان دهنده شدت بیماری را بودن هلیکوباکتر پیلوری در القای اتوفاژی می باشد. نتایج این کتاب پیشنهاد کننده نقش احتمالی پروتئین CagL هلیکوباکتر پیلوری در تغییرات سطوح بیان تعدادی از مهم ترین مدیاتورهای اتوفاژی مرتبط با عفونت هلیکوباکترپیلوری و سرطانزایی معده می باشد. علاوه بر این با توجه به اهمیت تغییرات بیان مدیاتورهای اتوفاژی در پیشرفت و توسعه بیماری های گاستروئودنال و سرطان معده ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری، بررسی الگوهای بیان مدیاتورهای کلیدی اتوفاژی سلولی می تواند در پروگنوزیس و تشخیص مراحل سرطان معده بسیار سودمند باشد و به عنوان اهداف درمانی پیشنهاد می گردد.

فصل اول:

کلیات

مقدمه

هلیکوباکتری پیلوری یکی از شایع ترین عفونت های انسانی است و باعث آرایه وسیعی از اختلالات معده می شود که شامل التهاب معده، زخم معده و یا سرطان معده می باشد. از این نظر یک رابطه قوی بین عفونت هلیکوباکتری پیلوری و سرطان معده در انسان وجود دارد. در افراد مبتلا به عفونت مزمن هلیکو باکتر پیلوری، نفوذ قابل توجهی از نوتروفیل ها و ماکروفاژها به لایه مشخصی از اپی تلیال معده مشاهده می شود. هلیکوباکتر پیلوری باعث ایجاد پاسخ قابل توجهی از سلول های T می شود. ناکارآمدی باکتری در آشکار شدن عفونت ممکن است به دلیل توانایی باکتری در نفوذ به داخل سلول های اپی تلیال معده باشد که باعث فرار باکتری از سلول های ایمنوسیت و آنتی بیوتیک های با فعالیت خارج سلولی می شود. هلیکو باکتری پیلوری هم چنین می تواند در سلول های فاگوسیت زنده بماند.

هلیکو باکتر پیلوری در داخل سلول میزبان برای بقای خود از ماشین آلات سلول میزبان استفاده می کند. در چند دهه گذشته چندین گروه تحقیقاتی گزارش کردند که عفونت هلیکوباکتری پیلوری می تواند ماکرو اتوفاجی را القا کند. ماکرو اتوفاجی یک فرایند حفاظتی مورد استفاده توسط سلول های یوکاریوتی برای حفظ همئوستاز سلول و دفاع در برابر حمله میکروب های پاتوژن است. اگرچه اکثرا هدف ماکرو اتوفاجی باکتری های داخل سلولی می باشد اما هم چنین می تواند علیه باکتری های خارج سلولی زمانی که آنها وارد سلول های یوکاریوتیک می شوند عمل کند. هلیکوباکتری پیلوری از غشای دولایه اتوفازوم ها در ماکرو اتوفاجی به عنوان یک نیچ همانند سازی استفاده می کند. هلیکوباکتری پیلوری برای فرار از ماشین اتوفاجی با کاهش بیان پروتئین های اتوفاجی این کار را انجام می دهد.

هلیکوباکتر پیلوری

باکتریولوژی

هلیکوباکتری پیلوری باکتری گرم منفی، مارپیچی شکل و یا بصورت باسیل های منحنی شکل، میکرو آئروفیلیک گرم منفی و بدون اسپور است و این باکتری دارای فلاژل های غلاف دار منفرد یا

چند تایی، قطبی، دو قطبی یا پیرامونی فوق العاده متحرک می باشد. هیدروژن رشد آن را تحریک می کند و این باکتری ساکارز را هیدرولیز نمیکند و اکسیداز و کاتالاز مثبت است. هلیکوباکتر پیلوری در ۲۵ درجه سانتی گراد نمی تواند رشد کند. هلیکو باکتر پیلوری دو دسته می باشد:

۱- یک دسته در مخاط معده انسان و حیوان زندگی و ایجاد کلنی می کنند

۲- دسته دوم در روده ایجاد کلنی می کنند (فقط انسان).

گونه های معده اوره آز فراوانی تولید می کنند. هلیکو باکتر پیلوری در محیط آزمایشگاه رشد آهسته ای دارد و مانند کمپیلوباکتر میکروآتروفیلیک بوده و به CO₂ و رطوبت بالایی برای رشد نیاز دارد. این باکتری هم چنین به ۸۵ درصد ازت و ۱۰ درصد CO₂ و ۵ درصد O₂ برای رشد نیاز دارد. این باکتری را می توان را در محیط های کشت اختصاصی و محیط کشت ژل خونی در دمای ۳۷ درجه و فشار اکسیژن ۵ درصد در عرض ۳ تا ۷ روز می توان کشت داد. در مجموع این باکتری کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت و اوره آز مثبت است (Goodwin and Armstrong, 1990). مطالعات انجام شده وجود مسیر تخمیری و احیاء فومارات را که ویژگی بی هوازی هاست نشان می دهد. باکتری دارای آنزیمهای مسیر آنتردودورف می باشد که با توجه به آن پیشنهاد می شود که ممکن است این باکتری یک میکروارگانیسم قدیمی باشد که در طول تاریخ همراه با انسان تکامل یافته است وجود مسیرهای سنتز پورین و نوکلئوتیدها، یادآور انگل های درون سلولی مانند متیکوباکتریوم لپره است. اما هنوز مدارکی دال بر درون سلولی بودن آن یافت نشده است. باکتری دارای سیکل اوره است که از ویژگیهای انگل های یوکاریوتی است. تمام این صفات نشان میدهد که هلیکوباکتر پیلوری یک ارگانیسم غیرعادی است که نسبت به یک زیستگاه خاص در طی تکامل سازش پیدا کرده و انواعی از فعالیت های متابولیکی را کسب کرده است که متفاوت از باکتری های بیماریزای معمول است این باکتری یک میکروارگانیسم قدیمی میباشد که در طول تاریخ همراه با انسان تکامل یافته است. هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با با باکتری هایی که در محیط های متنوع زندگی می کنند دارای ژنوم کوچکی است. اندازه ژنوم باکتری حدود ۱/۷ Mbp و دارای محتوای G+C حدود ۳۵٪ می باشد. این ارگانیسم از نظر ژنتیکی هتروژن بوده که این هتروژنیسیته احتمالا جهت آداپته شدن هلیکوباکتر پیلوری نسبت به شرایط معده میزبان و پاسخ های ایمنی میزبان به عفونت است (Kusters et al, 2006).



B



A

شکل ۱-۱- هلیکوباکتریپیلوری A. یک باکتری به شکل استوانه ای مارپیچ است و تاژک های بلندی دارد که نفوذش را در لایه‌ی ضخیم مخاطی معده تسهیل می کنند. B. کلنی های هلیکوباکتریپیلوری روی محیط blood agar (Hosseinpour Soleimani, 2012).

اپیدمیولوژی

عفونت با هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع ترین عفونت های مزمن باکتریایی در انسان ها می باشد. عفونت هلیکوباکترپیلوری در کشور های در حال توسعه بیشتر از کشور های پیشرفته می باشد. درصد شیوع عفونت با این باکتری در سراسر جهان از ۳۱/۷ تا ۹۳/۶ درصد در بزرگسالان و ۱۱ تا ۶۶/۲ درصد در کودکان می باشد. اکتساب باکتری در اوایل دوران کودکی اتفاق می افتد و عفونت در طول زندگی ادامه می یابد و منجر به عفونت مزمن معده می شود. بیش از ۵۰ درصد جمعیت جهان هلیکوباکترپیلوری را در معده خود دارند و در اغلب موارد در طول زندگی بدون علامت و بدون علائم بالینی خاص می باشند. خطر آلوده شدن به عفونت هلیکو باکتر پیلوری با فاکتور های مختلفی مانند وضعیت اجتماعی - اقتصادی و شرایط زندگی بستگی دارد. به نظر می رسد افرادی که وضعیت اقتصادی و اجتماعی بالاتری دارند و دارای درآمد بالاتر و سطح تحصیلات بالاتر هستند در خطر پایین ابتلا به عفونت هلیکو باکتر پیلوری قرار دارند. مسیر دقیق انتقال هلیکو باکتر پیلوری هنوز معلوم نیست و به احتمال زیاد حالت انتقال از فرد و از طریق تماس مدفوع - دهان و یا خوراکی - دهان و دندان می باشد.

عفونت هلیکو باکتر پیلوری می تواند به طور موثر بر اساس درمان سه گانه شامل آنتی بیوتیک هایی مانند کلاتریترومایسین، آموکسی سیلین یا مترونیدازول و مهار کننده های پمپ پروتون مانند پنتوپرازول درمان شود، با این حال افزایش شیوع مقاومت ضد میکروبی یک چالش را در درمان ریشه کن سازی هلیکو باکترپیلوری را به همراه داشته است (Eusebi et al, 2014).

پروسه عفونت

هلیکوباکترپیلوری باکتری گرم منفی است که در معده کلونیزه می شود که اگر درمان نشود به دلیل وجود واکنش ایمنی قوی هومورال و سلولی در طول زندگی مزمن می شود. عفونت هلیکوباکترپیلوری باعث گاستریت مزمن فعال می شود که می تواند به علت تعادل پویا بین باکتری و میزبان انسانی آن به صورت چند دوره پس از اولین عفونت بدون علامت بماند تا زمانی که باکتری ها از سیستم ایمنی فرار کنند و کلونیزه شوند. عفونت هلیکو باکترپیلوری هم چنین ممکن است به بیماری های شدید تر مانند گاستریت حاد، گاستریت مزمن، اولسر پپتیک^۱، لنفوم بافت لنفویید مخاط معده (MALT)^۲، آتروفی معده^۳، متاپلازی روده ای^۴ و در نهایت سرطان معده^۵ باعث شود. (Herrera and Pasronnet, 2009; Polk and Peek, 2010)

این باکتری در مخاط معده با وجود این که محیطی بسیار اسیدی است و به طور معمول به عنوان ابزاری برای محافظت در برابر باکتری های پاتوژن عمل می کند، ساکن است (S. Deen et al, 2013) عفونت هلیکو باکتر پیلوری به عنوان فاکتور ریسک ارتباط با سرطان معده نیز شناخته شده است. ارتباط هلیکوباکترپیلوری با سرطان معده مانند ارتباط سیگار با سرطان ریه است. با این حال توسعه آدنوما کارسینومای معده تنها در درصد کمی از افراد مبتلا به عفونت هلیکوباکترپیلوری رخ می دهد.

به نظر می رسد سرطان معده مرتبط با هلیکوباکترپیلوری در نتیجه تعامل بین پاتوژن و میزبان که به فاکتورهای سویه خاص باکتری، صفات ژنوتیپ میزبان و عوامل محیطی قابل قبول وابسته است ظاهر می شود (Ricci, 2016). این عفونت دشوار بوده و برای درمان به درمان آنتی بیوتیکی نیاز است. یکی از دلایل برای مقاومت نسبتا بالا به درمان هلیکو باکتر پیلوری توانایی این باکتری به

^۱. Peptic Ulcer Disease

^۲. Mucosa Associated Lymphoid Tissue

^۳. Atrophic Gastritis

^۴. Intestinal Metaplasia

^۵. Gastric Cancer

مقاومت در داخل سلول میزبان است. البته هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یک پاتوژن خارج سلولی به سلول های اپی تلیال معده و تا حدی ایمونوسیت ها حمله می کند.

بقای داخل سلولی هلیکوباکترپیلوری به دلیل توانایی آن در فرار از پاسخ های ایمنی میزبان و مقاومت آن در برابر آنتی بیوتیک های غشایی می باشد. شواهد اخیر نشان می دهد که ماکروآتوفازی یک فرآیند تخریب سلولی است که نقش مهمی در تعیین سرنوشت داخل سلولی هلیکوباکترپیلوری بازی می کند (S. Deen et al, 2013).

فاکتورهای ویروالانس هلیکوباکترپیلوری

هلیکوباکترپیلوری دارای چندین فاکتور ویروالانس می باشد که شامل اوره آز، کاتالاز، پروتئین فعال (NapA)، جزائر پاتوژنسیته Cag (Cag PAI)، پروتئین افکتور CagA، سیتوتوکسین واکوئل کننده^۱ VacA پروتئین های غشای خارجی (OpiA, ALPA, BabA, SapA) می باشد. علاوه بر این موارد، فاکتورهای بیماری زایی دیگری نیز دارد، از جمله تاژک، لیپوپلی ساکارید، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، موسیناز، فسفولیپاز A پروتئین های شوک حرارتی و...

(Kusters et al., 2006; Oleastro and Menard, 2013).

^۱. Vacuolating cytotoxin A (VacA)